

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE MEDICINA

**EFEECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA
FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON
HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

D^a. María Dolores Paredes Carreras

2015

D. **JOAQUÍN MARÍA GARCÍA-ESTAÑ LÓPEZ**, Catedrático de Fisiología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia; Dña. **MARÍA CLARA ORTIZ RUIZ**, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia y D. **JULIÁN CASTILLO SÁNCHEZ**, Director de I+D+i de Nutrafur S.A.

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL**” ha sido realizada por Dña. María Dolores Paredes Carreras bajo nuestra dirección. Una vez revisada y conforme, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Y para que así conste a todos los efectos, expiden y firman la presente certificación en Murcia, a 1 de Junio de 2015.

Firmado: **Dr. Joaquín María García-Estañ López**

Firmado: **Dra. María Clara Ortiz Ruiz**

Firmado: **Dr. Julián Castillo Sánchez**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer de manera sincera, a todos los que han contribuido de una u otra forma en la elaboración de esta Tesis Doctoral, sin los cuales no habría sido posible su realización. En primer lugar, quiero dar mi más sincero agradecimiento a mis tres directores de Tesis:

- Al Dr. **Joaquín María García-Estañ López**, por aceptarme en su grupo de investigación, haberme brindado la oportunidad de realizar la presente Memoria en su laboratorio y facilitarme los medios necesarios para su realización.
- A la Dra. **María Clara Ortiz Ruiz**, por haber accedido a ser la tutora de esta Tesis Doctoral y enseñarme a dar mis primeros pasos en la investigación biomédica. Por transmitirme sus conocimientos, guiarme y dirigirme con gran dedicación durante estos años. En definitiva, por el tiempo que me ha dedicado y la confianza que ha depositado en mí para llevar a cabo este proyecto.
- Al Dr. **Julián Castillo Sánchez**, por su disponibilidad permanente, por sus incansables ánimos, por su constante interés, su colaboración, participación y por compartir conmigo sus conocimientos en el campo de los flavonoides.

Quiero dar las gracias especialmente a la empresa **Nutrafur S.A.**, tanto el soporte económico proporcionado, que ha hecho viable este proyecto, como por suministrar generosamente los extractos de flavonoides. También, quiero destacar su contribución en las determinaciones de análisis cromatográficos realizadas.

A la Dra. **Noemí Teresa Marín Atucha**, por sus valiosos consejos, inmensa ayuda en los experimentos de reactividad vascular y su gran disposición a colaborar en todo lo que he necesitado, los cuales han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A D. **Francisco O'Valle Ravassa** del Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada por su colaboración en la realización de los estudios histológicos.

Quiero dar las gracias al **Departamento de Fisiología** y a todos los componentes del mismo, por su acogida en todo momento y su amabilidad. En particular, quiero agradecer a mis compañeros de trabajo Paola, José Eduardo, Susana, Rasha, María del Mar y Ana Belén, su ayuda y aportaciones en el día a día.

A los profesores **Alberto Kaumann, María Luisa Vargas, Gregorio López** y a mis amigos de siempre, Libertad, Rubén, Juan Fernando, Inés, Patricia, Loreto, Lucía, Yoli, Thomas, Lozano, Luis Francisco, María José, Aroa, María, José Ángel y a todos aquellos que haya podido olvidar, simplemente gracias por vuestra amistad, cariño y por los buenos momentos vividos en este tiempo.

Finalmente, a mi familia, especialmente a mi tía María, a mis hermanos y sobrinos, a mi cuñada María Victoria y a mi hermano José Manuel por su infinita paciencia, haber confiado siempre en mí, por no permitirme abandonar, por su apoyo incondicional y por estar en los buenos, pero sobre todo en los momentos difíciles. Ellos son una parte importante de este camino. Gracias por estar siempre a mi lado y hacer posible que hoy esté aquí. Esta Tesis va por vosotros.

*A mis padres
José y Otilia*

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad de Murcia, contando con la financiación proporcionada por la empresa **Nutrafur S.A.** a través del proyecto CENIT, acrónimo SENIFOOD, financiado por el CDTI (2009-2012).

Introducción

De acuerdo con las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en los países desarrollados, siendo la hipertensión arterial (HTA) su principal factor de riesgo confirmando, por tanto, que sigue siendo un problema mundial de salud pública.

Durante las últimas décadas, se han logrado avances significativos en el tratamiento de la hipertensión mediante el uso de inhibidores del sistema renina-angiotensina (SRAA), ya sea con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), antagonistas de los receptores de angiotensina II de tipo 1 (ARA II), diuréticos, betabloqueantes o bloqueantes de los canales de calcio.

Un número creciente de estudios epidemiológicos observacionales han examinado la asociación entre la ingesta de alimentos ricos en polifenoles y flavonoides, con el desarrollo y evolución de ciertas enfermedades crónicas. En general, la evidencia epidemiológica muestra que una mayor ingesta de flavonoides se asocia con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

El creciente interés en la búsqueda de soluciones farmacológicas eficaces y carentes de efectos secundarios significativos, y su potencial papel en la regulación de la función cardiovascular, ha supuesto en los últimos años un incremento en los estudios de aplicación de estos compuestos, incidiendo en la necesidad de establecer asimismo sus vías y mecanismos de actuación, tanto molecular como fisiológicamente.

Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis ha sido evaluar el efecto de distintos grupos de flavonoides en el tratamiento de la HTA experimental. Además, se han estudiado algunos de los mecanismos potencialmente responsables de este efecto, intentando, al mismo tiempo, establecer una relación estructura-actividad para los diferentes flavonoides estudiados.

Metodología

Se realizó un estudio metabólico de 24 horas para medir la diuresis, natriuresis y balance de sodio y obtener muestras de orina. Posteriormente, se realizaron medidas de la presión arterial media (PAM), se obtuvieron muestras de plasma y riñón, y se aisló la aorta torácica para evaluar la respuesta a acetilcolina (ACh) dependiente de endotelio.

Para estimar los niveles de óxido nítrico (NO), se determinó la excreción urinaria de nitritos y, como biomarcador del estrés oxidativo, se midieron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en riñón, orina y plasma.

Para ello, se han utilizado dos modelos de HTA experimental:

- a) Hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico o modelo de hipertensión L-NAME
- b) Hipertensión arterial espontánea (SHR)

Resultados

Los ensayos y experimentos de este trabajo, muestran que los extractos de flavonoides empleados, reducen significativamente la presión arterial media (PAM) y mejoran la mayoría de los parámetros fisiológicos estudiados, siendo sus estructuras esenciales para esta mejora.

Conclusiones

Resulta evidente, que existe una relación directa entre la estructura molecular de estos flavonoides y su actividad biológica específica en cada uno de los parámetros evaluados en la presente memoria.

Palabras clave

Hipertensión arterial (HTA); inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA); óxido nítrico (NO); relajación dependiente de endotelio; reactividad vascular; estrés oxidativo (EO); N^w-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME); rata espontáneamente hipertensa (SHR); presión arterial (PA); flavonoides.

Introduction

According to statistics from the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases are the major cause of death in developed countries, the arterial hypertension (HTA) is the main risk factor confirming therefore, remains a global public health problem.

During the last decades, significant progress in the treatment of hypertension has been made through the use of inhibitors of the renin-angiotensin system; with either angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor type 1 blockers, diuretics, beta-blockers, and calcium channel blockers.

A growing number of observational epidemiological studies have examined the association between the intake of foods rich in polyphenols and flavonoids, with the development and evolution of certain chronic diseases. Overall, the epidemiological evidence generally shows that a higher flavonoid intake is associated with lower cardiovascular disease.

The increasing interest in the search for effective and safe pharmacological solutions lacking of significant side effects and potential role in the regulation of cardiovascular function, has lead in recent years to an increase in the studies of these compounds, stressing the need to further establish their pathways and mechanisms of action, both molecular and physiologically.

Objectives

The main objective of this thesis was to evaluate the effect of different groups of flavonoids in the treatment of experimental hypertension. In addition, we have studied some potential mechanisms responsible for this effect, trying at the same time, establish a structure-activity relationship for the different flavonoids studied.

Methodology

A metabolic study of 24 hours was performed to measure the diuresis, natriuresis and sodium balance and obtain urine samples. Then, we measured mean arterial pressure (MAP), heart, kidney and plasma samples were obtained by isolating the thoracic aorta to evaluate the response to acetylcholine (ACh) endothelium dependent.

To estimate the levels of nitric oxide (NO), nitrite urinary excretion was determined and as a biomarker of oxidative stress, we measured the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in kidney, urine and plasma.

We used two experimental models of experimental hypertension:

- a) N (G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) induced hypertension rats
- b) Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)

Results

Tests and experiments of this work show that the flavonoid extracts used, significantly reduce mean arterial pressure (PAM) and improve most physiological parameters studied being their structures critical for this improvement.

Conclusions

It seems evident, as main conclusion, that there is a direct relationship between the molecular structure of these flavonoids and their specific biological activity in each of the parameters evaluated herein.

Key words:

Arterial hypertension (HTA); inhibitors of the renin-angiotensin system (IECA); nitric oxide (NO); endothelium-dependent relaxation; vascular reactivity; oxidative stress; N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME); spontaneously hypertensive rats (SHR); blood pressure (BP); flavonoids.

1	Introducción.....	1
1.1	Hipertensión arterial (HTA).....	1
1.1.1	Antecedentes y definición.....	1
1.1.2	Tipos de hipertensión.....	4
1.1.3	Patogenia de la HTA.....	5
1.1.4	Sistema cardiovascular y la HTA.....	8
1.1.4.1	Estructura de los vasos sanguíneos.....	9
1.1.4.2	Endotelio y tono vascular.....	10
1.1.4.3	Disfunción endotelial (DE).....	11
1.1.4.4	Cambios estructurales en el sistema vascular.....	12
1.1.5	Modelos experimentales de HTA.....	12
1.1.5.1	Modelo basado en hipertensión L-NAME.....	13
1.1.5.2	La rata SHR como modelo animal de hipertensión.....	14
1.1.6	Otros modelos animales de HTA.....	16
1.1.6.1	Modelo SHRSP.....	16
1.1.6.2	Modelo Doca-salt.....	16
1.1.6.3	Modelo Dahl.....	16
1.1.6.4	Modelo de hipertensión transgénica.....	16
1.1.6.5	Modelo de Goldblatt.....	16
1.1.6.6	Modelo de BHR.....	17
1.1.6.7	Modelo de WFR.....	17
1.2	Óxido nítrico (NO) y sustancias afines.....	18
1.2.1	Definición y propiedades del NO.....	18
1.2.2	Biosíntesis del NO e isoformas de la NOS.....	19
1.2.3	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).....	23
1.2.4	Mecanismos de liberación del NO.....	23
1.2.4.1	Liberación Constitutiva.....	23
1.2.4.2	Liberación Inducible.....	25
1.2.4.3	Otros mecanismos de liberación de NO.....	25
1.2.5	Inhibidores inespecíficos de la NOS.....	25

1.2.5.1	Inhibidores exógenos	26
1.2.5.2	Inhibidores endógenos	26
1.2.6	Inhibidores específicos de la NOS	26
1.2.7	Mecanismos de acción del NO	27
1.2.8	Funciones fisiológicas y fisiopatológicas del NO	28
1.2.9	Óxido nítrico e hipertensión arterial	31
1.2.10	Aplicaciones del NO en futuras terapias	33
1.3	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)	34
1.3.1	Aspectos fisiológicos	34
1.3.2	Renina inactiva (prorenina) y renina.....	35
1.3.3	Angiotensinógeno	35
1.3.4	Angiotensina I.....	36
1.3.5	Enzima convertidora de angiotensina (ECA)	36
1.3.6	Angiotensina II.....	37
1.3.7	Acciones de la Angiotensina II.....	39
1.3.8	Aldosterona	41
1.4	Estrés oxidativo (EO)	41
1.4.1	Especies reactivas de oxígeno (EROs)	41
1.4.2	Mecanismos de defensa antioxidantes.....	45
1.4.3	Enzimas antioxidantes.....	45
1.4.4	Sustancias antioxidantes no enzimáticas (vitaminas y minerales).....	46
1.4.5	Otros antioxidantes	47
1.4.6	Estrés oxidativo e HTA.....	47
1.5	Flavonoides	50
1.5.1	Estructura química y clasificación	51
1.5.2	Distribución, ingesta y métodos de separación	54
1.5.3	Biodisponibilidad, absorción-metabolismo y eliminación	58
1.5.4	Efectos de los flavonoides	63
1.5.5	Limitaciones de los flavonoides.....	90
1.5.6	Flavonoides estudiados	91
1.5.6.1	Extractos vegetales ricos en flavonoides.....	93

1.5.6.2 Flavonoides de alta pureza.....	94
2 Objetivos.....	97
3 Materiales y métodos.....	99
3.1 Animales.....	99
3.2 Tratamientos suministrados	99
3.3 Grupos experimentales.....	102
3.4 Protocolos experimentales	103
3.4.1 Estudios metabólicos y obtención de muestras.....	103
3.4.1.1 Parámetros metabólicos.....	104
3.4.1.2 Medida de la presión arterial	105
3.4.2 Estudio de la reactividad vascular en anillos aórticos de rata	106
3.4.2.1 Extracción de aorta torácica	106
3.4.2.2 Proceso experimental.....	107
3.4.3 Compuestos químicos	110
3.4.4 Medidas analíticas.....	110
3.4.4.1 Determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)	110
3.4.4.2 Determinación de la excreción de nitritos de orina	111
3.4.4.3 Determinación de la concentración de proteínas	112
3.4.4.4 Estudio histopatológico	113
3.5 Métodos estadísticos	116
4 Resultados.....	119
4.1 Diagnóstico de HTA.....	119
4.2 Efecto de los flavonoides sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca.....	121
4.3 Efecto de los flavonoides sobre los parámetros metabólicos	126
4.4 Efecto de los flavonoides en las respuestas vasculares de la aorta torácica	133
4.5 Evaluación del Estrés oxidativo.....	148
4.6 Nitritos y proteínas	153

4.7	Histología	158
4.7.1	Resultados del análisis histológico del grupo L-NAME.....	160
4.7.2	Resultados del análisis histológico de los grupos SHR de seis y doce semanas	164
4.8	Cálculo de los factores empleados	169
4.9	Eficacia global de los parámetros estudiados.....	181
5	Discusión.....	189
5.1	Justificación de los modelos utilizados	189
5.2	Justificación de los parámetros fisiológicos estudiados en estos modelos.	191
5.3	Evaluación de los efectos obtenidos sobre los distintos parámetros fisiológicos por el uso de los extractos de flavonoides estudiados.....	192
5.3.1	Presión arterial y frecuencia cardíaca	193
5.3.2	Parámetros metabólicos	199
5.3.3	Reactividad vascular	204
5.3.4	Estrés oxidativo	215
5.3.5	Nitritos y proteínas.....	218
5.3.6	Histología.....	220
6	Conclusiones	223
6.1	Conclusiones generales.....	223
7	Bibliografía	225
8	Anexos	249
8.1	Anexo 1: Participación en congresos y jornadas de investigación	249

1.1 Hipertensión arterial (HTA)

1.1.1 Antecedentes y definición

La hipertensión arterial (HTA), se define como el incremento sostenido de las cifras de presión arterial (PA). Este hecho determina un aumento del riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares (Coca Payeras, 2001) y surge como un complejo rasgo cuantitativo que se ve afectado por diferentes combinaciones de factores genéticos y ambientales (Sukor, 2011).

La hipertensión es un importante factor de riesgo para la enfermedad coronaria, la insuficiencia cardíaca congestiva, el accidente cerebrovascular y la enfermedad renal (Hermansen, 2000) y son la primera causa de morbilidad en los países industrializados (Sierra Benito and Coca Payeras, 2005).

El séptimo informe del Joint National Committee sobre “Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial” (JNC 7, 2004) ha definido como hipertensión en la población adulta cuando se detectan cifras mantenidas de presión arterial sistólica (PAS) por encima o iguales a 140 mmHg y de presión arterial diastólica (PAD) iguales o superiores a 90 mmHg. Además, se clasifica como pre-hipertensión las presiones entre 120 mmHg / 80 mmHg y 139 mmHg / 89 mmHg, que sirven para identificar personas con alto riesgo de desarrollar hipertensión. En la fase de pre-hipertensión es donde se deben revertir los hábitos dietéticos y físicos, a través de modificaciones en el estilo de vida, para prevenir el riesgo de hipertensión.

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos de 18 años o más

Clasificación PA	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Normal	<120	<80
Pre-hipertensión	120-139	80-89
Hipertensión – Estadio 1	140-159	90-99
Hipertensión – Estadio 2	≥ 160	≥ 100

La HTA es una enfermedad de escaso control en la mayoría de los países y existen diferencias en las cifras para diagnosticar al hipertenso, como se puede ver en la tabla siguiente (adaptada de (Sellén Crombet, 2008):

Tabla 2. Control de la HTA en el mundo

< 140 – 90 mmHg		< 160 - 95 mmHg	
País	%	País	%
Cuba (*)	32,0	Israel	32,0
Francia	33,0	Finlandia	23,5
Estados Unidos	29,5	Alemania	22,5
Bélgica	25,0	España	20,0
Canadá	16,0	Australia	19,0
Italia	9,0	Escocia	15,5
Inglaterra	6,0		

(*) Encuesta nacional de factores de riesgo, 2002

En el mundo, es una enfermedad común que afecta entre el 15 y 20% de las personas mayores de 40 años, una proporción que aumenta con la edad y varía en diferentes grupos étnicos/raciales (Blann et al., 2003).

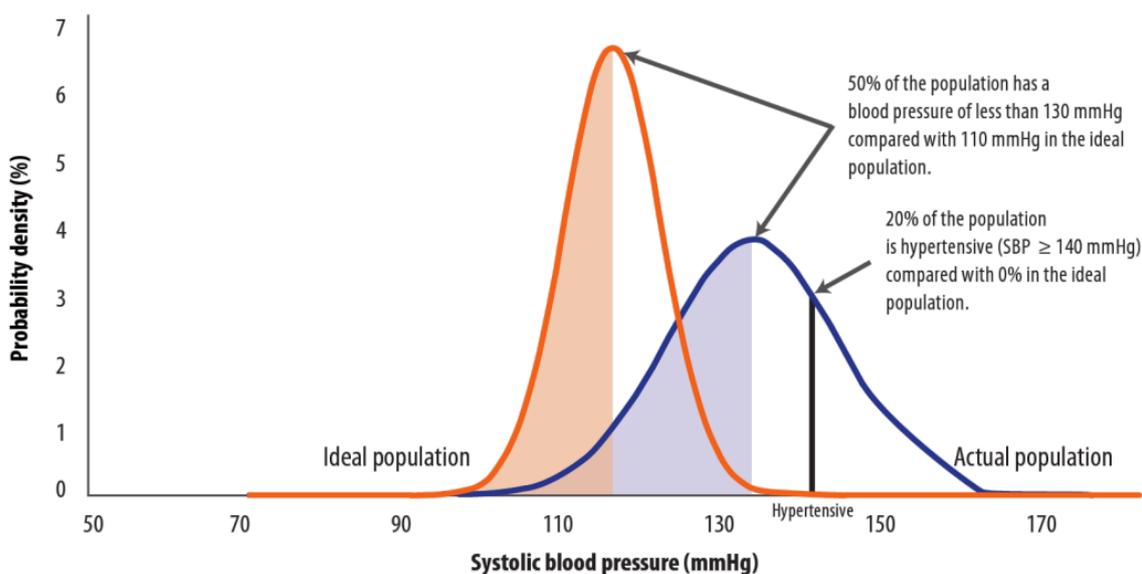


Figura 1. Distribución de población observada de la presión sanguínea sistólica en comparación con la distribución ideal de población (adaptado de (WHO, 2009))

Se prevé que para el año 2025, el 29,2% de la población adulta en todo el mundo será hipertensa; sobre 1,56 billones de personas (Kaplan, 2007).

La prevalencia en España en adultos (mayores de 18 años) es aproximadamente un 35%, llegando al 40% en edades medias y al 68% en los mayores de 60 años, y afecta a unos diez millones de sujetos adultos (Marín et al., 2005). A pesar de los importantes avances conseguidos en su diagnóstico y tratamiento, únicamente se consigue el control tras el tratamiento en un 29% de los pacientes (Banegas et al., 1998).

Prevención y tratamiento de la HTA

La prevención de la HTA y el control de la PA en pacientes con hipertensión son necesarios para la reducción de la morbilidad y la mortalidad cardiovascular. Las modificaciones del estilo de vida son una de las herramientas más importantes para la disminución efectiva de la PA (Hermansen, 2000), como las recomendadas en el séptimo informe del *Joint National Committee* (JNC 7, 2004) para prevenir la hipertensión para prevenir la hipertensión:

- Una actividad física moderada
- La reducción de sodio
- Reducir el consumo de alcohol
- Suplementos dietéticos de potasio y calcio, ya que la mayoría de estudios observacionales y epidemiológicos han demostrado que un incremento en la ingesta de calcio y potasio están asociados con una menor prevalencia de la hipertensión (Hermansen, 2000)

La modificación de estilos de vida reduce la PA, aumenta la eficacia de los tratamientos antihipertensivos y disminuye el riesgo cardiovascular (“Hipertensión arterial sistémica - Monografias.com,” n.d.). La opinión mayoritaria que tienen los autores sobre estas medidas no farmacológicas, es que han de constituir la base del tratamiento, sin perjuicio del uso concomitante de fármacos hipotensores. El efecto hipotensor de dichas medidas será proporcional al grado de adherencia a las mismas por parte del paciente hipertenso (Molina et al., 2006).

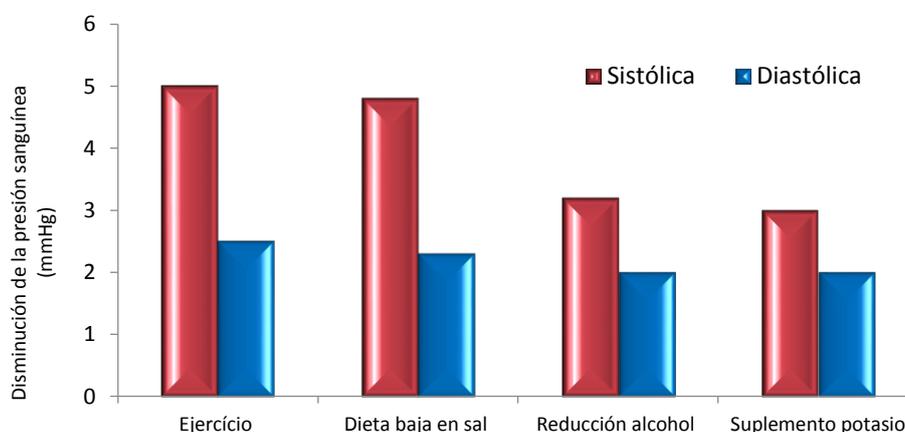


Figura 2. Disminución estimada de la presión sanguínea mediante acciones no-farmacológicas sobre la hipertensión (adaptado de (Messerli et al., 2007))

Por lo que se refiere al tratamiento farmacológico de la HTA, hay que decir que su objetivo principal es la reducción del riesgo de complicaciones cardiovasculares y renales del paciente hipertenso, y no sólo el descenso de la PA (Molina et al., 2006). Entre las principales clases de fármacos antihipertensivos manejados en la actualidad, (Psaty et al., 2003) se citan los siguientes: diuréticos, bloqueantes betaadrenérgicos, calcioantagonistas, inhibidores de la angiotensina (IECA) y antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARAII),

disponiéndose asimismo de bloqueantes alfa-adrenérgicos o alfabloqueantes, de fármacos de acción central y de vasodilatadores arteriales directos y, en un futuro, de inhibidores de renina plasmática. También hay que decir que se puede precisar de una terapia combinada de fármacos con el fin de normalizar la PA (Frank, 2008).

Serán las condiciones clínicas asociadas al paciente hipertenso, las que deberán indicar el tratamiento adecuado. Por ejemplo, en la angina previa, infarto de miocardio reciente o insuficiencia cardíaca, están indicados los IECA, así como en diabéticos junto a los ARA II, en enfermedad renal crónica sin diabetes estarán indicados los IECA igualmente, y los IECA e indapamida en ictus previos (Molina et al., 2006).

En España, en los últimos años, ha habido avances importantes en el conocimiento, tratamiento y control de la HTA, pero la realidad es que el nivel de control y tratamiento continúa siendo mejorable. Esta situación está determinada por una falta de detección de la enfermedad, fallos en la adecuación del tratamiento establecido y la baja adherencia al tratamiento (Ortiz Marrón et al., 2011).

Asimismo, con el progresivo envejecimiento de la población observado durante los últimos años y el previsible aumento en las próximas décadas, hacen que la HTA se convierta en un problema sanitario de gran impacto en cuanto a coste y morbimortalidad cardiovascular (Sierra Benito and Coca Payeras, 2005).

1.1.2 Tipos de hipertensión

Según su etiología, la HTA se divide en primaria, esencial o idiopática, y secundaria.

Hipertensión arterial esencial

La **hipertensión arterial (HTA) esencial, primaria o idiopática** representa más del 95% de los casos y parece ser causada por una compleja interacción entre la predisposición genética y los factores ambientales. La predisposición a la hipertensión esencial es poligénica en su origen y encuentra un gran desarrollo cuando se combina con los factores ambientales (Dosh, 2001). Aunque a menudo se indica que no se conocen las causas de la hipertensión esencial, es sólo parcialmente cierto, porque se tiene poca información sobre las variaciones o expresiones genéticas, así como de los fenotipos intermedios que regulan las causas de una presión alta (Carretero and Oparil, 2000).

La génesis de la HTA esencial es probablemente multifactorial. Entre los factores alterados más importantes se encuentran: obesidad, homeostasis de sodio, sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS), la estructura y reactividad del músculo liso vascular, factores genéticos, la programación fetal (Raj, 2011), la resistencia a la insulina (Lima et al., 2009), la activación del sistema nervioso simpático (SNS) (Grassi, 2010), los niveles séricos del

ácido úrico (Alper et al., 2005), bajos niveles de actividad física, el estrés, el consumo elevado de alcohol, y un bajo nivel de potasio, calcio y magnesio en la dieta (Dosh, 2001).

También, se reconoce que la hipertensión puede ser la consecuencia de defectos en la microcirculación y/o función del transporte tubular renal, que comprometen la capacidad normal del riñón para mantener el equilibrio de sodio en condiciones normales de PA (Navar et al., 1998).

La HTA esencial es la forma más común de hipertensión, que afecta al 25% de los adultos y aumenta significativamente el riesgo de infarto miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva e insuficiencia renal (Alper et al., 2005).

No existe ningún medio de curar la HTA primaria esencial, pero el tratamiento adecuado puede modificar su evolución. Existen una serie de medidas generales como el reposo, la disminución del estrés, el adelgazamiento, la restricción de sodio en la dieta y la corrección de la hiperlipoproteinemia o la sedación; aunque casi siempre es necesario el empleo de antihipertensivos.

Hipertensión arterial secundaria

La hipertensión arterial secundaria es un tipo de hipertensión con una causa subyacente, potencialmente corregible (Viera and Neutze, 2010). Las causas de esta hipertensión incluyen las enfermedades del parénquima renal, renovasculares (estenosis de la arteria renal), coartación de la aorta, síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo primario, feocromocitoma, hipertiroidismo e hiperparatiroidismo (Akpunonu et al., 1996).

La detección de los mecanismos que originan la HTA secundaria es de suma importancia, ya que proporciona la oportunidad de convertir una enfermedad incurable en potencialmente curable (Sukor, 2011), que puede ser manejada o incluso controlada con medicamentos (Akpunonu et al., 1996).

1.1.3 Patogenia de la HTA

La presión arterial sistémica media (PAm) está determinada por el gasto cardíaco (GC) y la resistencia vascular periférica (RP), y responde básicamente a la ecuación:

$$PAm = GC \times RP$$

El GC depende del volumen sistólico y de la frecuencia cardíaca (FC) y a su vez, el volumen sistólico varía según la contractilidad cardíaca y el retorno venoso. Por su parte, las RP están reguladas por factores nerviosos, humorales y locales (Alcasena, M S et al., 1998).

Por otra parte, los cambios en el GC y en las RP dependen de la interacción de diversos sistemas, que actúan interrelacionados entre sí y que en condiciones normales están en equilibrio para mantener unos niveles ajustados de PA. Mientras que unos sistemas tienden a elevar los niveles

de PA - (actividad adrenérgica, SRAA, prostaglandinas vasoconstrictoras y endotelinas) - otros tienden a disminuirlos - (óxido nítrico, prostaglandinas vasodilatadoras, bradikininas y factor atrial natriurético) (Maicas Bellido, C et al., 2003). El desequilibrio entre estos sistemas, por aumento de los que tienden a elevar los niveles de PA o por disminución de los que tienden a reducir la PA, desencadena una serie de cambios adaptativos funcionales y posteriormente, estructurales que perpetúan y acentúan las alteraciones funcionales iniciales. Estos cambios se producen a nivel de:

- **Ventrículo izquierdo**, mediante el remodelado y posterior hipertrofia ventricular izquierda
- **Arterias de resistencia** con remodelado de sus paredes, que amplifica la resistencia vascular periférica
- **Microvascular**, con disminución de la superficie capilar
- **Aorta y grandes vasos**, reduciendo la elasticidad que contribuirá a incrementar más aún el componente sistólico (Maicas Bellido, C et al., 2003).

En la HTA esencial, la mayoría de estudios sobre los cambios vasculares se han centrado en las arterias de resistencia, debido a que estos vasos constituyen el principal punto de generación de resistencia vascular, son los que controlan el flujo y regulan la PA (Bund and Lee, 2003). La desregulación del tono vascular de las arterias puede contribuir a la PA alta (Lüscher et al., 1992).

Por otra parte, las anomalías de las células del músculo liso o endoteliales, las moléculas de adhesión y la matriz extracelular en la vasculatura pueden contribuir a los cambios estructurales, mecánicos o funcionales, que reducen el tamaño de la luz de las pequeñas arterias y arteriolas, aumentando así la resistencia vascular y por tanto, la PA (Intengan and Schiffrin, 2000).

La hipertrofia de la capa media de las arterias grandes es una respuesta normal al incremento sostenido de la PA. Además, numerosos estudios han demostrado que la Ang II puede inducir el engrosamiento de la capa media y aumentar el área transversal, independientemente de la elevación de la PA (Rey and Pagano, 2002).

En modelos animales de HTA, tales como la rata espontáneamente hipertensa (SHR) se han observado cambios similares en la estructura de la pared de las arterias (Heagerty et al., 1993).

La HTA también está asociada con la disfunción endotelial (DE) que es atribuible al estrés oxidativo (EO) y a un estado proinflamatorio.

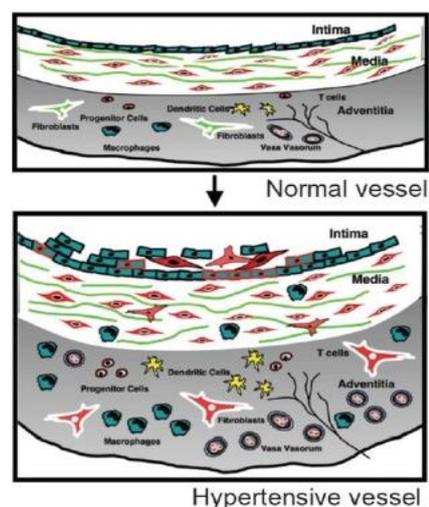


Figura 3. Vaso normal e hipertensivo (adaptado de (Stenmark et al., 2012))

Bajo estas condiciones, la expresión aumentada de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) podría conducir a un aumento de la producción de prostanoïdes vasoconstrictores y especies reactivas de oxígeno (EROs) que reducen la biodisponibilidad de NO derivado del endotelio (Widlansky et al., 2003).

Un incremento en la producción de citoquinas y otros mediadores de la inflamación, se ha asociado con la disfunción endotelial (DE). Además, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, la cual es considerada una enfermedad crónica inflamatoria (Sanz-Rosa et al., 2005).

Respecto a otros factores que afectan a la patogenia de la HTA, existen indicios de que la excesiva retención de sodio (Na^+) participa en su desarrollo. El sodio (Na^+) intracelular facilita la entrada de calcio (Ca^{2+}), con el consiguiente aumento de contractilidad en el músculo liso y aumento de la RP.

La retención de Na^+ podría estar relacionada con:

- Una disminución de filtración por reducción de nefronas, numérica o funcional
- Una inadecuada respuesta natriurética a la elevación de PA
- Inhibición de la bomba de Na^+ , es decir, a un aumento del Na^+ intracelular por trastorno de transporte celular
- Una inadecuada respuesta a PNA (péptido natriurético auricular) (Alcasena, M S et al., 1998)

Por otra parte, hay numerosos estudios que demuestran que las alteraciones funcionales del SNS y el SRAA en situaciones de HTA, lo que sugiere un papel importante de estos dos grandes sistemas vasoactivos en la fisiopatología de la hipertensión esencial (Pintérová et al., 2011). Se ha comprobado que la administración de cualquier inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) o antagonista del receptor tipo 1 de la Ang II (AT_1) es capaz de mejorar la DE y el remodelado vascular tanto en la hipertensión clínica como en la experimental. Además, la Ang II, activa el factor de transcripción NF- κ B, el cual participa en la regulación de numerosos factores inflamatorios como citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Sanz-Rosa et al., 2005). También, se ha comprobado que la disminución de estrógenos parece estar implicada en la HTA de la mujer postmenopáusia (Alcasena, M S et al., 1998).

Se han descrito otros mecanismos que podrían estar implicados en la patogenia de la HTA, siendo su evidencia menos contundente. Entre ellas, se encuentra la leptina y los péptidos vasoactivos, que a su vez se clasifican en péptidos natriuréticos, bradicininas, otros péptidos vasoactivos (tales como adenosinas, vasopresina, serotonina) y prostaglandinas (Maicas Bellido, C et al., 2003).

Respecto a la reducción de la biodisponibilidad del NO endotelial

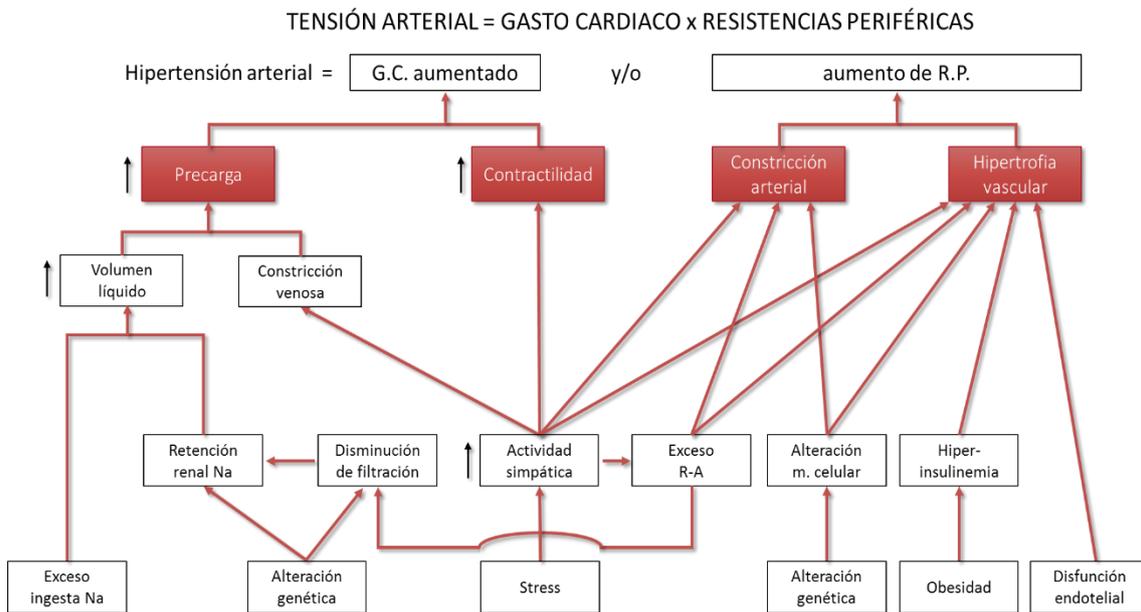


Figura 4. Factores fisiopatológicos de la HTA (GC: gasto cardíaco, R-A: renina-angiotensina, RP: Resistencias periféricas) (adaptado de (Alcasena, M S et al., 1998))

1.1.4 Sistema cardiovascular y la HTA

El sistema circulatorio proporciona oxígeno y nutrientes a los tejidos y elimina CO₂ y otros desechos metabólicos de los tejidos en un proceso llevado a cabo a dos niveles: macrovascular y microvascular.

La macrovasculatura se compone de arterias y venas, vasos de gran capacidad encargados de transportar la sangre rápidamente hacia o desde los órganos. La microvasculatura se compone de tres tipos de vasos pequeños: arteriolas, capilares y vénulas. Estos microvasos forman una red que regula la perfusión local de la sangre y llevan a cabo el intercambio entre la sangre y los tejidos (Yuan and Rigor, 2010).

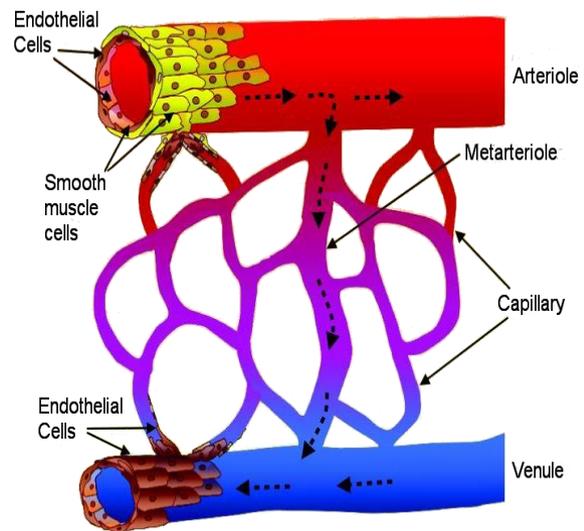


Figura 5. Arquitectura del lecho microvascular (adaptado de (Yuan and Rigor, 2010))

1.1.4.1 Estructura de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos constan de tres túnicas concéntricas: **adventicia**, **media** e **íntima** o **endotelio** (Hammersen and Hammersen, 1984). Cada capa exhibe unas características histológicas, bioquímicas y funcionales específicas, contribuyendo de manera única al mantenimiento de la homeostasis vascular y a la regulación de la respuesta vascular al estrés o daño (Stenmark et al., 2006).

El límite entre la íntima y la media está demarcado por la lámina elástica interna, y entre la media y adventicia por la lámina elástica externa (Rey and Pagano, 2002). Debido a que la lesión arterial se inicia generalmente en la interfase con la sangre circulante, la mayoría de los mecanismos implicados en la lesión inducida por las respuestas arteriales se han centrado en la capa más interna o íntima (Michel et al., 2007).

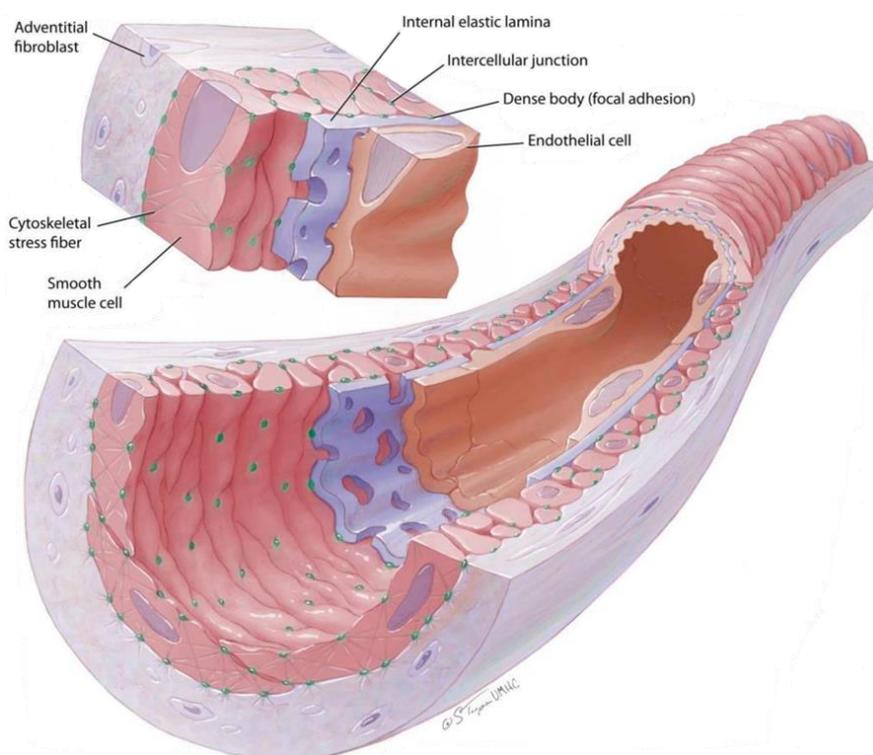


Figura 6. Representación de una arteriola con tono (adaptado de (Martinez-Lemus, 2012))

La túnica íntima o endotelio consta de una sola capa de células endoteliales que recubre la luz del vaso y la lámina elástica interna (Gutterman, 1999). La capa endotelial está en contacto directo con la sangre circulante y permite el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos a través de un proceso altamente regulado o intercambio capilar.

Las células endoteliales son de extrema importancia en el control del tono vascular a través de la producción y liberación de factores vasoactivos, que ejercen su acción sobre las células vecinas del músculo liso (Martinez-Lemus, 2012).

1.1.4.2 Endotelio y tono vascular

La historia más reciente del endotelio vascular comenzó en 1980, cuando *Furchgott y Zawadzki* describieron el papel crucial del endotelio en la respuesta vasodilatadora producida por acetilcolina (ACh). Unos años después, el factor relajante del endotelio (EDRF) se identificó como NO (Vapaatalo et al., 2000).

Funciones

Además de barrera protectora, el endotelio también regula el diámetro del vaso, inhibe la formación de coágulos de sangre, afecta a la multiplicación de las células implicadas en la formación de la placa (Lüscher, 2000), mantiene la homeostasis vascular normal mediante la producción de factores paracrinos, que regulan el tono vascular, la trombosis, el crecimiento de la íntima y la entrada de células inflamatorias en la pared vascular (Widlansky et al., 2003).

Factores vasoactivos

Bajo condiciones fisiológicas, hay un equilibrio entre factores de relajación y liberación, liberando las células endoteliales estos factores que modulan el tono del músculo liso vascular. Así, la vasodilatación dependiente del endotelio está regulada principalmente por el NO, y también por el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), prostaciclina y bradicinina.

Entre los factores de contracción derivados del endotelio se incluyen prostanoides vasoconstrictores, Ang II, ERO (O_2^-), endotelina-1 (ET-1) (Puđu et al., 2000) y tromboxano A_2 (TXA_2) (Vapaatalo et al., 2000).

Patologías

El equilibrio entre los factores vasoactivos puede ser alterado en las enfermedades cardiovasculares como hipertensión, aterosclerosis, diabetes y otras condiciones, lo que contribuye a la progresión de los daños vasculares y de los órganos diana. En particular, la DE que conduce a una disminución de la biodisponibilidad de NO, deteriora la vasodilatación dependiente del endotelio en pacientes con hipertensión esencial y también puede ser un factor determinante para el desarrollo prematuro de la aterosclerosis (Puđu et al., 2000).

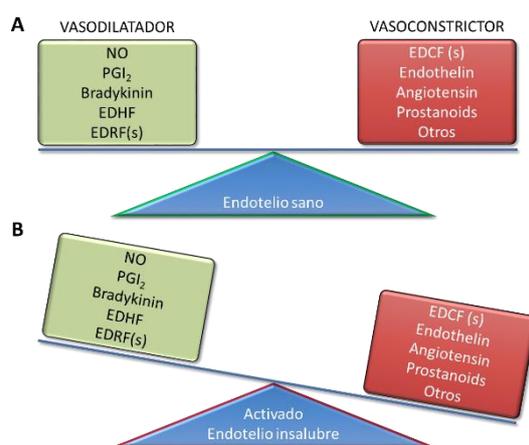


Figura 7. Endotelio sano (A) frente a endotelio insalubre (B) (adaptado de (Triggle et al., 2012))

Por tanto, se trata de un órgano diana importante en la protección cardiovascular, la cual incluye la prevención de la adhesión de células sanguíneas circulantes, el mantenimiento de la vasculatura en un estado dilatado e inhibición de la proliferación y migración del músculo liso vascular (Enseleit et al., 2003).

1.1.4.3 Disfunción endotelial (DE)

El término "disfunción endotelial" surgió a mediados de los ochenta, tras el gran avance por Furchgott y Zawadzki quienes descubrieron que la ACh requiere de la presencia de las células endoteliales vasculares para relajar el músculo liso subyacente (Félétou and Vanhoutte, 2006).

La disfunción endotelial (DE) se caracteriza principalmente por la alteración de la relajación dependiente del endotelio y se define como un desequilibrio de factores vasoactivos derivados del endotelio que conducen a la vasoconstricción y cambios estructurales en la pared vascular. Las alteraciones en los factores vasoactivos características de la DE incluyen: la disminución de la biodisponibilidad de NO y, por tanto, un predominio de sustancias vasoconstrictoras, como Ang II, prostanoïdes vasoconstrictores y ET-1, de ERO y de citoquinas y otros mediadores de inflamación (Sanz-Rosa et al., 2005).

La Ang II puede deteriorar la función endotelial al menos por dos mecanismos:

- 1) Puede reducir la relajación dependiente del endotelio por un incremento en la producción de ERO. Esto hecho es crucial, porque en pacientes con hipertensión esencial, el estrés oxidativo causa una reducción en la disponibilidad de NO y en consecuencia, reduce la vasodilatación a ACh.
- 2) Activa la síntesis de ET-1 (Ghiadoni et al., 2000).

Se ha comprobado que los inhibidores de la ECA tienen un efecto beneficioso sobre la función endotelial que puede ser debidos a un restablecimiento del equilibrio entre vasoconstricción/proliferación y vasodilatación/ antiproliferación de la pared vascular (Enseleit et al., 2003).

El término DE también se ha utilizado para referirse a varias condiciones patológicas, incluyendo una alteración de las propiedades anticoagulantes y antiinflamatorias del endotelio, el deterioro de la modulación del crecimiento vascular y la desregulación del remodelado vascular (Cai and Harrison, 2000), alteración de la respuesta vasoconstrictora, adhesión de plaquetas y monocitos, y la proliferación y migración de células del músculo liso vascular (Enseleit et al., 2003).

La DE no sólo se ha asociado con hipertensión o aterosclerosis, sino también con procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como envejecimiento, insuficiencia cardíaca y renal, síndrome coronario, la microalbuminuria, la diálisis, trombosis, coagulación intravascular, preeclampsia, diabetes tipo I y II, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, hiperglucemia, obesidad, lipemia postprandial, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia, elevación asimétrica en los niveles plasmáticos de dimetilarginina, inflamación, infecciones, sepsis, artritis reumatoide, la periodontitis, trauma, trasplante, bajo peso al nacer, postmenopausia en las mujeres, el estrés

mental, síndrome de apnea del sueño, el tabaquismo, tolerancia a los nitratos y glucocorticoides (Félétoú and Vanhoutte, 2006).

1.1.4.4 Cambios estructurales en el sistema vascular

La hipertensión está asociada con un incremento de la resistencia vascular periférica al flujo sanguíneo, la cual es generada por una reducción del diámetro de la luz del vaso (Intengan and Schiffrin, 2000). Esto hace que haya modificaciones en la estructura vascular que incluyen el remodelado, la rarefacción e incluso la angiogénesis.

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

- Hipertrófico, es el que presentan las grandes arterias y disminuye el diámetro de la luz asociado a un incremento en la masa de la pared del vaso.
- Eutrófico, disminuye el diámetro de la luz sin cambios en la masa de la pared del vaso y predomina en los vasos de resistencia de menor calibre durante las etapas iniciales de la hipertensión por migración y reordenamiento celular (Maicas Bellido, C et al., 2003), donde el SRAA puede jugar un papel importante.

La rarefacción consiste en la pérdida de hasta el 50% de los vasos de la microvasculatura y puede deberse tanto a factores hemodinámicos como a la acción o depleción de factores tróficos o de crecimiento locales, tales como Ang II, insulina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas y otros (Maicas Bellido, C et al., 2003). La Ang II se cree que desempeña un papel directo en el desarrollo de la hipertrofia vascular y en la fibrosis, y en consecuencia, en el engrosamiento vascular (Mifune et al., 2000).

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

1.1.5 Modelos experimentales de HTA

A fin de comprender la fisiopatología de la hipertensión esencial, se han desarrollado muchos modelos de animales con formas genéticas o inducidas de hipertensión experimental. Estos modelos comparten muchas características comunes a la hipertensión humana y por tanto, permiten un análisis fisiopatológico de los factores responsables de su desarrollo y mantenimiento (Pintérová et al., 2011), pudiendo ofrecer información útil para comprender la

causa y progresión del estado de la enfermedad, así como de posibles intervenciones terapéuticas (Dornas and Silva, 2011).

1.1.5.1 Modelo basado en hipertensión L-NAME

En este tipo de HTA se produce una disminución en la síntesis de NO por las células del endotelio vascular (Henrion et al., 1997) debido a la inhibición crónica o aguda de la óxido nítrico sintasa (NOS) por el inhibidor no selectivo L-NAME (L-NG-Nitroarginina metil éster) causando un incremento de la PA (Biancardi et al., 2007) y del peso del corazón e importantes **alteraciones de la función renal** (Doggrell and Brown, 1998). Entre ellas, se encuentra la vasoconstricción renal, reducción de la tasa de filtración glomerular (TGF), una débil respuesta excretoria a cambios en la presión de perfusión renal (PPR) (el llamado mecanismo de diuresis y natriuresis de presión (PDN) (Fortepiani et al., 1999b), mayor retención de sodio y agua de reabsorción renal y un aumento de la proteinuria (García-Estañ et al., 2006).

Hay un gran número de artículos que indican que la HTA inducida por la administración crónica de L-NAME en ratas está asociada con un incremento de endotelina en la excreción urinaria, pero no con un incremento de los niveles de endotelina plasmática, lo que sugiere que elevadas concentraciones intrarenales de ET pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la disfunción renal asociada con la deficiencia crónica de NO de este modelo (Fortepiani et al., 1999). La ET podría incrementar la PA por vasoconstricción directa o también por aumento del EO (Ortiz et al., 2001).

Respecto a los mecanismos que participan en las alteraciones renales en ratas con HTA inducida por L-NAME no están completamente establecidos pero, se ha demostrado que el SRAA participa de manera importante (García-Estañ et al., 2006) en la elevada PA y en las alteraciones renales y sistémicas inducidas por la reducida disponibilidad de NO. Esta participación claramente es debida a la acción de la Ang II a través de los receptores AT1 (Fortepiani et al., 1999b) lo cual está apoyado por experimentos que demuestran que el bloqueo crónico de los receptores AT1 de la Ang II evitan la vasoconstricción renal y de manera importante, se disminuyen los elevados niveles de PA aunque no se corrige completamente el reducido flujo sanguíneo papilar característico de este modelo (Ortiz et al., 1998).

La HTA L-NAME puede ser revertida por los antagonistas de calcio (posiblemente vía inhibición de la vasoconstricción inducida por Ang II) teniendo los antagonistas de tipo T un mayor efecto que los antagonistas de tipo L en la reducción de la resistencia preglomerular (Jover and Mimran, 2001), también por la inhibición de la ECA (Fortepiani et al., 1999b) o por un antagonista de los receptores α 1-adrenérgicos (prazosina) (Henrion et al., 1996). De entre los flavonoides, se ha demostrado que la quercetina inhibe notablemente el desarrollo de la HTA inducida por L-NAME (Duarte et al., 2002).

Por otro lado, Biancardi et al. (Biancardi et al., 2007), demostraron que la vasoconstricción por el tono simpático en respuesta a L-NAME juega un importante papel en la iniciación y el mantenimiento de la hipertensión. Una serie de estudios han probado que L-NAME atraviesa la

barrera sangre-cerebro cuando es administrado por vía oral pudiendo provocarse la activación simpática por la inhibición de la NOS en el cerebro (Lahera et al., 1997).

También existen **alteraciones funcionales** del endotelio y del músculo liso vascular de las arterias de conducción tales como la aorta (Küng et al., 1995). La administración crónica de L-NAME en la aorta de rata *in vitro* está relacionada con un cambio en la reactividad vascular de la aorta a los agentes constrictores, un incremento en la reactividad al vasodilatador NPS, una supresión de la vasodilatación inducida por ACh y una disminución en el contenido de GMPc (Henrion et al., 1996).

Esta hipertensión se asocia con una intensa vasoconstricción periférica y el consiguiente aumento de la resistencia vascular periférica (Dornas and Silva, 2011), que se ha relacionado con la elevación del EO y el aumento de señalización de calcio en las células del músculo liso (García-Estañ et al., 2006). Otras características son la disminución de la frecuencia cardíaca, cambios en la contractilidad miocárdica y alteraciones histológicas consistentes en una amplia área de fibrosis miocárdica, necrosis, incremento de los niveles de colágeno cardíacos (Sharma et al., 2010) y remodelado eutrófico de la arteria basilar (Moreau et al., 1997). En cuanto al gasto cardíaco, algunos estudios parecen indicar una reducción aún durante la inhibición crónica de la NOS. En relación con las anomalías cardíacas, se ha observado que el nivel de hipertrofia en este modelo es relativamente menor en comparación con otros modelos con similares niveles de PA (Dornas and Silva, 2011).

Por último hay que decir que la HTA inducida por L-NAME es de particular interés debido a que permite estudiar *in vivo* los efectos de una deficiencia prolongada de NO sirviendo la disfunción vascular asociada a este tipo de hipertensión, como modelo de la enfermedad vascular (Küng et al., 1995). Además, también resulta útil para estudiar el desarrollo y tratamiento de las lesiones renales siendo similares a las que se producen en la HTA humana (Jover and Mimran, 2001).

1.1.5.2 La rata SHR como modelo animal de hipertensión

El modelo más ampliamente usado de enfermedad cardiovascular es la rata SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) y su control normotenso Wistar-Kyoto (WKY). Las SHRs son descendientes del cruce de ratas Wistar con hipertensión espontánea de una colonia de Kyoto (Japón) (Doggrell and Brown, 1998). Las ratas SHR desarrollan genéticamente la hipertensión sin intervención fisiológica, farmacológica o quirúrgica. A las 6-8 semanas son pre-hipertensas e hipertensas entre las 12-14 semanas. Sin embargo, los factores ambientales pueden afectar al desarrollo de la hipertensión. Conforme avanza la hipertensión, desarrollan progresivamente (entre 6 y 24 meses de edad) alteraciones estructurales en el corazón, que están asociados con la hipertrofia cardíaca progresiva (Dornas and Silva, 2011).

En las SHR, la presión arterial media es 180-200 mmHg, en comparación con 115-130 mmHg en ratas normotensas y se mantiene a estos altos niveles después de 12 semanas de edad (Pintérová et al., 2011).

Se piensa que el mecanismo por el cual estas ratas desarrollan hipertensión arterial es a través de la actividad del SRAA central, pero también por las alteraciones del sistema simpático y del sistema del NO (Olano, Daniel et al., 2012).

Mecanismo de desarrollo de HTA

Estudios realizados *in vivo* han mostrado que en las primeras fases de la hipertensión, la SHR presenta un incremento del GC sin cambios en la resistencia periférica. Cuando progresa a una situación de hipertensión establecida, el gasto cardíaco retorna a valores normales (Dornas and Silva, 2011) y los vasos sanguíneos hipertrófiados producen un aumento de la resistencia periférica total (Doggrell and Brown, 1998).

Algunas características del desarrollo de la HTA en la SHR son:

- **Sistema nervioso**, estas ratas están caracterizadas por una elevada actividad del SNS (Judy and Farrell, 1979a), demostrando hiperactividad en comparación con las ratas WKY.
- **Capacidad oxidante**, cuando se compara el hígado de ratas SHR con respecto al de las ratas WKY, se observa que hay una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), aumento de los niveles hepáticos de glutatión total y aumento de las concentraciones plasmáticas y hepáticas de malondialdehído (Duarte et al., 2001). Además, la hipertensión en SHR se asocia con alteraciones en los perfiles de las enzimas antioxidantes de los glóbulos rojos de la sangre y el corazón (Yuan et al., 1996).
- **Arterias**, relajación y contracción, las ratas SHR de 3-4 semanas de edad ya presentan importantes cambios estructurales a nivel de las arterias mesentéricas, a pesar de que presentan niveles de presión arterial similares a las ratas WKY. Estos cambios incluyen un incremento del volumen de la capa media y del número de capas de células musculares lisas, y son los primeros cambios que contribuyen al desarrollo de la HTA en SHR (Dickhout and Lee, 1997).

Los componentes de la pared de las arterias mesentéricas endurecen con la edad en las ratas SHR. Este endurecimiento se asocia con un aumento de la relación colágeno/ elastina y la sobre-regulación de $\alpha 5\beta_1$ y $\alpha v\beta_3$ integrinas (Intengan et al., 1999).

Estudios recientes sugieren que parte de la vasoconstricción característica de la aorta torácica de las SHR es debida a la acción del H_2O_2 , puesto que la catalasa acentúa la vasorelajación (Ulker et al., 2003).

Canales

Varios estudios indican aumento de la actividad del canal de Ca en ratas hipertensas en comparación con normotensas. Además, los defectos en la función del canal de K pueden conducir a la vasoconstricción y por lo tanto, estas alteraciones pueden estar involucradas en la patogenia de la hipertensión (Pintérová et al., 2011).

Prolongados tratamientos antihipertensivos con losartán y captopril, disminuyen la disfunción endotelial en anillos aórticos SHR, no sólo mediante la mejora de las relajaciones dependientes de NO sino mediante la reducción de las contracciones en respuesta a un factor de contracción derivado del endotelio (Rodrigo et al., 1997).

1.1.6 Otros modelos animales de HTA

1.1.6.1 Modelo SHRSP

Las ratas espontáneamente hipertensas (SHRSP, *Spontaneously Hypertensive Stroke Prone*), propensas a accidentes cerebrovasculares, se desarrollan a partir de las ratas SHR con niveles más altos de PA y una fuerte tendencia a morir por accidente cerebrovascular. Este modelo se aplica a los estudios de derrame cerebral en los seres humanos (Dornas and Silva, 2011).

1.1.6.2 Modelo Doca-salt

Se ha demostrado que el mineralocorticoide acetato de desoxicorticosterona (DOCA) produce hipertensión en ratas teniendo lugar un incremento en la reabsorción de sal y agua, aumentando así el volumen sanguíneo y por tanto, la PA. También ocurre un aumento en la secreción de vasopresina dando lugar a retención de agua y vasoconstricción (Badyal, D K et al., 2003). Este modelo de hipertensión progresa rápidamente a hipertensión severa e hipertrofia y no es adecuado para el estudio de enfermedades crónicas. Por tanto, no es un muy modelo realista para muchos pacientes hipertensos (Dornas and Silva, 2011).

1.1.6.3 Modelo Dahl

Se trata de ratas que cuando se alimentan con una dieta normal en sal se convierten en hipertensas, lo que indica que éste es un modelo genético de hipertensión con la característica de sensibilidad a la sal (Dornas and Silva, 2011).

1.1.6.4 Modelo de hipertensión transgénica

Los modelos transgénicos de hipertensión pueden ser generados por la sobreexpresión de un gen específico. El representante de este tipo de hipertensión es la rata transgénica [TRG (mREN2)27], que fue desarrollada por Mullins (Dornas and Silva, 2011) y lleva el gen REN-2 de renina de ratón en su genoma expresándose en la glándula adrenal (Lahera et al., 2000). Estas ratas exhiben hipertensión severa por lo que se trata de un modelo interesante para estudiar el papel de la renina en la patogénesis de la hipertensión (Bader et al., 1992) aunque no se conoce si realmente el REN-2 causa HTA en el humano (Olano, Daniel et al., 2012).

1.1.6.5 Modelo de Goldblatt

Este modelo fue diseñado para valorar la enfermedad unilateral y bilateral observada en pacientes con afección renovascular. Tiene la ventaja de ser ideal para el estudio del papel del

riñón en la regulación a largo plazo de la PA y proporciona la base para el diagnóstico y tratamiento (Olano, Daniel et al., 2012).

Esta técnica fue introducida por Goldblatt y consiste en la constricción de una o ambas arterias renales mediante el uso de una pequeña pinza ajustable de Ag. Cuando arterias de la aorta o ambas arterias renales se estrechan, hay isquemia renal grave, ocasionando la activación de los sistemas SRAA y SNS, y también ocurre la elevación de la vasopresina en suero, dando lugar a un aumento de la presión sanguínea (Dornas and Silva, 2011).

En 1934, Goldblatt fue el primero en observar que la isquemia unilateral de un riñón provocaba hipertensión. Desde entonces la fisiopatología de la hipertensión vascular renal ha sido estudiada en modelos animales, considerando que los mecanismos de la hipertensión son similares a los que ocurren en humanos. El modelo clásico de 2 riñones y 1 clip (2K-1C) se considera análogo a la estenosis unilateral de la arteria renal en humanos, mientras que el modelo de 1 riñón y 1 clip (1K-1C) se considera que reproduce la situación de estenosis bilateral o estenosis unilateral en un riñón único.

1.1.6.6 Modelo de BHR

La cepa BHR (*Bordeline hypertensive rats*) es la primera generación descendiente de una rata hembra espontáneamente hipertensa y una rata macho WKY y ha sido ampliamente utilizada para estudios sobre el estrés de conducta debido a que es sensible a varios problemas ambientales, atribuibles a incrementos en la actividad del SNS y cambios en la estructura vascular periférica (Fuchs et al., 1998).

1.1.6.7 Modelo de WFR

Utiliza ratas Wistar obesas (WFR), derivadas del cruce entre ratas obesas Zucker y ratas WKY, que muestran persistente hiperinsulinemia e hipertensión después de 16 de semanas de edad, y puede ser un buen modelo para dilucidar la relación entre la hiperinsulinemia e hipertensión (Badyal, D K et al., 2003).

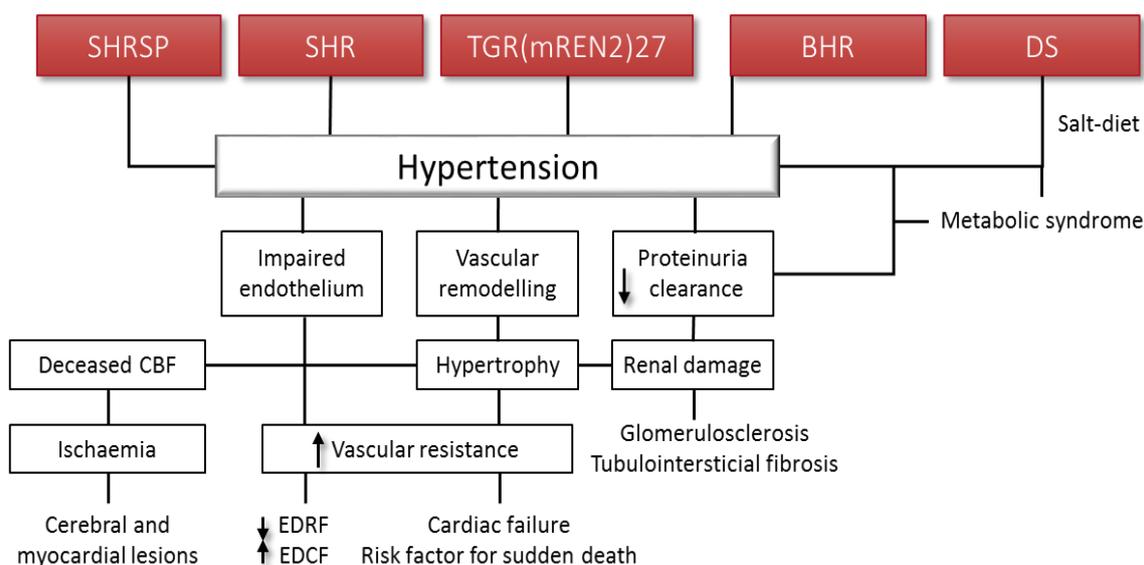


Figura 8. Deterioro de órganos diana en diferentes modelos genéticos experimentales de HTA (adaptado de (Dornas and Silva, 2011))

1.2 Óxido nítrico (NO) y sustancias afines

Como se comentó anteriormente, Furchgott y Zawadzki describieron que los efectos vasodilatadores de la ACh son mediados por un factor liberado por las células endoteliales, que produce la relajación del músculo liso y al que llamaron inicialmente factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y posteriormente identificado como NO (Atucha, N M et al., 1994).

En 1992, la revista Science distinguió al NO como “Molécula del Año”. Seis años después, el Premio Nobel de Medicina se otorgó a tres investigadores norteamericanos, los doctores Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro y Ferid Murad, por sus descubrimientos en relación al NO como una molécula de señalización en el sistema cardiovascular. El Dr. Salvador Moncada, también contribuyó de manera importante a este descubrimiento pero no fue incluido en el premio, dado que esta distinción se otorga como máximo a tres investigadores. Posteriormente en España, para reconocer sus contribuciones sobre el NO, se le concedió el Premio Príncipe de Asturias a la Investigación Científica y Técnica (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

1.2.1 Definición y propiedades del NO

El NO es una molécula pequeña y neutra que se difunde libremente (no se almacena) a través de la membrana celular. Así, puede alcanzar rápidamente a las moléculas con las que interactúa en el interior de la célula (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

Está formada por dos átomos, un átomo de oxígeno (O) y otro de nitrógeno (N) que se aparean para formar una molécula de NO, que contiene un electrón desapareado (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).



Figura 9. Estructuras de resonancia en la molécula de NO (Adaptado de (Centelles, J J et al., 2004))

La presencia del electrón desapareado permite al NO interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tal como el nitrógeno y el azufre que forman parte de las proteínas (nitrosación). También interactúa con átomos metálicos, como el hierro, el cual forma parte de las proteínas que se conocen como ferroproteínas o hemoproteínas, las cuales son fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas, como la producción de energía, el transporte y almacenamiento del oxígeno y la transducción de señales. Por otro lado, la combinación del NO con las formas reactivas del O₂ constituye el principal mecanismo mediante el cual el NO daña a las células (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).

1.2.2 Biosíntesis del NO e isoformas de la NOS

Las células sintetizan el NO a partir del aminoácido L-arginina, mediante dos reacciones sucesivas (que requieren NADPH y O₂) con formación del intermedio N^o-hidroxi-L-arginina (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

Durante esta reacción una molécula de L-Arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico, generándose una molécula de L-citrulina y una molécula de NO (Alfieri, 2003). El enzima encargado de la síntesis de NO es la sintasa de NO, también llamada NO sintasa (NOS, *nitric oxide synthase*) (Moncada, S et al., 1991).

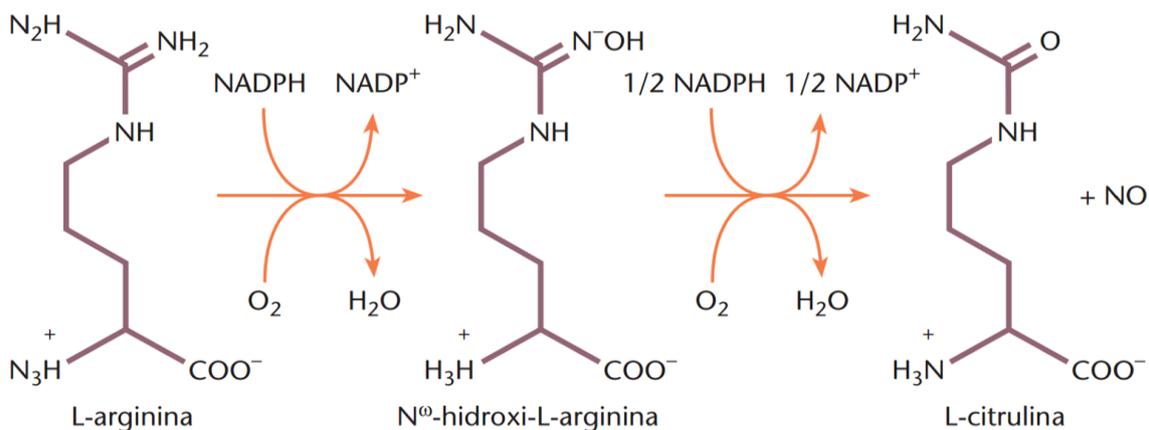


Figura 10. Reacción de la NO-sintasa que produce óxido nítrico y citrulina a partir de arginina (adaptado de (Centelles, J J et al., 2004))

La NOS es una hemoproteína que para su actividad, además de la L-arginina, requiere como co-sustratos oxígeno y nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Además, para que se lleve a cabo la reacción es necesaria la unión de varios cofactores al enzima, como flavín adenín dinucleótido (FAD), flavín mononucleótido (FMN) y 5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterina (BH₄) y Fe protoporfirina IX (hemo). La BH₄ no sólo participa como cofactor del enzima en la formación de NO, sino que también es necesario para el mantenimiento y estabilización de la NOS (Alderton et al., 2001).

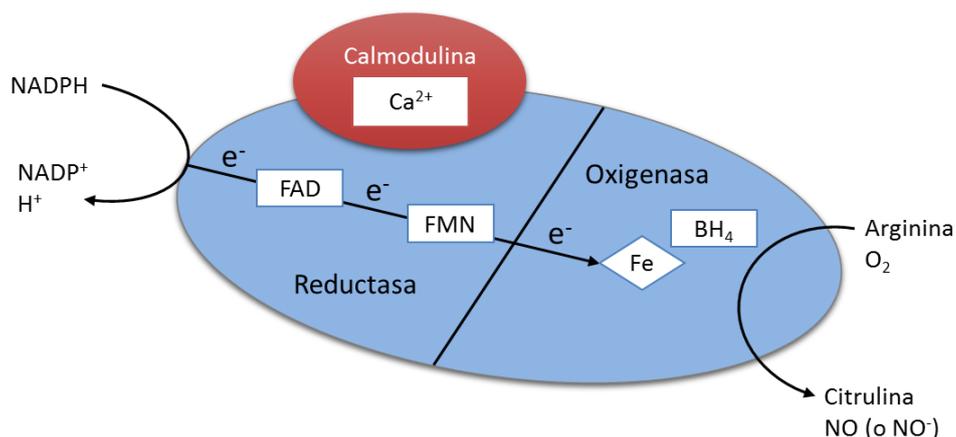


Figura 11. Reacción global y cofactores de NOS (adaptado de (Alderton et al., 2001))

Para la síntesis del NO, además del sustrato L-arginina, se requiere la presencia de calmodulina (CaM). La unión de la CaM a la NOS parece ser el “interruptor molecular” que permite el flujo de electrones desde el dominio reductasa hacia el grupo hemo, permitiendo la transformación del O₂ y L-arginina en NO y L-citrulina (Alfieri, 2003).

Farmacológicamente, la síntesis enzimática de NO puede ser inhibida por análogos estructurales de la L-arginina, como el L-NAME; un inhibidor no selectivo de las tres isoformas de la NOS o por N^w-Monometil-L-Arginina (L-NMMA) (Bachmann and Mundel, 1994).

Isoformas

El NO se forma prácticamente en todas las células del organismo, en las que desempeña multitud de funciones. Aunque la síntesis se realiza siempre a partir de arginina por la NOS, existen en los distintos tejidos varias isoformas de esta enzima (Medina and Martínez-Agustín, 2004).

Hasta el momento, han sido identificadas tres isoformas de la NOS, constituidas por subunidades homodiméricas con pesos moleculares entre 125 y 155 kDa. Las tres isoformas están codificadas en tres genes, localizados en tres cromosomas diferentes.

La nomenclatura de las NOS se ha prestado a confusión; actualmente se utiliza la aceptada por la Unión Internacional de Farmacólogos, la cual se resume en la siguiente tabla (Alfieri, 2003):

Tabla 3. Nomenclatura y características generales de las NOS (Adaptado de (Alfieri, 2003))

Nomenclatura Numérica	Nomenclatura Descriptiva		Características
NOS1	c-NOS b-NOS bc-NOS n-NOS	(constitutiva o regulada por calcio) (de cerebro) (neuronal) (constitutiva neuronal)	<ul style="list-style-type: none"> • Se expresa constitutivamente. • Su actividad está regulada por calcio. • Prototipo presente en neuronas. • Produce cantidades bajas (pmol) de NO, que cumple funciones de señalización celular
NOS2	i-NOS mac-NOS hep-NOS	(inducible) (de macrófagos) (de hepatocitos)	<ul style="list-style-type: none"> • Es inducida por citosinas • Su actividad es independiente del calcio • Prototipo presente en macrófagos de murinos • Produce cantidades altas (μmol) de NO que cumple funciones citotóxicas, citostáticas o citoprotectoras
NOS3	c-NOS e-NOS ec-NOS	(constitutiva o dependiente de calcio) (Esta nomenclatura sustituye la NOS1) (endotelial) (endotelial constitutiva)	<ul style="list-style-type: none"> • Se expresa constitutivamente • Su actividad está regulada por calcio • Prototipo presente en neuronas • Produce cantidades bajas (pmol) de NO que cumple funciones de señalización

Las tres isoformas de la NOS contienen un dominio carboxi-terminal homólogo al citocromo P450, con una flavina como grupo prostético, y un dominio amino terminal con un grupo heme como grupo prostético. Estos dominios terminales están conectados por un tercer dominio que es afín a la CaM (Alfieri, 2003):

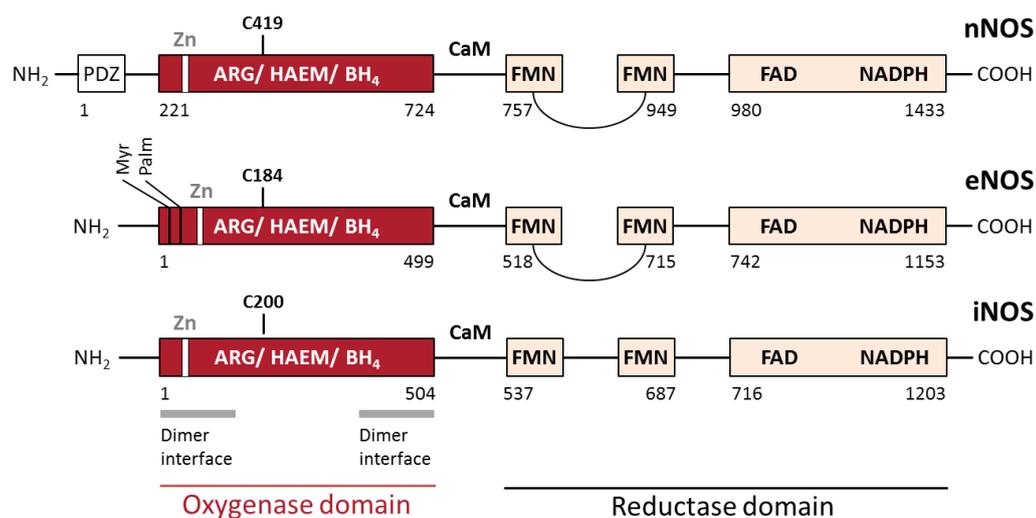


Figura 12. Estructura de dominio de nNOS, eNOS e iNOS (adaptado de (Alderton et al., 2001))

Las tres isoformas reconocidas son (Alfieri, 2003):

- **Dos isoformas constitutivas** (cNOS) ambas dependientes de calcio: la isoforma endotelial (eNOS), también conocida como tipo III (NOS3) y la isoforma neuronal (nNOS), también denominada tipo I (NOS1). Dichas isoformas median la producción de NO en cantidades bajas y fisiológicas, para actuar como señalizador molecular. Las isoformas constitutivas NOS1 (nNOS) y NOS3 (eNOS) se encuentran inactivas hasta que aumenta el calcio intracelular.

La enzima constitutiva endotelial (NOS3) tiene un sitio de miristilación, capaz de unirse a un ácido graso. Esto le permite asociarse a la membrana lipídica de las células, a diferencia de las otras isoformas, que no tienen este brazo lipídico y en consecuencia, son hidrosolubles y se encuentran libres en el citoplasma. Se cree que la asociación de la eNOS a la membrana facilita que el NO formado esté más cercano al exterior celular y por tanto, se difunde más rápidamente hacia la sangre y hacia el músculo liso adyacente donde ejerce sus funciones.

- **Una forma inducible** (iNOS), independiente de calcio, también denominada de tipo II (NOS2), cuya expresión puede ser inducida en diferentes tipos de células, tales como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, musculares lisas y endoteliales.

La activación crónica de las células endoteliales puede incrementar la síntesis de dicha isoforma e incrementar la síntesis total de NO (Alfieri, 2003), jugando un papel importante en la mediación de la lesión tisular asociada con la úlcera gastroduodenal y la enfermedad inflamatoria del intestino así como en la lesión de los tejidos gastrointestinales que acompañan al shock endotóxico y al síndrome isquemia-reperfusión (Muscará and Wallace, 1999).

Algunos investigadores han reportado una cuarta isoforma de la enzima NOS, cuya actividad se encuentra en las mitocondrias (mtNOS). Esta isoforma podría estar jugando un importante papel en la respiración celular y en la generación de ATP en la célula (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

1.2.3 Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)

En 1977, Murad descubrió que la liberación de NO producida por nitratos, relajaba las células del músculo liso. En 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron que la relajación inducida por ACh, era dependiente de la presencia de endotelio y está mediada por la liberación de un factor al que llamaron factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Moncada et al., 1988). En 1986, Ignarro propuso que EDRF era idéntica a NO (Stankevicius et al., 2003).

EDRF es un agente humoral lábil liberado por el endotelio vascular que media la relajación inducida por algunos fármacos vasodilatadores, incluyendo ACh y bradiquinina. Funcionalmente, inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular e induce la desagregación de las plaquetas agregadas. Estas acciones están mediadas por la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (Moncada et al., 1988).

Además del NO, se conocen varias sustancias derivadas del endotelio, como la prostaciclina, bradiquinina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), entre otros, que causan relajación del músculo liso. Los efectos vasorrelajantes de la prostaciclina están determinados por receptores específicos vasculares en las células musculares lisas.

Aunque la naturaleza del EDHF sigue siendo desconocida, causa vasodilatación por hiperpolarización de la membrana del músculo liso. Se ha propuesto, que el EDHF podría ser un metabolito lábil del ácido araquidónico (ácido epoxieicosatrienoico), liberado después de la estimulación con la bradiquinina. La estructura de la fuente de esta sustancia depende de la actividad de la citocromo P450 monooxigenasa.

Otra hipótesis, relaciona el origen de EDHF con fosfolipasa A₂ (PLA₂). En 1998, mediante investigaciones en arterias de rata hepática, los iones K⁺ fueron identificados como posible factor EDHF. Otros estudios indican que podría ser el H₂O₂ (Stankevicius et al., 2003), o se incluyen gases como CO y H₂S así como el péptido natriurético de tipo C de efecto vasodilatador. Con la excepción de K⁺, no todos los datos publicados identifican a estos mediadores con el EDHF (Triggle et al., 2012).

1.2.4 Mecanismos de liberación del NO

1.2.4.1 Liberación Constitutiva

Se han identificados dos tipos:

- **Basal**, es una liberación continua de NO por las células endoteliales no estimulada, que producen cantidades significativas de NO en condiciones de reposo, en ausencia de flujo sanguíneo y/o agonistas.

La formación de NO por debajo del nivel basal es posible cultivando células endoteliales en condiciones estáticas, que parece ser sustancialmente más pequeña que en las células endoteliales nativas. Las células endoteliales contienen sintasas dependientes e independientes del Ca^{2+} y esto refleja la expresión de una sintasa inducible en células endoteliales nativas que contribuiría a la liberación basal de NO y que estaría causada por la presencia continua de citoquinas en la vecindad de la pared del vaso sanguíneo in vivo (Busse, R et al., 1993).

- **Estimulada**, la liberación de NO puede ser:
 - Por agonistas, estimulan la liberación del NO por encima del nivel basal. Puede ser dependiente del receptor como la que produce la ACh, la fenilefrina, el ATP o la bradiquinina, e independientes de receptor, como la que consigue los ionóforos del Ca, algunos policationes o los inhibidores de la Ca^{2+} ATP asa.

Los agonistas, dependientes e independientes de receptor, evocan una liberación de Ca^{2+} intracelular desde los almacenes intracelulares, mediado por un aumento transitorio de inositol-1, 3, 5-trifosfato (IP3) y por un influjo más sostenido de Ca^{2+} a través de la membrana, desde el espacio extracelular.

El IP3, se forma bajo la activación de una fosfolipasa C. El aumento de Ca^{2+} intracelular conduce a la apertura de canales de K^+ activados por el Ca^{2+} , que resulta en una salida de K^+ fuera de la célula. Por un lado, la hiperpolarización resultante contrarresta los efectos despolarizantes del influjo de Ca^{2+} y por otro, la salida de K^+ contribuye a sostener el influjo de Ca^{2+} . Además, los agonistas dependientes de receptor, como la bradiquinina, pueden aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} de los canales de K^+ , vía un mecanismo dependiente de una proteína G.

- Por agentes físicos, como el estrés por rozamiento del flujo (*shear stress*), el estiramiento pulsátil de la pared del vaso y una baja presión parcial de O_2 . En conjunto, pueden representar el mecanismo fisiológico más importante de liberación de NO desde el endotelio vascular.

La liberación producida por el *shear stress* parece ser el factor principal que regula el tono vascular y de hecho, nutre de flujo sanguíneo a órganos activos mientras que la liberación mediada por agonistas puede ser considerada como una reserva para satisfacer los requerimientos locales transitorios de concentraciones más altas de NO, por ejemplo contrarrestando la formación de microtrombos. Es concebible que el avance viscoso causado por el flujo sanguíneo sea percibido por estructuras localizadas en la parte externa de la membrana celular. Este "sensor" de *shear stress* no ha sido

identificado, aunque podría estar acoplado a canales iónicos, al citoesqueleto o a almacenes de Ca^{2+} ligados a membrana.

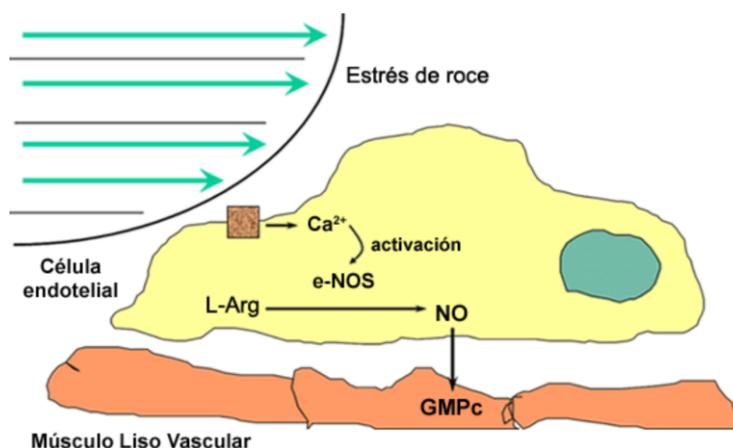


Figura 13. Efecto del incremento agudo del estrés de roce sobre la activación de la eNOS vascular (adaptado de (Alfieri, 2003))

La hipoxia induce vasodilatación en una variedad de lechos vasculares. Así, las células endoteliales liberan autacoides vasoactivos, como NO y prostaciclina, en respuesta a la hipoxia. Aunque los enzimas NOS y COX requieren al O_2 como sustrato, su síntesis está aumentada porque el incremento crucial de Ca^{2+} intracelular tiene lugar dentro del rango bajo pero fisiológico de presión de O_2 (20-50 mmHg).

1.2.4.2 Liberación Inducible

El NO de origen inducible se expresa únicamente después de una inducción transcripcional, en presencia de lipopolisacáridos bacterianos y/o citoquinas. La iNOS no parece estar sujeta a ningún mecanismo de control celular más que la disponibilidad de la L-Arginina y/o los cofactores necesarios.

1.2.4.3 Otros mecanismos de liberación de NO

Otro mecanismo de estimulación de esta enzima se debe a la reacción entre el grupo tiol (-SH) y el nitro-compuesto (R-NO_2) que formarán un nuevo compuesto llamado S-nitrosotiol, el cual al descomponerse libera el NO y en consecuencia, activa la guanilato ciclasa (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

1.2.5 Inhibidores inespecíficos de la NOS

La mayoría de los Inhibidores inespecíficos de la NOS son análogos estructurales de la L-Arginina, en particular aquellos en los que es sustituido uno o ambos nitrógenos del grupo guanidino terminal. El mecanismo de inhibición de la actividad de la NOS implica la ocupación del lugar de unión del sustrato al enzima.

1.2.5.1 Inhibidores exógenos

Los inhibidores inespecíficos de la NOS exógenos son la N ω -Nitro-L-Arginina (L-NNA), L-NAME y el N-iminoetil-L-ornitina (L-NIO) son los inhibidores más representativos de este grupo. Producen una inhibición competitiva, en mayor grado para la sintasa constitutiva. El L-NAME es tan potente como el L-NNA para inhibir la NOS constitutiva, pero menos para la inducible.

1.2.5.2 Inhibidores endógenos

Los inhibidores inespecíficos de la NOS endógenos son la N ω -Monometil-L-Arginina (L-NMMA) y el N ω -N ω -dimetil-L-arginina asimétrica (L-ADMA). Se pueden producir a partir de residuos de arginina tras metilación durante la renovación proteica. Estos compuestos en condiciones fisiológicas se encuentran en concentraciones bajas.

1.2.6 Inhibidores específicos de la NOS

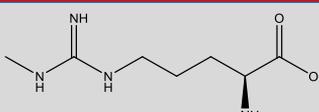
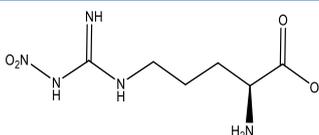
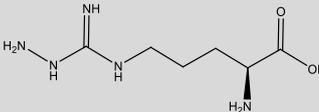
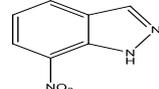
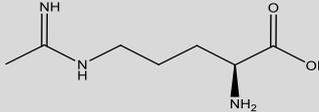
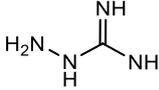
Como inhibidores específicos de la iNOS podemos nombrar a la aminoguanidina (AG), el N ω -amino-L-arginina (L-NA) y el N-imino-etil lysina (L-NIL) que fueron descritos hace años, como potentes inhibidores específicos de este enzima (Gross et al., 1990); (Misko et al., 1993); (Hasan et al., 1993); (Griffiths et al., 1993); (Moore et al., 1994) y que aún hoy se siguen utilizando para estudiar el papel del NO en la cirrosis (Wei et al., 2005); (Islas-Carbajal et al., 2005).

Otros inhibidores específicos de la iNOS como la dexametasona, han sido utilizados para estudiar el papel de este enzima en ratas con ligadura de la vena portal (Fernández et al., 1995). Algunos análogos estructurales de la L-Arginina parecen inhibir de manera más potente al enzima inducible que al constitutivo, aunque esta inhibición no es tan selectiva como por ejemplo la de la AG.

El L-NMMA es tan potente como la AG para inhibir a la sintasa inducible y más potente que ella en la inhibición de la constitutiva, aunque ésta parece ser selectiva para la liberación basal de NO y no para la estimulada por agonistas.

Otros inhibidores específicos actúan preferentemente sobre la nNOS como el 7-nitroindazol (7-NI) (Handy and Moore, 1998). Otros actúan sobre el NADPH o sobre la CaM, como es el caso éste último, de la trifluoroperazina causando una inhibición competitiva. También, se pueden usar los inhibidores de la BH $_4$ (por ejemplo: N-acetil-3-O-metildopamina), los que interaccionan con el grupo hemo (el CO y el propio NO como sistema de retroalimentación negativa), así como otros agentes que bloquean a la guanilato ciclasa soluble como el 1LY83.583 y el azul de metileno, y con ello la acción del NO.

Tabla 4. Diferentes inhibidores de las isoformas de la NOS (adaptado de (Alfieri, 2003))

Nombre	Abreviatura	Estructura	Selectividad
N ^ω -monometil-L-arginina	L-NMMA		nNOS=eNOS>iNOS
N ^ω -nitro-L-arginina	L-NA		nNOS=eNOS>>iNOS
N ^ω -amino-L-arginina	L-NAA		nNOS=iNOS>eNOS
7-nitroindazol	7-NI		nNOS=eNOS=iNOS
N ^δ -iminoetil-L-ornitina	L-NIO		iNOS>eNOS=nNOS
Aminoguanidina	AG		iNOS>eNOS=nNOS

1.2.7 Mecanismos de acción del NO

El NO es un gas que difunde fácilmente desde las células endoteliales a las células del músculo liso de la pared vascular. Allí estimula la guanilato ciclasa, una enzima soluble que cataliza la formación de GMP cíclico (GMPc) a partir de GTP. El GMPc desencadena entonces la vasodilatación arterial (Medina and Martínez-Agustín, 2004), siendo un mensajero clave en procesos de fototransducción y en la ruta de señalización del NO y los péptidos natriuréticos.

La vía de transmisión de la señal que el GMPc emplea dentro de la célula para producir sus efectos no está bien caracterizada (Rivero-Vilches et al., 2001) encontrándose dentro de los receptores clásicos más conocidos las proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKG), fosfodiesterasas y además, hay evidencias de la existencia de un tercer grupo, los canales CNG (cyclic nucleotide-gated channel) o canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos (Biel et al., 1998).

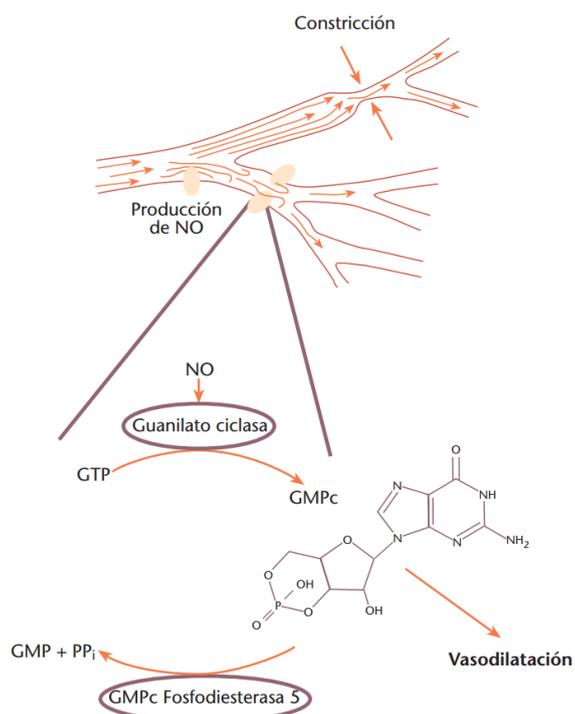


Figura 14. La producción de óxido nítrico evita la constricción de las arterias (adaptado de (Centelles, J J et al., 2004))

Dentro de los efectores más conocidos se encuentran las proteínas kinasas dependientes de GMPc (PKG). La PKG-I interviene de forma decisiva en el proceso de relajación celular, por una parte fosforila al receptor del inositol trifosfato (IP3R) que produce una inhibición de la liberación de Ca^{2+} o un incremento en su compartimentalización, reduciendo la concentración de Ca^{2+} citosólico libre y por otro participa en la activación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina. Además, los canales iónicos dependientes de GMPc se activan, contribuyendo aún más a la disminución del Ca^{2+} intracelular (además de otros canales) produciendo la relajación celular (Rivero-Vilches et al., 2001).

1.2.8 Funciones fisiológicas y fisiopatológicas del NO

Actualmente, se sabe que el NO participa en procesos que permiten la supervivencia de los organismos, tales como la regulación de la presión sanguínea, el desarrollo del sistema nervioso central, la transmisión nerviosa en los procesos de aprendizaje y memoria, la activación de la respuesta inmune y la reproducción sexual. En otros organismos como las plantas, el NO también interviene en procesos importantes, como son el metabolismo, el desarrollo y la defensa (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).

NO y sistema cardiovascular

Las primeras investigaciones sobre el NO en la fisiología humana se iniciaron con el estudio del papel que juega en la regulación de la presión sanguínea. Cuando la presión sanguínea es

alta, se genera una señal en las neuronas y en el propio endotelio por el elevado estrés de rozamiento, que aumenta la síntesis de NO por las NOS del tejido endotelial (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).

A nivel vascular, el NO actúa como un potente modulador local del tono vascular y de la hemostasis mediante sus acciones vasodilatadora y antiagregante de las plaquetas (Rivero-Vilches et al., 2001).

El NO también inhibe la proliferación de células musculares lisas y migración, la adhesión de los monocitos y la síntesis de endotelina, protegiendo así la pared del vaso del desarrollo de la aterosclerosis y la trombosis (Ghiadoni et al., 2000).

En la tabla siguiente se resumen los efectos biológicos del NO sobre diferentes células blanco/ tejidos/ órganos del sistema cardiovascular:

Tabla 5. Efectos biológicos del NO sobre el sistema cardiovascular (adaptado de (Strijdom et al., 2009))

Célula blanco/ Tejido/ Órgano	Efecto
Músculo liso	Relajación-vasodilatación
Plaquetas	Inhibe su agregación
Células inflamatorias	Modulación de la inflamación
Especies reactivas de Oxígeno	Efectos antioxidantes
Células endoteliales	Angiogénesis
Miocardio	Crecimiento y desarrollo fetal y postnatal Aumenta o disminuye la función contráctil Antihipertrofia Cardioprotector contra daño isquémico Generación y proliferación celular Anti apoptótico: promueve la supervivencia Aumenta o disminuye la contracción
Cardiomiocitos	Dañino en cantidades excesivas: pro apoptótico, pro necrótico

NO y función renal

El NO tiene un importante papel en el control de diversos aspectos de la función renal, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas siendo producido de forma continua en el glomérulo normal, regulando directamente el tono de las arteriolas glomerulares aferentes y el estado de la contracción mesangial (Rivero-Vilches et al., 2001). Otras funciones incluyen la atenuación de las respuestas vasoconstrictoras en el riñón de rata (modulación de la

reactividad vascular) (Reid and Rand, 1992), la regulación de la secreción de renina intrarenal (Noris and Remuzzi, 1999), la regulación hemodinámica renal, el mantenimiento de la perfusión medular, la mediación de la presión-natriuresis, la inhibición de la reabsorción tubular de sodio. El efecto neto del NO en el riñón es promover la natriuresis y diuresis jugando un papel importante en la adaptación renal a variaciones de la ingesta de sal en la dieta (Mount and Power, 2006) de tal manera que los defectos de la regulación del NO en la absorción de sodio, pueden incrementar la retención de sal y líquidos llevando a la HTA (Ortiz and Garvin, 2002).

Por otra parte, el NO producido por la mácula densa, al parecer debido a la expresión de una NOS constitutiva, controla la hemodinámica glomerular directamente a través del sistema de retroalimentación túbulo-glomerular y la liberación de renina. De esta forma, el NO interviene de manera decisiva en la regulación fisiológica de la presión sanguínea glomerular, el flujo plasmático renal, la presión capilar glomerular y el coeficiente de ultrafiltración. La modulación de la función renal por NO está mediada en parte por sus efectos sobre la presión sanguínea sistémica. El bloqueo crónico de la síntesis de NO induce hipertensión sistémica, así como proteinuria y esclerosis glomerular (Rivero-Vilches et al., 2001).

También, se ha demostrado que el SNS renal es importante en la regulación hemodinámica renal y en la homeostasis del sodio. En distintas situaciones, el NO parece modular o mediar los efectos del SNS renal. Así, por ejemplo, media el aumento de la reabsorción de sodio del túbulo proximal que se produce con la estimulación del nervio simpático renal (Mount and Power, 2006).

En cuanto a los factores que influyen en la biodisponibilidad de NO en el riñón, se puede citar el nivel de EO (Wilcox, 2002) y otro factor que controla los cambios crónicos en la síntesis de NO, es aquel que está regulado por los cambios en la expresión total de la eNOS (Fleming and Busse, 2003) o nNOS (Wu and Johns, 2002).

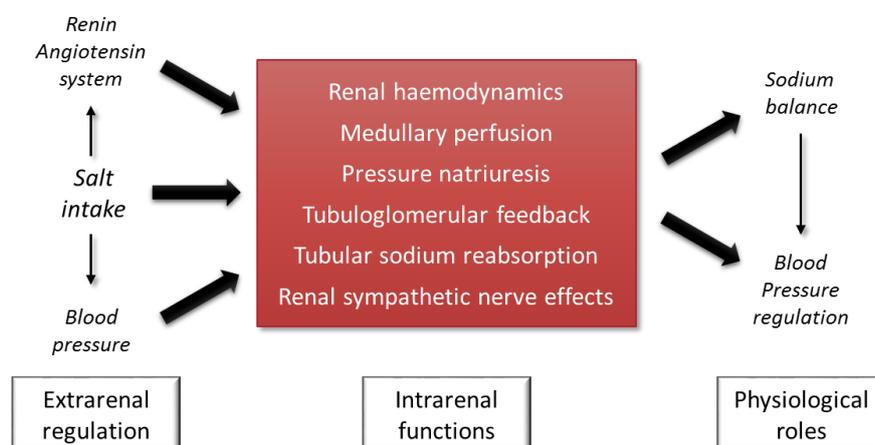


Figura 15. Descripción general de las funciones de NO en la fisiología renal (adaptado de (Mount and Power, 2006))

El objetivo principal actual, es conocer los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de NO en el riñón para que así poder obtener información de enfermedades como la HTA y la diabetes donde la desregulación de la síntesis renal de NO (Mount and Power, 2006) o disfunción renal, está presente en todas las formas de HTA en humanos y modelos animales experimentales. En el caso concreto de la rata SHR, hay estudios que sugieren que una reducción del flujo sanguíneo medular, es el responsable de la HTA que desarrolla (Cowley et al., 1995).

NO y sistema inmune

El NO también tiene una función muy importante dentro del sistema inmune, tanto de defensa como de daño al propio huésped. Varios estudios demuestran su toxicidad y la del peroxinitrito hacia distintos patógenos, entre los cuales están las bacterias, protozoarios e incluso virus, tanto de DNA como de RNA (Akaike and Maeda, 2000). En algunas infecciones bacterianas, el NO se ha involucrado en la inflamación de la mucosa gástrica causada por *Helicobacter pylori*, además de otras EROs y ERNs que se producen durante la infección (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

Exceso y defecto de NO

El NO interviene en los efectos fisiológicos cuando es producido en bajas cantidades. Sin embargo, también está involucrado en actividades de citotoxicidad cuando se genera en grandes cantidades (Alfieri, 2003).

En resumen, el NO es una molécula poderosa que regula funciones vitales y sin embargo resulta fatal si está fuera de control. El mal funcionamiento en la producción o disponibilidad del NO se asocia con enfermedades como la hipertensión, la disfunción eréctil, procesos neurodegenerativos y con disfunciones del sistema inmune, como el choque séptico, lo que puede resultar en la muerte del paciente (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).

1.2.9 Óxido nítrico e hipertensión arterial

Se sabe que los incrementos de la PA, bien sean agudos o crónicos producen, entre otras cosas, deterioro del endotelio y cambios morfológicos de la íntima arterial, produciéndose durante la hipertensión crónica el crecimiento del endotelio hacia el lumen y el engrosamiento del espacio subendotelial (Alfieri, 2003). Los daños a órganos diana tienen lugar al principio del transcurso de la enfermedad hipertensiva cardiovascular. En la siguiente figura, se describe la progresión de la enfermedad en ellos.

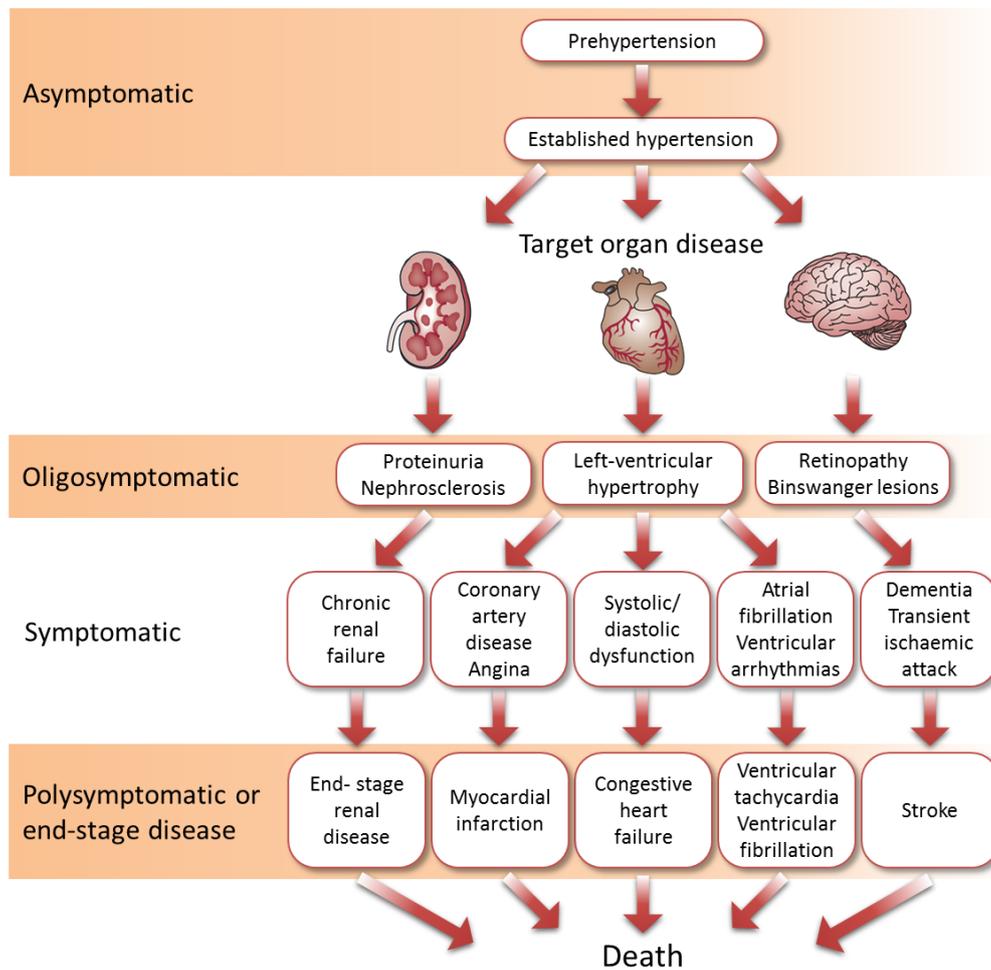


Figura 16. Alcance de la enfermedad cardiovascular hipertensiva desde la prehipertensión hasta el daño a los órganos diana y enfermedad en la etapa final (adaptado de (Messerli et al., 2007))

La inhibición crónica de la producción de NO rápidamente conduce a todas las consecuencias orgánicas de una hipertensión arterial severa, con arteriosclerosis y pérdida de vascularidad en SNC y en riñón. Por otra parte, la HTA se asocia con otros factores de riesgo, tales como la dislipidemia, resistencia insulínica (hiperinsulinemia) y sensibilidad a la sal (Alfieri, 2003).

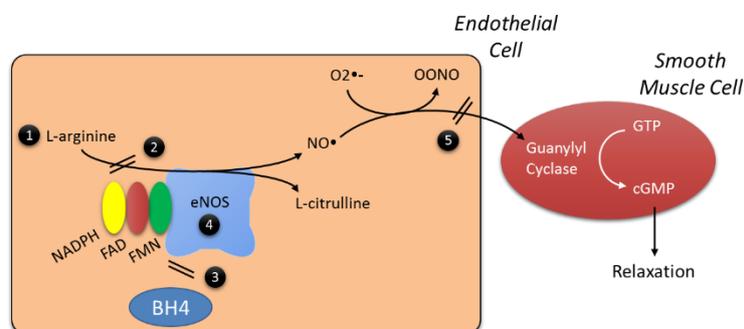


Figura 17. Posibles mecanismos de disminución de la actividad de NO en la hipertensión esencial (adaptado de (Cardillo and Panza, 1998))

Moncada (Moncada, 1999) ha sugerido, que en relación con el NO existen dos tipos de hipertensión. En un caso, la producción aumentada de factores vasoconstrictores podría llevar a un aumento de la síntesis de NO para actuar como un mecanismo protector. Este tipo de hipertensión muestra una mayor producción de NO. En otro tipo de hipertensión, puede haber una disminución en la producción de NO, sin oposición a la actividad normal vasoconstrictora en la pared vascular, dando lugar a una mayor PA (Vapaatalo et al., 2000).

1.2.10 Aplicaciones del NO en futuras terapias

Las aplicaciones derivadas de las numerosas funciones de esta molécula gaseosa han comenzado a materializarse. Un ejemplo de esto, es el uso de NO inhalado en bebés prematuros con hipertensión pulmonar persistente y también ha sido usado satisfactoriamente en el tratamiento del Distrés Respiratorio del adulto. El NO también se usa en el tratamiento de la impotencia, el sildenafil (Viagra).

Otra área donde se está investigando actualmente es aquella donde se persigue producir medicamentos que sólo desactiven una isoforma de la NOS. Un ejemplo sería el de los fármacos capaces de inactivar a la iNOS (NOS2) y que se podrían utilizar para enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Alfieri, 2003).

Recientemente, se han encontrado neuronas capaces de producir NO en el hipocampo, que es una región relacionada con el aprendizaje la memoria. Más aún se ha detectado la producción de NO en las áreas visual y olfativa, lo cual indica su importancia en la percepción sensorial. Además, las células del sistema nervioso periférico también producen NO en las neuronas que inervan al músculo liso del sistema vascular, el tejido endotelial del estómago y los pulmones (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

A nivel de SNC, también se le ha asignado al NO un papel muy importante en la regulación del proceso de memoria y aprendizaje. Esto es muy importante en enfermedades como la del Alzheimer o dificultades en el aprendizaje en niños. También hay un interés por el papel del NO en el tratamiento de la drepanocitopenia o anemia falciforme, ya que parece que el NO permite que la hemoglobina anormal o hemoglobina S de las células falciformes ligue oxígeno con mayor afinidad, sin alterar la afinidad en la hemoglobina normal (Alfieri, 2003).

Aunque es mucho lo que se sabe acerca de la química y los efectos fisiológicos del NO, todavía se desconoce el mecanismo mediante el cual las células productoras del NO, tales como las neuronas o los macrófagos resisten al efecto tóxico de esta molécula o cual es el origen del NO en las plantas ya que existen evidencias de que las plantas sintetizan NO a partir de la arginina y, por lo tanto, que existe una NOS vegetal. Sin embargo, los esfuerzos para detectar a la NOS, o al gen que la sintetiza, han sido infructuosos (Lira Ruan, V and Arredondo Peter, Raúl, 2004).

1.3 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

1.3.1 Aspectos fisiológicos

El sistema renina-angiotensina (RAS) o el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un importante sistema endocrino/paracrino que regula la presión arterial (PA) a través de la liberación de la angiotensina y la homeostasis de fluidos y electrolitos, mediante la liberación de aldosterona (Rao, 2010). También regula la natriuresis, el flujo sanguíneo y el control de las respuestas tróficas a estímulos. La desregulación de SRAA juega un papel importante en la patogénesis de trastornos cardiovasculares y renales (Atlas, 2007).

Sus acciones sistémicas incluyen la regulación de la PA, la natriuresis, el control del volumen sanguíneo, la regulación del flujo sanguíneo y el control de las respuestas tróficas a estímulos.

Este sistema consta de un número de diferentes componentes reguladores y péptidos efectores, que facilitan el control dinámico de la función vascular (Tikellis and Thomas, 2012). También está implicado en la disfunción endotelial, remodelado vascular, estrés oxidativo, producción de citoquinas proinflamatorias y adhesión de la síntesis de moléculas por la pared vascular, etc. (Kasal and Schiffrin, 2012).

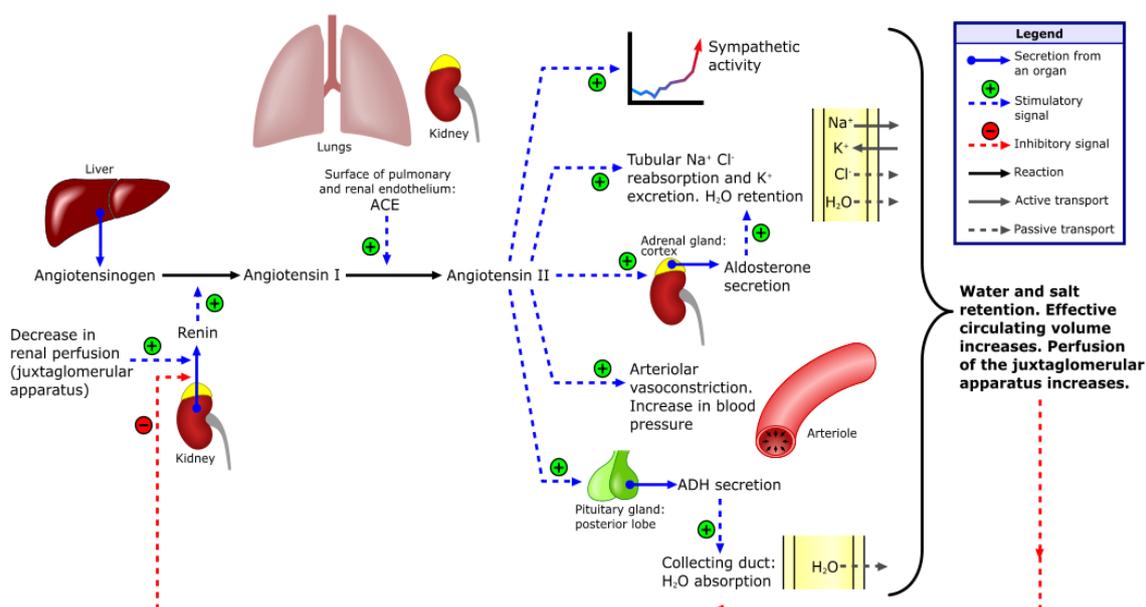


Figura 18. Esquema del sistema SRAA (adaptado de (Rad, Aria, 2006))

El sistema SRAA es un mediador clave de la HTA, y el bloqueo de la activación de este sistema es el método más usado para disminuir la PA (Tikellis and Thomas, 2012). El SRAA puede ser bloqueado por cinco clases distintas de fármacos antihipertensivos: betabloqueantes, inhibidores de la renina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA),

bloqueantes de los receptores de angiotensina (ARAI) y los inhibidores de la aldosterona. Así por ejemplo, el fármaco Aliskiren produce la inhibición directa de renina (Rao, 2010).

Hay nuevos enfoques terapéuticos que van dirigidos a una inhibición más completa del RAAS, y que incluyen el doble bloqueo usando la combinación de la IECA y ARAII (Atlas, 2007).

1.3.2 Renina inactiva (prorenina) y renina

La cascada hormonal del SRAA se inicia con la biosíntesis de renina por las células yuxtaglumerales que recubren la arteriola aferente, y ocasionalmente eferente, del glomérulo renal a partir de un precursor, la prorenina (inactivo) (Atlas, 2007).

La renina activa es una carboxipeptidasa glicosilada con una masa molecular de 44 kDa (Carey and Siragy, 2003) y se sintetiza en tejidos como el cerebro, glándula adrenal, ovarios, y tejido adiposo visceral y probablemente en corazón y tejido vascular (Atlas, 2007).

El control de la secreción de la renina es un factor clave en la actividad de SRAA, que está regulada principalmente por cuatro factores interdependientes (Atlas, 2007):

- Un mecanismo barorreceptor renal en la arteriola aferente que detecta los cambios en la presión de perfusión renal
- Cambios en la concentración de Cl^-
- Estimulación del sistema nervioso simpático vía receptores β -1-adrenérgica
- Retroalimentación o reacciones negativas por acción directa de Ang II sobre las células yuxtglomerulares

1.3.3 Angiotensinógeno

El angiotensinógeno (ANG) es una globulina de alto peso molecular. Por acción de la renina es fragmentado por el N-terminal del enlace peptídico, transformándose en Ang I o Ang (1-10), decapeptido biológicamente inerte (Atlas, 2007).

Aunque la principal fuente de angiotensinógeno es el hígado, el uso de otras técnicas ha confirmado que también se encuentra en la expresión de ARNm en una amplia gama de tejidos como riñón, cerebro, tejido vascular, glándula suprarrenal, placenta y leucocitos (Morgan et al., 1996).

Recientemente, se ha relacionado el ANG con la HTA y la preeclampsia. Hay evidencias de que las mutaciones del gen del angiotensinógeno o un gen vecino podrían contribuir al desarrollo de la hipertensión pero todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual estas mutaciones afectan a la regulación de la PA (Hata, 1995).

1.3.4 Angiotensina I

La Ang I es un decapeptido inactivo que es hidrolizado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA, peptidil-dipeptidasa A, EC 3.4.15.1), la cual elimina el carbono dipéptido terminal para formar el octapéptido Ang II (Ang-(1-8)), un potente vasoconstrictor (Atlas, 2007).

1.3.5 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La ECA es una metaloproteasa de cinc de la familia M2. La función predominante fisiológica de ECA es en la homeostasis cardiovascular a través de la escisión del C-terminal dipéptido de la Ang I para producir el potente vasoconstrictor, la Ang II. La ECA también inactiva el vasodilatador bradiquinina, por la escisión secuencial de dos C-terminales dipéptidos y por último, también puede hidrolizar una amplia gama de otros péptidos bioactivos endógenos (Tipnis et al., 2000).

La ECA en mamíferos se presenta en dos formas: **ECA somática** (170 kDa) que tiene doble dominio somático que contiene dos centros catalíticos activos (N-terminal y C-terminal) y la **ECA germinal o testicular** (90 kDa).

La ECA somática existe como una proteína integral de membrana tipo I anclada a la membrana plasmática a través de un dominio transmembrana cerca del extremo del C-terminal. Sin embargo, se puede encontrar en el plasma y otros fluidos corporales como una enzima soluble (ECA plasmática o soluble), careciendo de los dominios transmembrana y citosólicos (Tipnis et al., 2000).

El C-terminal de la ECA somática es el responsable del 75% de la actividad de la ECA y también el principal responsable de la conversión de la Ang I a II (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008):

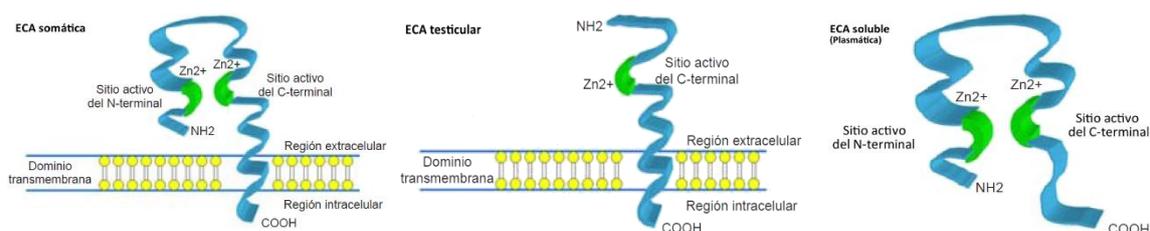


Figura 19. Principales isoformas de la enzima ECA (adaptado de (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008))

La mayor parte de la ECA es de membrana y se localiza en las membranas plasmáticas de diversos tipos de células, incluyendo las células vasculares endoteliales, microvellosidades de las células epiteliales frontera y células neuroepiteliales (Carey and Siragy, 2003).

La ECA testicular o germinal se encuentra exclusivamente en las células germinales de los testículos y se diferencia de la somática en que sólo tiene un grupo amino terminal en la región

extracelular y por tanto, tiene un sitio catalíticamente activo (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008).

En el año 2000, se descubrió el primer homólogo humano conocido de la ECA, la ECA2, que es una metaloproteasa con un único centro activo y un dominio transmembrana. Los dominios catalíticos de metaloproteasas de ECA y ECA2 son idénticos en un 42% de la secuencia de aminoácidos.

En contraste a la ECA, la ECA2 es altamente específica de tejido; mientras que la ECA se expresa en el sistema vascular, la ECA2 está restringida al corazón, los riñones y los testículos (Donoghue et al., 2000). Además, la ECA2 no convierte Ang I a II y su actividad enzimática no es inhibida por los IECA (Carey and Siragy, 2003).

Enzimas similares a ECA también se han encontrado en otras especies no mamíferas. En particular, en *Musca doméstica* se ha demostrado que contiene un único dominio con una proteína ECA (ECAn) y más recientemente, una segunda proteína ECA se ha identificado en la *Drosophila melanogaster*, denominado (ECAr) (Tipnis et al., 2000).

La inhibición de la ECA, previene la formación de Ang II, un potente vasoconstrictor con propiedades proliferativas e incrementa la concentración local de bradiquinina, que es un potente estimulador de las vías de L-arginina y COX y también aumenta la producción de NO, prostaciclina y EDHF a través del incremento de calcio intracelular (Enseleit et al., 2003).

In vivo, la inhibición de la ECA revierte la hipertrofia y la fibrosis de los miocitos cardíacos asociadas con el remodelado ventricular y la insuficiencia cardíaca, probablemente por la reducción local de la generación de Ang II (Donoghue et al., 2000).

1.3.6 Angiotensina II

La Ang II es el principal péptido efector del SRAA y a diferencia de la renina y el ANG, que tienen relativamente largas vidas medias plasmáticas, la Ang II se degrada en cuestión de segundos por angiotensinasas a diferentes fragmentos aminoácidos (Carey and Siragy, 2003). Así, por ejemplo, se han encontrado metabolitos derivados de la angiotensina tales como angiotensina 2-8 (Ang III), angiotensina 1-7, o angiotensina 3-8 (Ang IV) los cuales tienen actividad biológica (de Gasparo et al., 2000).

Vía de síntesis de Ang II

La cadena enzimática del sistema SRAA es la principal vía de síntesis de Ang II. Recientemente, se ha destacado la existencia de vías enzimáticas alternativas de síntesis de Ang II distintas del sistema SRAA. Así, se puede generar directamente a partir del angiotensinógeno mediante la acción de la catepsina G, la tonina y el activador de plasminógeno tisular (t-PA). También, además de la ECA, se ha demostrado que la catepsina

G, la quimasa y la CAGE (Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme) tienen la capacidad de producir Ang II a partir de la Ang I (Lahera et al., 2000).

Receptores AT₁ y AT₂

Actualmente, se conoce la existencia de dos tipos de receptores específicos para la Ang II en el ser humano: los receptores tipo 1 o AT₁ y los receptores de tipo 2 o AT₂ (Lahera et al., 2000).

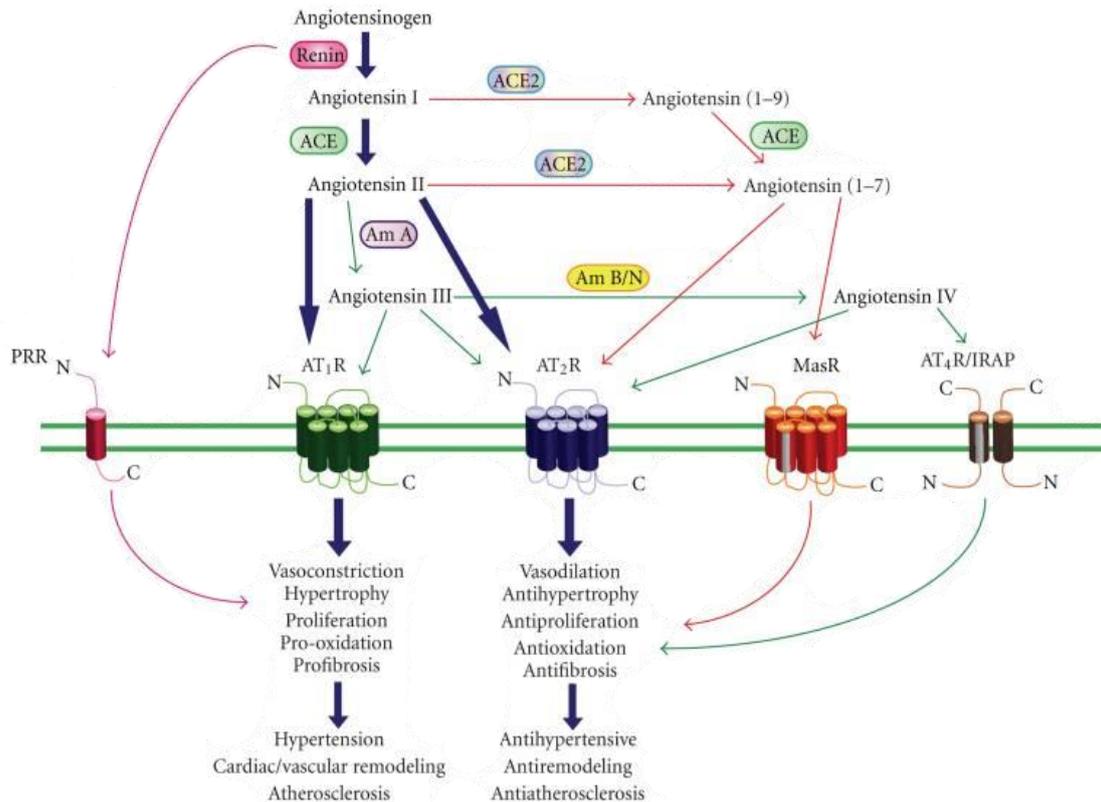


Figura 20. Vía enzimática de la síntesis de Angiotensina II (adaptado de (Elton et al., 2010))

El receptor de tipo 1 (AT₁) que es un receptor acoplado a proteína G que consta de siete dominios transmembrana y que se acopla positivamente a la proteína quinasa C, y negativamente a la adenilil ciclasa (Carey and Siragy, 2003). Cuando la Ang II se une al receptor AT₁, induce un cambio conformacional en la molécula del mismo que promueve su interacción con la proteína/s G, que a su vez media en las señales de transducción de varios efectores de la membrana plasmática. Estos incluyen enzimas tales como por ejemplo, fosfolipasa C y D, fosfolipasa A₂, adeniliclasa, y los canales de iones, tales como canales de Ca sensibles a voltaje tipo L y tipo T (de Gasparo et al., 2000).

Este receptor media la mayoría de los efectos fisiológicos y fisiopatológicos de la AII en los cuales se incluyen acciones sobre el sistema cardiovascular (vasoconstricción, incremento de la PA, aumento de la contractilidad cardíaca, hipertrofia cardíaca y vascular), riñón (reabsorción tubular renal de sodio, inhibición de la liberación de renina), SNS y corteza suprarrenal

(estimulación de la liberación de aldosterona). El receptor AT₁ también interviene en los efectos de la Ang II sobre el crecimiento celular y la proliferación, la respuesta inflamatoria y el EO (Atlas, 2007).

Los AT₁ activan la COX-2 y ésta a su vez, cataliza la formación de prostaglandinas y de TXA₂. En situaciones de hipoxia, inducen la activación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF1A), el cual aumenta la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), fomentando así la angiogénesis y remodelación vascular. Por otro lado, el receptor AT₁ altera directamente a la enzima eNOS con lo que disminuye la síntesis de NO (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008). Además, este receptor estimula la expresión de diversos factores transcripción (c-myc, c-fos, c-jun) favoreciendo la síntesis de ADN y proteínas (Lahera et al., 2000).

La Ang II también se une a otro receptor clonado, el receptor de AT₂, que contiene 363 aminoácidos, presenta sólo una homología del 34% con el receptor AT₁ y se expresa altamente en tejidos mesenquimales fetales de roedores y el hombre. Aunque los mecanismos de señalización celular y las funciones del receptor AT₂ son todavía desconocidas (Carey and Siragy, 2003), se ha demostrado que *in vitro* la estimulación de AT₂ claramente inhibe el crecimiento y proliferación del músculo liso cardíaco y vascular, estimula la apoptosis y promueve la síntesis de matriz extracelular. *In vivo*, la sobre estimulación crónica AT₂ daría lugar a la hipertrofia cardiovascular y la fibrosis (Henrion et al., 2001).

1.3.7 Acciones de la Angiotensina II

La Ang II es uno de los principales factores vasoactivos implicados en el desarrollo y las complicaciones de diversas patologías cardiovasculares y renales. Por ello, la inhibición de las acciones de la AII ha sido y continúa siendo de los objetivos primordiales de la terapéutica cardiovascular (Lahera et al., 2000).

Acciones sobre el sistema nervioso central y periférico

Las principales funciones de Ang II en este sistema son de tres tipos (Phillips, 1987):

- 1) Las asociadas con la regulación del volumen de fluidos corporales en respuesta a hipovolemia como por ejemplo, la sed, incremento de la presión sanguínea, liberación de vasopresina y aldosterona, etc. Esta función sólo tiene implicaciones importantes en el control de la PA y HTA
- 2) Su papel en la actividad en la liberación de las hormonas gonadotropina e hipofisarias durante el ciclo reproductivo y embarazo
- 3) Funciones sinápticas, es decir, las interacciones neurotransmisoras de la Ang II con catecolaminas, serotonina, prostaglandinas y otros péptidos

Acciones sobre el corazón

La Ang II tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos y facilita las acciones de la estimulación simpática. Estos efectos tienen lugar a concentraciones de Ang II que carecen de efecto vasoconstrictores (Lahera et al., 2000). Además, la síntesis de Ang II dentro de los miocitos cardíacos juega un papel importante en la modulación de la comunicación entre ellos y por consiguiente en la propagación del impulso eléctrico en el corazón (De Mello, 1994).

Acciones renales

La Ang II ayuda a prevenir la excesiva disminución de la tasa de filtración glomerular en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas preferentemente por constricción de las arteriolas eferentes. Por tanto, los efectos intrarrenales de Ang II proporcionan un mecanismo para la estabilización de la tasa de filtración glomerular y la excreción de productos metabólicos de desecho mientras que causan retención de sodio y agua, lo que ayuda a regular el volumen de fluidos corporales y la PA (Hall, 1986).

Acciones vasculares, estrés oxidativo y HTA

La Ang II incrementa el tono vascular mediante su acción facilitadora de la transmisión adrenérgica y también por la estimulación de factores endoteliales constrictores, como la ET-1 y el TXA₂. De hecho, la ET-1 parece mediar algunos de los efectos hipertróficos cardíacos de la Ang II y está implicada en la hipertensión dependiente de Ang II. Asimismo, hay que destacar que la Ang II es uno de los principales estímulos para la producción de radicales libres de oxígeno por las distintas túnicas de la pared vascular mediante la estimulación de diversas actividades enzimáticas como la NADH/NADPH oxidasa.

Dichos radicales y en especial el anión superóxido, son capaces de oxidar el NO, que es el principal factor relajante regulador del tono vascular. La Ang II, junto con el estrés hemodinámico que tiene lugar en la HTA, es uno de los principales factores causantes de las alteraciones estructurales de la pared vascular.

La Ang II también es capaz de estimular el crecimiento de la pared vascular facilitando la producción y la acción de factores mitogénicos como el bFGF, el PDGF, el VEGF o el factor de crecimiento tumoral (TGFbeta), que favorecen la proliferación de las células musculares lisas y la síntesis de proteínas. Como consecuencia, se produce un engrosamiento en el espacio subintimal y en la capa media, así como la acumulación de colágeno en la adventicia (Lahera et al., 2000).

1.3.8 Aldosterona

El principal estímulo para la síntesis de aldosterona es la Ang II y contribuye a la secuencia de eventos que conduce a la hipertensión. Existen abundantes pruebas de la vinculación de la aldosterona a lesiones de órganos, en asociación con el EO y la inflamación.

Tanto Ang II y aldosterona, junto con mediadores de la inflamación, como el IFN- γ y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), son capaces de estimular el crecimiento y proliferación de las células musculares lisas (CMLV), dando lugar a la hipertrofia vascular característica de la hipertensión. Por otro lado, inducen la expresión de NADPH oxidasa, la principal enzima responsable de la producción de superóxido en el tejido vascular (Kasal and Schiffrin, 2012).

1.4 Estrés oxidativo (EO)

Los tejidos biológicos requieren oxígeno para satisfacer sus demandas energéticas y esto conlleva a la generación de radicales libres que a concentraciones bajas ejercen acciones fisiológicas pero en exceso, pueden tener efectos dañinos en las células si no son adecuadamente neutralizados por los sistemas antioxidantes de nuestro organismo.

Así pues, se puede definir el estrés oxidativo (EO) como un desequilibrio en el estado redox de la célula, ya sea por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) o por una disfunción de los mecanismos antioxidantes (Gandhi and Abramov, 2012).

1.4.1 Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Son especies químicas basadas en oxígeno caracterizadas por su alta reactividad. Cuando los niveles locales de EROs son altos, tienden a reaccionar con los centros de numerosas proteínas, ADN, los lípidos de las membranas celulares y otras moléculas, causando un considerable daño celular, así como la generación de otros radicales más reactivos. A bajas concentraciones, estas especies constituyen un sistema mensajero secundario que transmite información biológica a través de la modulación específica de moléculas de señalización intracelular, enzimas y proteínas (Seddon et al., 2007).

Muchas ERO poseen electrones desapareados y son por tanto, radicales libres. Se incluyen moléculas tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($HO\cdot$), NO y radicales lipídicos. Otras ERO tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO\cdot$) y ácido hipocloroso ($HOCl$) (Cai and Harrison, 2000), ozono (O_3), oxígeno singlete (1O_2) no son radicales libres y son convertidos fácilmente a radicales. Oxidantes que contienen N, tal como el NO, se denominan especies reactivas de N (ERNs) (Bedard and Krause, 2007).

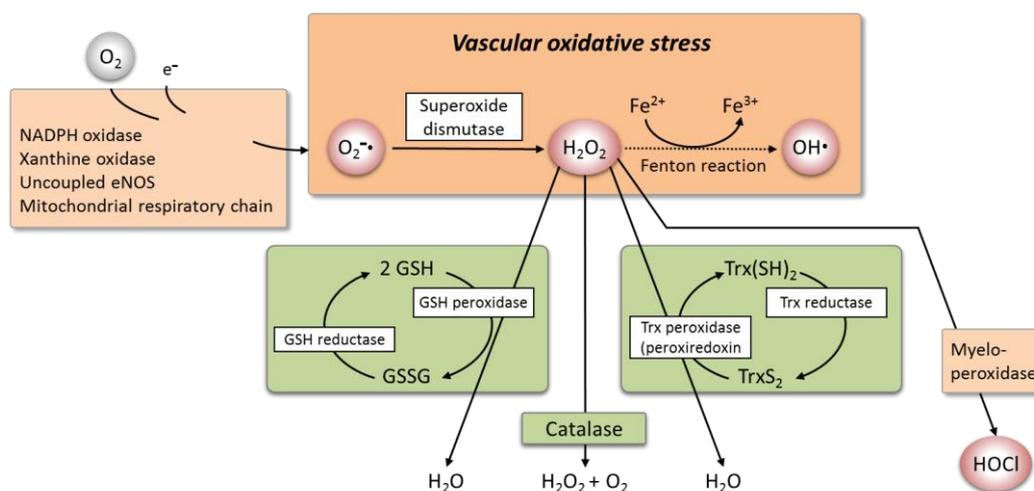


Figura 21. Enzimas implicadas en la generación e inactivación de EROs (adaptado de (Förstermann, 2010))

La reacción entre superóxido y NO conduce a la inactivación de NO y a la pérdida de su actividad biológica así como a la generación de peroxinitrito. Esta reacción es especialmente probable que ocurra cuando los niveles de superóxido y NO son altos y la actividad antioxidante baja (Seddon et al., 2007). El peroxinitrito posteriormente, puede oxidar al ácido araquidónico para formar F₂-isoprostanos los cuales ejercen potentes efectos vasoconstrictores y antinatriuréticos (Romero and Reckelhoff, 1999).

El peroxinitrito además, atraviesa las membranas celulares mediante canales aniónicos causando oxidación de lípidos (lipoperóxidos) y proteínas. Además, el daño neuronal que causa la falta de O₂ al cerebro, conocida como isquemia, se debe en parte a la formación del peroxinitrito que se produce cuando se reestablece el flujo de O₂ al cerebro. Asimismo, el peroxinitrito daña varias moléculas de la mitocondria, lo cual afecta la respiración celular, disminuye la síntesis de energía y afecta al metabolismo del Ca. Esta interacción, finalmente, desencadena el proceso de muerte celular conocido como apoptosis (Cuéllar Mata, P et al., 2010).

El H₂O₂ media el tono vascular, ya sea mediante la inducción de la contracción o relajación, dependiendo del lecho vascular y de las condiciones experimentales, y puede causar disfunción de la barrera endotelial bien por alteración directa de la función endotelial o por aumento de la permeabilidad de la monocapa endotelial a las macromoléculas y células inflamatorias (Ulker et al., 2003); (McQuaid and Keenan, 1997).

El radical hidroxilo es uno de los compuestos más reactivos que existen, casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio donde se produce (Hansberg Torres, 2002).

Por tanto, los radicales libres son especies capaces de interactuar prácticamente con todas las moléculas biológicas incluyendo lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y el NO.

Todos ellos están implicados en el crecimiento y proliferación celular así como en la expansión de la matriz extracelular (Kasal and Schiffrin, 2012).

Fuentes de ERO (O_2^-) a nivel vascular

En células de mamíferos, las fuentes enzimáticas de ERO incluyen la respiración mitocondrial, el ácido araquidónico mediante las enzimas lipoxigenasa y ciclooxigenasa, el citocromo P450, xantina oxidasa, NADH/NADPH oxidasas, la NOS, peroxidasas y otras hemoproteínas, siendo las más ampliamente estudiadas en sistemas cardiovasculares (Cai and Harrison, 2000) las tres que a continuación se describen:

- **Xantina oxidasa**, la xantina oxidoreductasa es una molibdomenzima capaz de catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina en el proceso de metabolismo de las purinas. La xantina oxidasa puede existir en dos formas interconvertibles, ya sea como xantina deshidrogenasa o xantina oxidasa. La primera forma reduce NAD^+ , mientras que la segunda dona con facilidad electrones al oxígeno molecular, dando lugar a la producción tanto de O_2^- y H_2O_2 . En las células endoteliales, la actividad y expresión de la xantina oxidasa se ve reforzada por $INF-\gamma$ (Cai and Harrison, 2000).
- **NADH/NADPH Oxidasa**, es la enzima predominantemente productora de superóxido y su actividad vascular está regulada por citoquinas, hormonas y fuerzas mecánicas que se sabe que están implicadas en la patogénesis de las enfermedades vasculares (Cai and Harrison, 2000) tales como hipertensión, aterosclerosis, activación endotelial y angiogénesis así como disfunción endotelial. Todas las NADPH oxidasas contienen una subunidad catalítica núcleo llamado NOX (Seddon et al., 2007).

En los últimos años, se han encontrado seis homólogos de la subunidad de la citocromo oxidasa NADPH fagocítica: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2. A estos homólogos, se les conoce como la familia NOX de las NADPH oxidasas (Bedard and Krause, 2007).

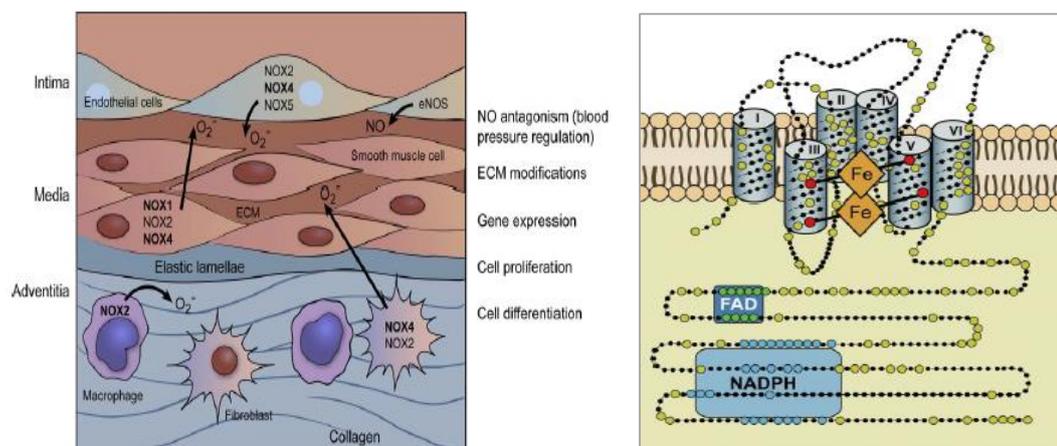


Figura 22. (a) Enzimas NOX en la pared vascular (b) Estructura del núcleo central de las enzimas (NOX) de la NADPH oxidasa (adaptado de (Bedard and Krause, 2007))

Todos los miembros de la familia NOX son proteínas transmembrana que transportan electrones a través de las membranas biológicas para reducir oxígeno a superóxido (Bedard and Krause, 2007) y están también ampliamente distribuidos en células no fagocíticas. Se ha encontrado que estas especies también juegan un papel importante en la hipertensión inducida por Ang II (Liu et al., 2012) la cual muestra un incremento de la expresión del ARNm de la subunidad p22phox de la NADPH (Cai and Harrison, 2000).

- **Óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3)**, es un citocromo P450 de tipo reductasa que cataliza el transporte de electrones mediados por la flavina desde el NADPH donador de electrones a un grupo prostético hemo. La enzima requiere tetrahidrobiopterina cerca de este grupo hemo para transferir electrones al nitrógeno de guanidino. Si falta L-arginina o BH₄, la NOS3 puede producir O₂⁻ y H₂O₂. Este fenómeno ha sido contemplado como un desacoplamiento de la eNOS.

El desacoplamiento de la eNOS en el endotelio puede conducir al estrés oxidativo y a disfunción endotelial al menos a través de tres mecanismos:

- 1) La producción enzimática de NO está disminuida permitiendo que los radicales puedan reaccionar con él para atacar otras dianas celulares.
- 2) El enzima comienza a producir O₂⁻, lo que contribuye al EO.
- 3) Es probable que la eNOS esté parcialmente desacoplada, de tal manera que O₂⁻ y NO se producen simultáneamente. Bajo esta circunstancia, eNOS puede convertirse en un generador de peroxinitrito (ONOO⁻), (Cai and Harrison, 2000) el cual puede oxidar a la tetrahidrobiopterina dando productos biológicamente inactivos tales como, el radical (BH₃[·]) o el catión trihidrobiopterina protonado en N5 (BH₃[·]H⁺).

El radical (BH₃[·]) puede ser convertido en biopterina quinonoide (BH₂) que carece también de actividad biológica. Cuando ONOO⁻ sobrepasa la capacidad de la célula para volver a reducir estos productos a BH₄, eNOS "desacopla" y reduce oxígeno a O₂⁻ y ya no sintetiza NO, contribuyendo al EO en la célula (Förstermann, 2010).

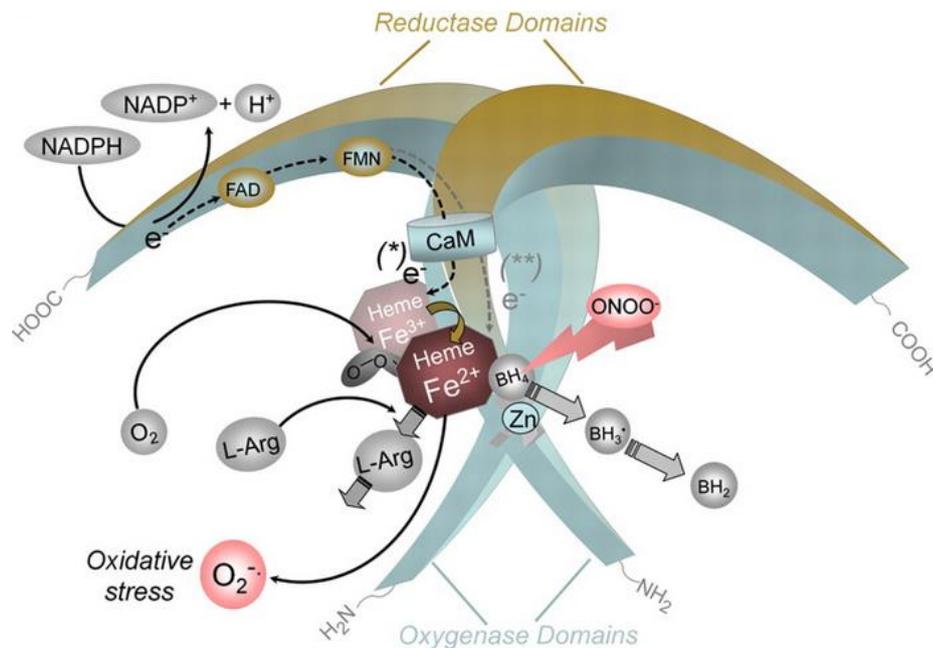


Figura 23. Esquema de la eNOS cuya reducción de oxígeno está desacoplada de la síntesis de NO (adaptado de (Förstermann, 2010))

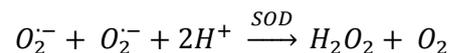
1.4.2 Mecanismos de defensa antioxidantes

La mayor parte de los radicales libres son eliminados mediante antioxidantes. Los antioxidantes son aquellas sustancias presentes a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas) que retarda o previene su oxidación. El antioxidante, al chocar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico.

1.4.3 Enzimas antioxidantes

La primera línea de defensa contra el daño oxidativo lo componen enzimas antioxidantes. Estas enzimas se encargan de eliminar las ERO, especialmente el radical superóxido y el H₂O₂, para evitar que a partir de éstos se generen otras especies más reactivas y, por tanto, más peligrosas. Dentro de los antioxidantes encontramos:

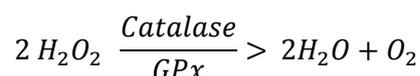
- **Superóxido dismutasa (SOD)**, cataliza la dismutación del altamente reactivo radical superóxido a O₂ y H₂O₂ que son especies menos reactivas (Matés et al., 1999).



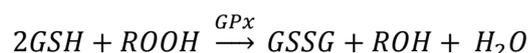
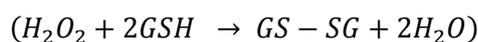
La enzima SOD se encuentra en humanos en la mayoría de los tejidos. Existen tres isoformas, la citosólica (Cu/ZnSOD), la mitocondrial (MnSOD) y la extracelular ECSOD. Estas isoformas presentan funciones similares, pero las características de su estructura de la proteína, localización del cromosoma, los requerimientos del metal cofactor, la

distribución de genes, y la compartimentación celular son muy diferentes (Gandhi and Abramov, 2012).

- **Catalasa** (CAT), es una hemoproteína que cataliza descomposición de peróxido de hidrógeno a agua y a oxígeno (Förstermann, 2010). Se localiza en los peroxisomas, citoplasma y las mitocondrias (Gandhi and Abramov, 2012). La catalasa juega un papel importante en la respuesta adaptativa de las células al EO (Matés et al., 1999).



- **Glutación peroxidasa** (GPx), es el nombre general para una familia de isoenzimas que catalizan la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos a agua o alcoholes correspondientes usando glutati6n reducido (GSH) como donador de electrones, que es transformado a glutati6n oxidado (GSSG). En los tejidos de mamíferos existen cuatro importantes glutati6n peroxidasa dependientes de selenio y de hidroperóxido de fosfolípidos, que incorpora cisteína en vde selenocisteína (Gandhi and Abramov, 2012).



En los mamíferos existen varias isoformas de la enzima glutati6n peroxidasa: citos6lica (cGPx), hidroperóxido de fosfolípidos (PHGPx), plasmática (pGPx) y gastrointestinal (GI-GPx) (Brigelius-Flohé, 1999).

1.4.4 Sustancias antioxidantes no enzimáticas (vitaminas y minerales)

Son moléculas orgánicas que se necesitan en pequeñas cantidades en la dieta y a menudo son precursores de coenzimas (Berg et al., 2002). Tienen un papel nutricional, metab6lico y fisiol6gico importante, y la ingesta 6ptima a trav6s de la dieta reduce el riesgo de deficiencias y enfermedades asociadas.

- El ácido asc6rbico (**vitamina C**) es esencial para el colágeno, la carnitina y biosíntesis de neurotransmisores. Se le han atribuido beneficios para la salud por sus acciones antioxidantes, antiaterogénicas, anticancerígenas, inmunomoduladoras, etc. (Naidu, 2003)
- La **vitamina A** tiene muchas funciones, incluyendo el mantenimiento de las células epiteliales, la visi6n, la regulaci6n de genes, y la funci6n celular inmune (Weiss, 1998).
- La **vitamina E** se compone de una familia de hidrocarburos denominados tocoferoles y tocotrienoles (Wang and Quinn, 1999). Los is6meros de importancia biol6gica son los tocoferoles, y dentro de ellos el alfa-tocoferol, el cual tiene una funci6n importante en su acci6n como antioxidante de lípidos para proteger los lípidos de membrana poliinsaturados contra el ataque de radicales libres. Tambi6n, se cree que actúan como

estabilizadores de membrana por formación de complejos con los productos de hidrólisis de la membrana lipídica tales como lisofosfolípidos y ácidos grasos libres (Wang and Quinn, 2000).

Debido a sus propiedades antioxidantes, la vitamina E también tiene se cree que ayuda a prevenir enfermedades asociadas con el EO (Förstermann, 2010). Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas.

- El **selenio y zinc** son comúnmente mencionados como nutrientes antioxidantes y se requieren para la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

1.4.5 Otros antioxidantes

Existen otras muchas sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta. Algunos ejemplos son:

El glutatión reducido (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina), es un antioxidante de bajo peso molecular que sirve para funciones biológicas (Camera and Picardo, 2002). Es un reactivo de defensa contra la acción de xenobióticos tóxicos (drogas, contaminantes, sustancias cancerígenas), está implicado en la protección de las células contra los efectos nocivos del estrés oxidante en exceso y como un cofactor de glutatión peroxidasas (Pompella et al., 2003).

La melatonina que tiene funciones antioxidantes tales como captación directa de radicales libres, estimulación de enzimas antioxidantes, incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y aumenta la eficacia de otros antioxidantes (Reiter et al., 2003).

Por último, resultan de especial importancia los flavonoides, una de las familias de polifenoles de origen natural que están presentes en la dieta humana y que contribuyen a las propiedades antioxidantes de los vegetales, frutas, vino tinto, chocolate, té (Filipe et al., 2001), e incluso aunque en menor concentración, aceite de oliva (ver en apartado "1.5. Flavonoides").

1.4.6 Estrés oxidativo e HTA

El estrés oxidativo (EO), un estado generalizado de aumento de cantidades ERO (Lum and Roebuck, 2001) que supera al sistema antioxidante, está involucrado en la fisiopatología de diversas enfermedades renales y cardiovasculares, tales como la hipertensión, la aterosclerosis, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, diabetes mellitus (Yung et al., 2006), hipercolesterolemia, y tabaquismo (Cai and Harrison, 2000).

También influye en la etiología de una variedad de enfermedades tumorales y neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Gandhi and Abramov, 2012). El incremento del EO contribuye a la disfunción de la modulación de NO de la neurotransmisión simpática (Török, 2008) debido a que la deficiencia de la producción de NO neuronal causa hiperactividad simpática (Sander and Victor, 1999).

El aumento de la producción vascular de EROs, especialmente del anión superóxido, contribuye de manera significativa en las alteraciones funcionales y estructurales presentes en la HTA que conducen a una disminución en la biodisponibilidad de NO (Zalba et al., 2001) debido a que los radicales superóxido pueden combinarse con el NO formando peroxinitrito, que a su vez puede oxidar el ácido araquidónico dando lugar a F-2 isoprostanos ejerciendo fuertes efectos vasoconstrictores y antinatriuréticos (Romero and Reckelhoff, 1999). Además, el incremento de la producción vascular del anión superóxido deteriora la función endotelial (Zalba et al., 2001) y la relajación dependiente del endotelio que caracteriza a la HTA (Berry et al., 2000).

En SHR, el incremento de la producción de superóxido puede conducir al desarrollo de hipertensión causada por el deterioro crónico del sistema cardiovascular, especialmente, el endotelio (Hong et al., 2001, p. 200). Recientemente, se ha demostrado que la DE está asociada con un exceso en la generación de anión superóxido más que con una disminución en la producción de NO en la aorta de la rata adulta SHR (Zalba et al., 2001). El superóxido puede inducir a la iNOS y causar sobreproducción de NO, llevando esta formación masiva de cantidades de NO vía iNOS, a un efecto potencialmente citotóxico (Hong et al., 2001). Se ha comprobado que la reducción de radicales superóxido por la infusión de la SOD disminuye significativamente la PA en este modelo animal de hipertensión (Redón et al., 2003).

En cuanto a la generación del anión superóxido, se ha comprobado que la enzima NAD(P)H oxidasa es la fuente más importante en las células vasculares (Zalba et al., 2001) mediante un mecanismo dependiente de Ang II (Escobales and Crespo, 2005). La Ang II incrementa la producción de superóxido por activación de la NAD(P)H oxidasa vascular (Berry et al., 2000). Por otro lado, se ha comprobado que pequeños incrementos de Ang II son responsables de un aumento de la presión sanguínea y mantenimiento de la hipertensión a través de la estimulación del EO. La angiotensina puede a su vez, estimular la producción de endotelina, la cual estimula también el EO (Romero and Reckelhoff, 1999). La xantina oxidasa es otra fuente de generación de EROs en hipertensión que podría alterar la función vascular y estructura (Xu and Touyz, 2006).

El EO también aumenta la permeabilidad del endotelio vascular, promueve la adhesión de leucocitos que están acoplados con alteraciones en la transducción de factores de transcripción regulados vía redox tales como el activador de la proteína-1 y el factor nuclear- κ B (Lum and Roebuck, 2001) e incrementa la expresión de factores angiogénicos, como por ejemplo el VEGF (Bedard and Krause, 2007). Las EROs pueden atacar a los ácidos nucleicos causando entrecruzamientos de la proteína de ADN, roturas en la cadena, modificación de las bases de purina y pirimidina dando lugar a mutaciones de dicho ADN (Gandhi and Abramov, 2012). Además, aumentan la concentración de Ca^{2+} intracelular libre que juega un papel importante en la contractilidad vascular alterada de la hipertensión (Xu and Touyz, 2006, p. 200).

Las EROs juegan un papel importante en acontecimientos celulares asociados con la remodelación vascular de las enfermedades cardiovasculares. En HTA, las pequeñas arterias sufren remodelación estructural debido en gran parte, al incremento del crecimiento celular, la

migración celular, la deposición de la matriz extracelular y la inflamación, estando todos ellos influenciados en distinto grado por las EROs (Xu and Touyz, 2006).

En hipertensión, el EO está implicado en la patología de varias formas de la misma. Así por ejemplo, estudios clínicos realizados en pacientes con hipertensión esencial, hipertensión renovascular, hipertensión maligna y preeclampsia, muestran un aumento de la producción de EROs (Touyz, 2004) aunque su papel en la patogenicidad de la HTA no está aún bien comprendido. Los mecanismos que producen EO, la contribución a la disregulación de los factores y/o mecanismos que controlan el tono vascular normal y las implicaciones de la hipertensión inducida en el daño a órganos diana por productos derivados del EO, requieren más estudios. Se ha llegado a plantear la cuestión de si la reducción de los mecanismos antioxidantes es la causa o consecuencia del EO (Redón et al., 2003).

La mayoría de las investigaciones sobre los efectos cardiovasculares del EO, se centran en el estudio de los mecanismos vasomotores mediados por el NO endotelial. Algunas áreas insuficientemente estudiadas incluyen el papel del EO sobre el endotelio dependiente, mecanismos antitrombóticos, regulación vasomotora independiente del NO (por ejemplo, efecto sobre los canales de K⁺) y calcificación de la válvula aórtica (Heistad, 2006).

Fármacos como el Celiprolol o Carvedilol, con acción antihipertensiva y antioxidante, están ofreciendo resultados prometedores en el tratamiento de la hipertensión (Escobales and Crespo, 2005) y recientemente existe un creciente interés acerca del papel de los flavonoides de la dieta y su potencial para mejorar la función endotelial mediante la modificación de estados de EO (Papageorgiou et al., 2013).

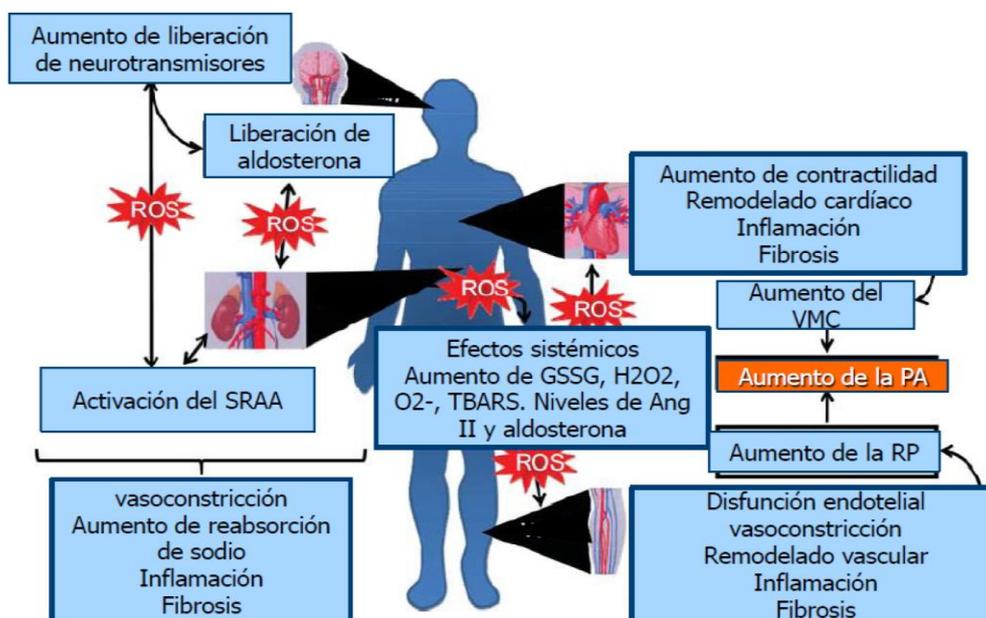


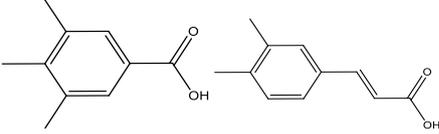
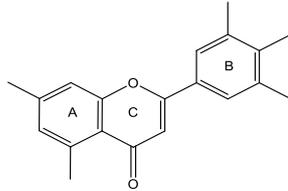
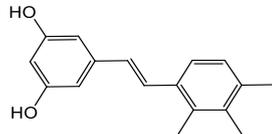
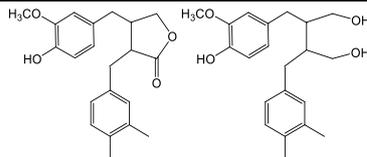
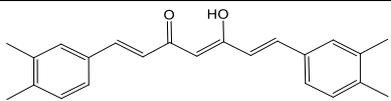
Figura 24. Efectos de las ROS en el desarrollo de HTA (adaptado de (Montezano and Touyz, 2012))

1.5 Flavonoides

Los flavonoides, nombre que deriva del latín '*flavus*', cuyo significado es amarillo, constituyen la subclase de polifenoles más abundante del reino vegetal. El científico húngaro Albert Szent-Györgyi, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937, los descubrió en el siglo pasado cuando aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, y demostró que su consumo regulaba la permeabilidad de los capilares. A la citrina y a los compuestos afines los denominó "**vitamina P**" (por permeabilidad). Posteriormente, también se observó que estos compuestos poseían propiedades similares a la vitamina C. Mejoraban la absorción de esta vitamina y protegían de la oxidación, y por ello también se denominaron **vitamina C₂**. Sin embargo, no se había podido confirmar que los flavonoides fueran vitaminas, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Quiñones et al., 2012).

El interés por la investigación de los flavonoides, decayó en los años 40, produciéndose una gran expansión mucho más tarde, en la década de los 90, tras la publicación de estudios epidemiológicos que asociaban una menor incidencia de cáncer y de enfermedades cardiovasculares con una mayor ingesta de flavonoides (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010).

Tabla 6. Representación esquemática de los principales miembros de la familia de polifenoles (adaptado de (Habauzit and Morand, 2012))

Clases de Polifenoles	Estructuras químicas
<ul style="list-style-type: none"> Ácidos fenólicos (C6-C1 y C6-C3) 	
<ul style="list-style-type: none"> Flavonoides (C6-C3-C6) 	
<ul style="list-style-type: none"> Estilbenos (C6-C2-C6) 	
<ul style="list-style-type: none"> Lignanos (C6-C3-C3-C6) 	
<ul style="list-style-type: none"> Curcuminoides (C6-C3-C1-C3-C6) 	

Los flavonoides son un amplio grupo de metabolitos secundarios de plantas incluyendo las destinadas para consumo humano, es decir, son compuestos orgánicos que se sintetizan a partir de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos que aparentemente no son indispensables para vivir (Tenorio López et al., 2006) y no sólo juegan un importante papel fisiológico y ecológico sino que también tienen interés comercial debido a sus múltiples aplicaciones en industrias alimenticias y farmacéuticas (Benavente-García et al., 2007). Estos compuestos atraen a nutricionistas y farmacólogos por un buen número de razones y ventajas:

- 1) Su presencia y concentración en frutas y verduras, contribuye de forma evidente, al carácter saludable de estos alimentos.
- 2) Algunos de estos alimentos son particularmente ricos en flavonoides tales como el té, vino, cebollas, cítricos, manzanas o el chocolate negro, cuyos efectos beneficiosos cardiovasculares son bien conocidos.
- 3) Diversas plantas medicinales, ricas en flavonoides, han sido y aun actualmente son usadas como alternativas potenciales a la medicina clínica.
- 4) Un significativo número de extractos, procedentes de materiales vegetales y alimentos (vino, té, cítricos) ricos en flavonoides, se han comercializado como suplementos dietéticos.
- 5) Determinados flavonoides específicos (como por ejemplo, Diosmina o quercetina) también están disponibles en ciertos países como nutracéticos (Perez-Vizcaino et al., 2009), OTCs e incluso, presentaciones farmacéuticas.
- 6) Rara vez estos compuestos presentan efectos secundarios e incluso a elevadas dosis, tienen una relativa larga vida media (Tapas et al., 2008).

1.5.1 Estructura química y clasificación

Los flavonoides se forman en las plantas y participan en la fase luminosa de la fotosíntesis, en donde catalizan el transporte de electrones. Se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina los cuales provienen de la ruta del ácido siquímico junto con unidades de acetato (ruta de los policétidos) (Middleton et al., 2000).

Químicamente, son compuestos de bajo peso molecular que se encuentran en plantas vasculares. Estructuralmente, pueden ser considerados como fenilbenzo-pironas (C6-C3-C6) compuestos por dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C) (Tenorio López et al., 2006).

Los átomos de carbono en los anillos A y C se enumeran del 1 al 8, y los del anillo B desde el 1' al 6' (Tenorio López et al., 2006). Biogenéticamente, el anillo A se produce de una molécula de resorcinol o floroglucinol sintetizada a través de la ruta del acetato y tiene un patrón de hidroxilación característico en la posición 5 y 7 (Ross and Kasum, 2002), y el anillo B junto con la

unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico (Quiñones et al., 2012). El anillo B está por lo general hidroxilado en 4'-, 3'4'- o 3'4'5'- (Ross and Kasum, 2002).

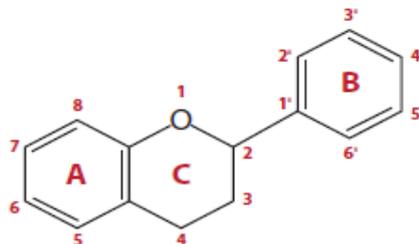


Figura 25. Estructura general de los flavonoides (adaptado de (Flora et al., 2012))

Las familias clave de flavonoides se establecen y se generan por los siguientes elementos modificables sobre el esqueleto básico (Tenorio López et al., 2006):

- Existencia, o no, de doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C
- Presencia, o no, del grupo carbonilo en posición 4 del anillo C
- Presencia de sustituyentes en la posición 3 del anillo C
- Diferentes patrones de sustitución en los anillos B y A
- Diferentes patrones de polimerización por enlace de monómeros a través de los anillos A, B y C
- Situación del anillo B respecto al núcleo cromona, en posiciones 2 o 3 (del anillo C del esqueleto flavonoide)

Por tanto, y en base a las anteriores características estructurales, se distinguen los siguientes grupos de flavonoides:

- 1) **Flavanonas**: como hesperidina, naringina, naringenina y eriodictiol, que carecen de doble enlace entre los anillos 2 y 3 en el anillo C. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C7. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones, sobre todo, en cítricos y también se encuentran en ciertas plantas aromáticas como la menta.
- 2) **Flavonas**: como diosmetina, apigenina, luteolina y tangeretina, que poseen un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C y un grupo carbonilo en posición 4, y carecen también de un grupo hidroxilo en posición 3. Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas. La piel de las frutas también posee ciertas cantidades de flavonas polimetoxiladas.
- 3) **Flavonoles**: como quercetina y kaempferol, que poseen un grupo 3-hidroxilo en la posición 3 del anillo C. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas. El té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles.
- 4) **Flavanoles o flavan-3-oles**: como catequinas y epicatequinas. Poseen el anillo C saturado carente de grupo carbonilo y un grupo hidroxilo en el carbono C3. Pueden aparecer como

monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (procianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Sin duda, las principales fuentes de catequinas en la alimentación son el chocolate, el té y el vino.

- 5) **Antocianinas**: como cianidina, delphinidina y malvidina, que se caracterizan por la presencia de un ión oxonio en el anillo C y un grupo hidroxilo en la posición 3 de dicho anillo. Se trata de compuestos muy coloreados e hidrosolubles y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas.
- 6) **Isoflavonas**: como genisteína, daidzeína y gliciteína, que poseen el anillo B en C3 y grupos hidroxilo en los carbonos C7 y C4'. Se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas.

Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos) (Quiñones et al., 2012).

A continuación, se muestra el núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides y ejemplos de compuestos característicos dentro de cada grupo:

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

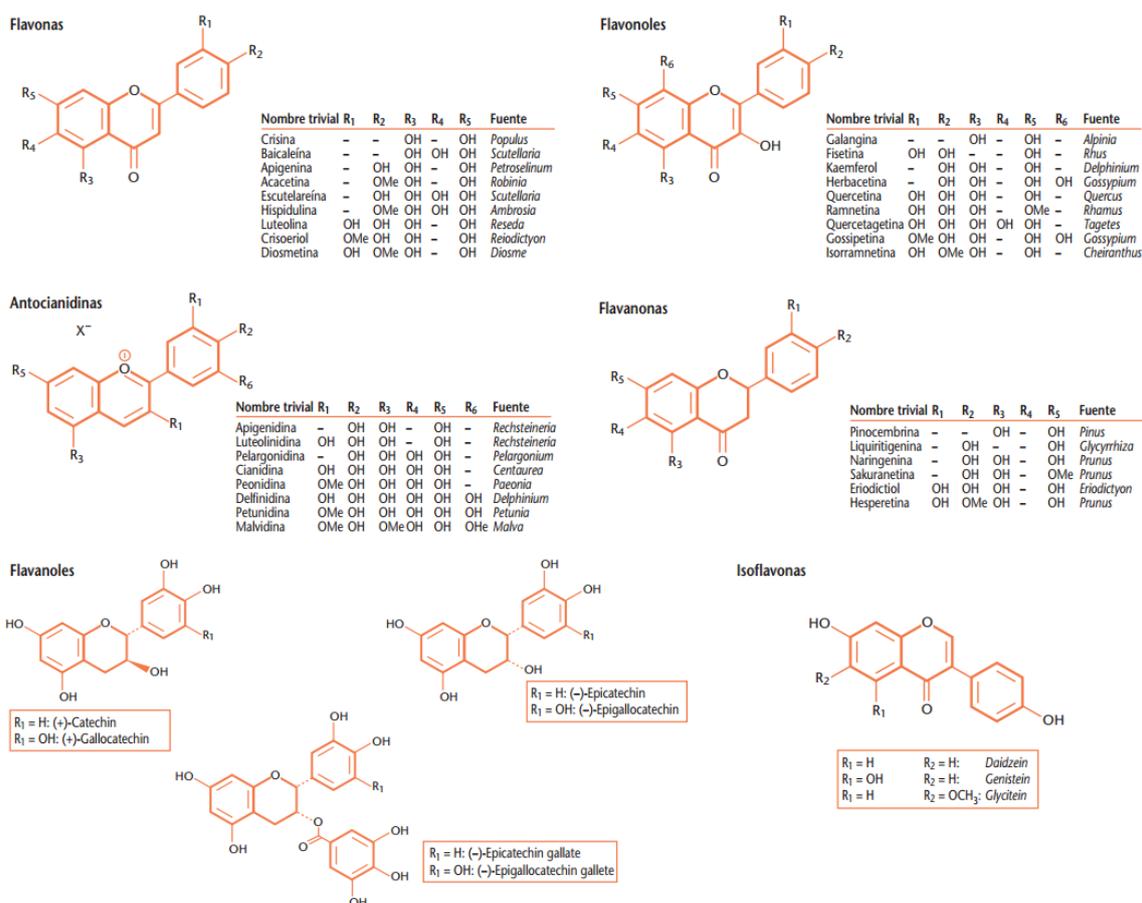


Figura 26. Clases de flavonoides (adaptado de (Paredes and Clemente, 2005))

Además de estos grupos, hay otros polifenoles “no flavonoides” que contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Este grupo de compuestos incluye los estilbenos (resveratrol), ácidos fenólicos (ácido gálico), saponinas (ginsenósidos) y otros polifenoles como la curcumina y los taninos (Curin and Andriantsitohaina, 2005).

1.5.2 Distribución, ingesta y métodos de separación

Distribución

Los flavonoides son compuestos polifenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana identificándose más de 5.000 diferentes (Martínez-Flórez et al., 2002) y están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, mayoritariamente en las angiospermas, y de forma minoritaria también en hongos y algas (Quiñones et al., 2012).

De forma general, constituyen los pigmentos responsables de colores otoñales y de los tonos amarillo, naranja y rojo en flores y alimentos; los flavonoides se encuentran en las frutas y verduras, nueces, semillas, hierbas, especias, flores, tallos así como en el té y vino tinto. Son

componentes destacados de frutos cítricos y de otras fuentes de alimento que se consumen regularmente en la dieta humana (Tenorio López et al., 2006).

En los alimentos, la mayoría de los flavonoides excepto flavanoles existen en forma de β -glicósidos (unidos a azúcares). Dicha unión glicosídica normalmente se produce en la posición 3 o 7 y entre los azúcares que forman parte de su estructura se incluyen la L-ramnosa, D-glucosa, glucoramnosa, galactosa o arabinosa ((Raj et al., 2001); (Jain et al., 2010)).

Además de estar presentes en los alimentos, los flavonoides constituyen los principios activos de numerosas plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de distintas patologías que afectan a numerosos sistemas orgánicos, como el aparato digestivo, el aparato urinario, el sistema cardiovascular, SNC o la piel (Ballester et al., 2006).

Ingesta

Aunque es altamente variable, ha podido estimarse que el consumo de flavonoides totales por día oscila entre 23 y 500 mg de estos metabolitos (Tenorio López et al., 2006). Los flavonoides más abundantes en la dieta son los flavan-3-oles, antocianinas y sus productos de oxidación. Las flavonas y flavanoles son menos comunes aunque están presentes en un buen número de hortalizas y vegetales. Sin embargo, otros autores sugieren que son los flavanoles, los flavonoides más abundantes en la dieta. Recientemente, Noroozi y col (Noroozi et al., 2000), han establecido que la ingesta media de flavanoles es de aproximadamente 35 mg por día, de los que el 91% está constituido por la quercetina. De hecho, la quercitrina y la rutina, son los flavonoides más comunes en la dieta (Ballester et al., 2006). Las menos abundantes en la dieta son las flavanonas contenidas sobre todo en los zumos de cítricos (Scalbert and Williamson, 2000).

Uno de los primeros estudios que intentaron determinar el contenido de flavonoides de la dieta humana fue llevado a cabo por Kühnau (Kühnau, 1976), que estableció que su consumo en los Estados Unidos era de aproximadamente 1 gramo diario, expresados en forma de heterósidos, o de unos 650 mg por día cuando se consideraba el consumo de agliconas libres de la parte glucídica (Ballester et al., 2006).

En un estudio holandés realizado en 1987/88, la ingesta de polifenoles se estimó en 23 mg/día de flavonoides mixtos en forma de agliconas. Este valor puede estar relacionado con los 28 mg/día obtenidos en Dinamarca, correspondiente a la cantidad total de flavonoides ingeridos diariamente. En los países occidentales, el consumo total de flavonoides, flavanonas, flavanoles e isoflavonas se estima entre 100 a 150 mg/día (Curin and Andriantsitohaina, 2005).

Uno de los principales problemas en los estudios acerca de la ingesta de flavonoides es que sólo un número limitado de flavonoides se puede medir en muestras biológicas, y más importante aún, sólo un número relativamente pequeño de frutas y verduras se utilizan para realizar una estimación exacta (Nijveldt et al., 2001).

Tabla 7. Flavonoides alimenticios, subclases y fuentes típicas de alimentación (adaptado de (Shohaib et al., 2011))

Flavonoides comunes en la dieta		
Clases de flavonoides	Flavonoides en la dieta	Fuentes alimenticias
Antocianinas	Cianidina, Delfinidina, Malvidina, Pelargonidina, Peonidina, Petunidina	Bayas rojas, azules y moradas; uvas rojas y moradas; vino tinto
Flavan-3-oles	<u>Monómeros (Catequinas):</u> Catequina, Epicatequina, Galato de epicatequina galato, Galato de epigalocatequina <u>Dímeros y Polímeros:</u> Teaflavinas, Terubiginas, Proantocianidinas	<u>Catequinas:</u> Té (particularmente verde y blanco), chocolate, uvas, bayas, manzanas <u>Teaflavinas, Terubiginas:</u> Té (particularmente negro y oolong) <u>Proantocianidinas:</u> Chocolate, manzanas, bayas, uvas rojas, vino tinto
Flavanonas	Hesperetina, Naringenina, Eriodictiol	Frutas y jugos cítricos, por ejemplo, naranjas, pomelos, limones
Flavonoles	Quercetina, Kaempferol, Miricetina, Isoramnetina	Ampliamente distribuida: cebollas amarillas, cebolletas, col rizada, manzanas, bayas, té
Flavonas	Apigenina, Luteolina	Perejil, tomillo, apio, pimientos picantes
Isoflavonas	Daidzeína, Genisteína, Gliciteína	Soja, alimentos de soja, legumbres

Métodos de separación

Comprende las etapas de extracción y aislamiento/purificación:

- **Extracción**

La preparación y la extracción de compuestos fenólicos dependen sobre todo de la naturaleza de la muestra y de las propiedades químicas de los compuestos fenólicos, incluyendo la estructura molecular, polaridad, concentración, número de anillos aromáticos y grupos hidroxilo. Por tanto, es difícil elegir un único método de preparación y extracción para muchos productos vegetales (Khoddami et al., 2013).

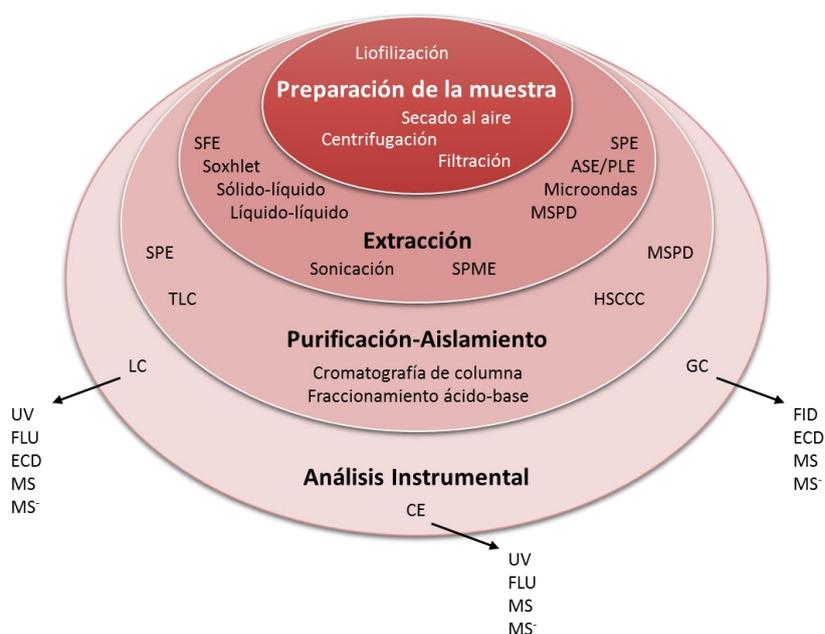


Figura 27. Esquema de estrategias para la extracción de flavonoides (adaptado de (Tsao, 2010))

En el caso concreto de flavonoides existen dos procedimientos generales de extracción:

- **Flavonoides tipo flavanona:** Se emplean medios acuosos alcalinos, en los cuales la extracción se produce mediante la generalización del equilibrio chalcona-flavanona (soluble-no soluble) y su posterior direccionamiento hacia la estructura flavanona en medio ácido.
- **Resto de flavonoides:** Se emplean mezclas hidroalcohólicas en diferentes proporciones y condiciones físicas de extracción (tiempo, temperatura, ratio sólido-líquido, etc.).

Los flavonoides así extraídos se filtran (separación sólido-líquido) y se secan mediante diversos procedimientos (estufas de alta temperatura, estufas a vacío, spray-dryers, liofilización, etc.) de acuerdo a la estabilidad térmica que les confiere su propia estructura molecular.

- **Aislamiento/purificación**

La cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y la cromatografía gaseosa (GC), o sus combinaciones, acopladas con la espectrometría de masas son los dos métodos más comúnmente aplicados para cuantificar compuestos fenólicos ya que dan resultados muy fiables. La cromatografía de gases es otra técnica que se aplica para la separación y cuantificación de compuestos fenólicos. También es frecuente el uso de cromatografía en papel (PC), la cromatografía en capa fina (TLC) y la espectrofotometría UV-VIS (Khoddami et al., 2013).

El espectro UV-VIS típico de los flavonoides típicamente muestra una banda a 210-290 nm (**banda I**) la cual es debida a la absorción del sistema benzoílo (anillo A) y una segunda

banda en la región de 300-400 nm (**banda II**), que está asociada con el sistema cinamoilo (anillos B y C).

También se ha comprobado que con el aumento de la conjugación, la absorbancia se desplaza a longitudes de onda mayores (Halbwirth, 2010).

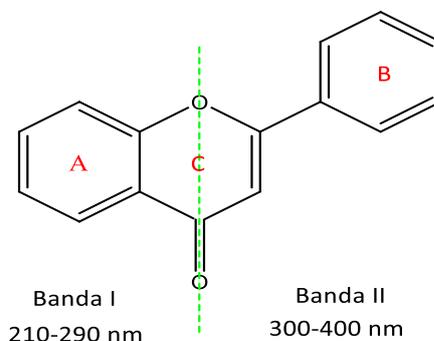


Figura 28. Bandas de absorción de los flavonoides en el espectro UV-VIS (adaptado de (Halbwirth, 2010))

Otras técnicas son la cromatografía contra corriente de alta velocidad (HSCCC), la electroforesis capilar (CE) y la resonancia magnética nuclear (RMN) acoplada con LC (LC-NMR) (Khoddami et al., 2013).

1.5.3 Biodisponibilidad, absorción-metabolismo y eliminación

Biodisponibilidad

Las propiedades fisiológicas de los polifenoles dependen de su biodisponibilidad (Scalbert and Williamson, 2000) y hace referencia a la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación (D'Archivio et al., 2007).

En general, su biodisponibilidad es relativamente baja, debido a su limitada absorción y a su rápida eliminación. Además, los flavonoides se metabolizan rápida y extensamente, aunque su actividad biológica no es siempre igual a la del compuesto precursor (Paredes and Clemente, 2005). La biodisponibilidad es diferente para los diversos polifenoles: isoflavonas son el grupo más biodisponible de los flavonoides, mientras que los flavonoles (proantocianidinas y catequinas del té) y antocianinas son poco absorbidos. La biodisponibilidad es especialmente baja para la quercetina y la rutina (0,3-1,4%), pero alcanza valores más altos para las catequinas en el té verde, isoflavonas de la soja, flavononas en cítricos o antocianidinas en el vino tinto (3-26%) (Hansen et al., 2010).

Los principales objetivos de los estudios de biodisponibilidad son determinar cuáles son los polifenoles que mejor se absorben, valorar qué polifenoles dan lugar a metabolitos activos, y caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos (Quiñones et al., 2012).

Absorción intestinal

La estructura química de los polifenoles determina el tipo y extensión de absorción intestinal y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma (Scalbert and Williamson, 2000). La glucosilación afecta al grado de absorción de estos compuestos, y los polifenoles más comunes de nuestra dieta, no son necesariamente los que producen una mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana (Quiñones et al., 2012).

En los alimentos, la mayoría de los flavonoides excepto los flavanoles existen en forma de β -glicósidos unidos a azúcares ((Raj et al., 2001); (Jain et al., 2010)). Generalmente, las agliconas (flavonoides libres de azúcar) y algunos glucósidos son los que muestran una mejor absorción por el intestino delgado (Manach et al., 2004). Así, los estudios experimentales llevados a cabo en ratas, mostraron que la absorción a nivel gástrico es posible para algunos flavonoides tales como la quercetina pero no se produce para sus glicósidos. Se ha demostrado recientemente, que en ratas y ratones, las antocianinas también pueden absorberse en el estómago (Pandey and Rizvi, 2009).

El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría de los glucósidos resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino. Por lo tanto, estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales (D'Archivio et al., 2007) tales como:

- 1) **La lactasa phloridzina hidrolasa (LHP)**, que se encuentra en la membrana de los enterocitos (cuando los flavonoides son hidrolizados por esta enzima atraviesan por difusión pasiva la membrana intestinal).
- 2) **La enzima β -glucosidasa citosólica no específica (CGB)**, que es capaz de hidrolizar una amplia gama de glicósidos incluyendo glucósidos, galactósidos, xilósidos, arabinósidos y fructósidos. Esta enzima está localizada intracelularmente en los enterocitos, por lo que se requiere del transporte activo de los glicósidos por medio del transportador de azúcar SGLT-1 dependiente de sodio Na^+ (Estrada-Reyes et al., 2012).

Por otra parte, los glicósidos que no son sustratos para la LHP o para el SGLT-1 son transportados hacia el colon donde son hidrolizados por las bacterias ahí presentes (Estrada-Reyes et al., 2012). Cuando la microflora colónica está implicada, la eficiencia de la absorción se reduce, debido a que la microflora también degrada las agliconas que libera y produce varios aminoácidos aromáticos simples en el proceso (Manach et al., 2004). La mayoría de los polifenoles de la dieta se va a metabolizar a través de la microbiota del colon antes de la absorción, sólo una pequeña cantidad, se absorbe directamente en el tracto gastrointestinal superior (Hanhineva et al., 2010).

Después de la absorción, los flavonoides se unen a la albúmina y son transportados al hígado por la vena portal (Aherne and O'Brien, 2002). La afinidad de los polifenoles por la albúmina varía en función de su estructura química (D'Archivio et al., 2007).

Metabolismo. Mecanismos de conjugación y transporte de plasma.

Los flavonoides sufren una intensa metabolización y una parte importante de estos compuestos se excreta por la orina. Su biotransformación tiene lugar en dos zonas: en primer lugar, en el hígado por medio de reacciones de biotransformación de **fase I**, en donde se introducen grupos polares; en segundo lugar, en el colon mediante reacciones de biotransformación de **fase II**, en las que los microorganismos, degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos o glicina parece tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Martínez-Flórez et al., 2002).

Como consecuencia de estos procesos, las formas que alcanzan la sangre y tejidos periféricos son diferentes de las que inicialmente se encuentran en los alimentos, lo que hace difícil identificar los metabolitos y evaluar su actividad biológica (D'Archivio et al., 2007).

La absorción en el intestino delgado es más eficiente que en el colon y conducirá a valores plasmáticos elevados (Hollman, 2004). Las moléculas resultantes son en su mayoría glucuronatos y sulfatos, con o sin metilaciones en el grupo catecol. El intestino delgado parece ser el principal órgano responsable de la glucoronización, pero también juega un papel importante en la metilación. Los principales productos del metabolismo del intestino delgado que alcanzan la vena portal hepática son glucurónidos y metilglucurónidos (Kroon et al., 2004).

Las concentraciones alcanzadas en plasma no son mayores de 1µM después de la ingestión de alimentos ricos en flavonoides (Serafini et al., 2010) y es necesario ingerir estos compuestos de forma reiterada a lo largo del tiempo para mantener sus concentraciones elevadas en el plasma, de hecho, las concentraciones máximas a menudo, se alcanzan 1-2 h después de la ingestión, excepto en el caso de los polifenoles que requieren ser degradados antes de la absorción (D'Archivio et al., 2007).

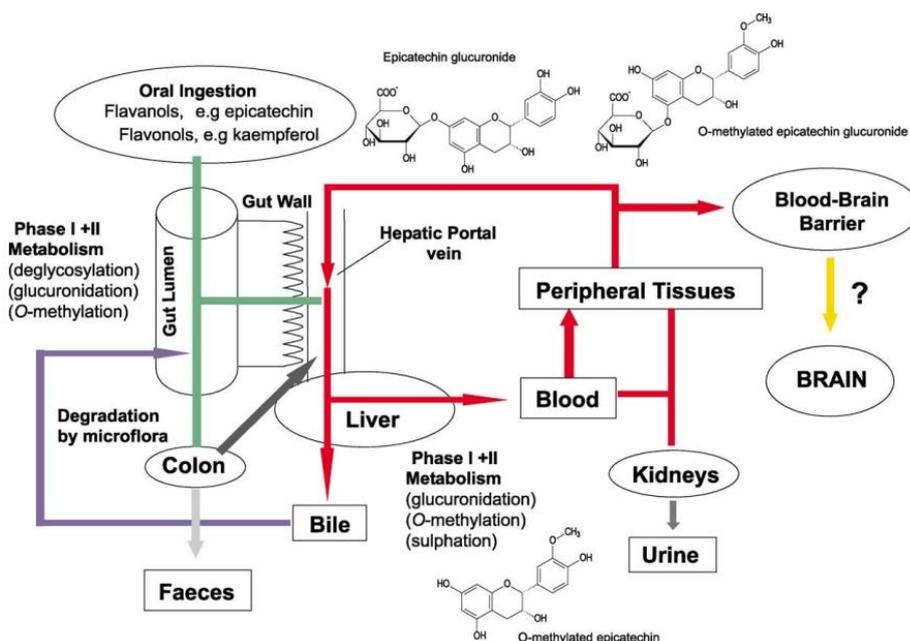


Figura 29. Absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos (adaptado de (Stahl et al., 2002))

Principalmente, los polifenoles se van a encontrar en aquellos tejidos donde se han metabolizado (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico), pero además también pueden acumularse en tejidos dianas específicos, como el tejido pulmonar, el pancreático, el cerebral, el cardíaco y el tejido esplénico (Quiñones et al., 2012). El endotelio es probable que sea uno de los primeros sitios de acción de los flavonoides (Manach et al., 2004). Los estudios en humanos han mostrado que la absorción de flavonoides presentes en la dieta se encuentra entre el 1 y 5% de la dosis ingerida (Serafini et al., 2010). En cambio, esta absorción es mucho más elevada (5-40%) cuando se ingieren suplementos enriquecidos o productos farmacéuticos.

Los efectos sistémicos de los polifenoles dietéticos, van a depender en gran medida de la acción sinérgica que éstos puedan ejercer después de entrar en la circulación, y se ven afectados por otros constituyentes presentes en la dieta así como por factores endógenos influyendo en el metabolismo de los carbohidratos a muchos niveles (Hanhineva et al., 2010):

- i) Inhibición de la digestión de carbohidratos y absorción de glucosa en el intestino;
- ii) Estimulación de la secreción de insulina de las células β -pancreáticas;
- iii) Modulación de la liberación de glucosa del hígado;
- iv) Activación de los receptores de insulina y captación de glucosa en tejidos sensibles a insulina;
- v) Modulación de la señalización en vías intercelulares y expresión génica

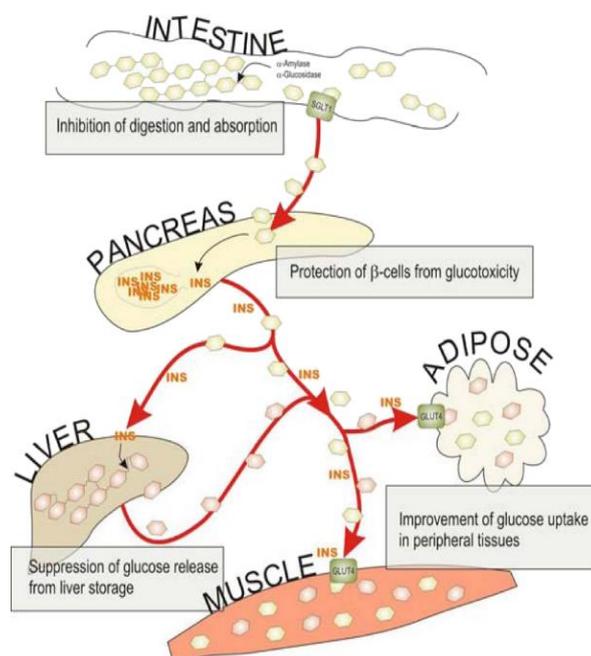


Figura 30. Posibles lugares de acción de los polifenoles sobre el metabolismo de los carbohidratos y homeostasis de la glucosa (adaptado de (Hanhineva et al., 2010))

Eliminación o excreción

Como se ha comentado anteriormente, los polifenoles y sus derivados son eliminados principalmente en la orina y la bilis. Los metabolitos conjugados se eliminan preferentemente en la bilis mientras que los conjugados más pequeños, tales como los monosulfatos se excretan por la orina (D'Archivio et al., 2007).

Cuando se eliminan en la bilis, los flavonoides pasan al duodeno y son metabolizados por las bacterias intestinales, formándose productos de fragmentación y/o la hidrólisis de glucurono o sulfoconjugados. Los metabolitos resultantes que se liberan pueden ser reabsorbidos y entrar en un ciclo enterohepático. La sustitución en la molécula de flavonoide, grado de polaridad y el peso molecular determina el grado de excreción biliar (Aherne and O'Brien, 2002).

Una parte importante de los polifenoles ingeridos (75-99%) no se encuentran en la orina. Esto implica que o bien no han sido absorbidos a través de la barrera del intestino, absorbidos y excretados en la bilis o bien han sido metabolizados por la microflora colónica o por nuestros propios tejidos (Scalbert and Williamson, 2000).

Diversos estudios han demostrado que el contenido de polifenoles no modificados presentes en la orina, varía según se trate de unos compuestos fenólicos u otros. Las concentraciones halladas en la orina son de 0,5-6% para algunas catequinas del té, de 2-10% para las catequinas del vino y de hasta un 30% para la epicatequina del cacao (Quiñones et al., 2012).

1.5.4 Efectos de los flavonoides

En plantas

Estos compuestos tienen efectos muy importantes en la bioquímica y fisiología de las plantas, en donde actúan como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, precursores de sustancias tóxicas, así como en la formación de pigmentos y filtros solares. También estos compuestos están involucrados en mecanismos de fotosensibilización y de transferencia de energía, regulando así las reacciones de crecimiento, de control de la respiración, la fotosíntesis, la morfogénesis y la defensa contra infecciones (Tenorio López et al., 2006).

Otras de sus funciones en muchas plantas, es la atracción de los insectos polinizadores por medio del color o del olor que les confieren a éstas o a sus flores, asegurando así su reproducción y conservación (Estrada-Reyes et al., 2012).

Actividades farmacológicas en humanos

Los flavonoides muestran una notable variedad de efectos bioquímicos y farmacológicos (Middleton et al., 2000) que ejercen una influencia positiva sobre la salud (Patel, 2008), estando potencialmente implicados en la prevención cardiovascular, principalmente por la disminución del EO y el aumento de la biodisponibilidad de NO (Grassi et al., 2010). Estudios epidemiológicos indican que un aumento en la ingesta de flavonoides dietéticos se asocia con un menor riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares (Serafini et al., 2010). Se trata por tanto, de compuestos muy beneficiosos a nivel cardiovascular (Shohaib et al., 2011) y esto se debe fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroescleróticas, antiinflamatorias, antiapoptóticas (Quiñones et al., 2012), antisquémica, antiarrítmica y antihipertensivas (Shohaib et al., 2011). También son importantes sus acciones antivirales y antialérgicas (González-Gallego et al., 2007). Todos estos efectos se describen a continuación con más detalle.

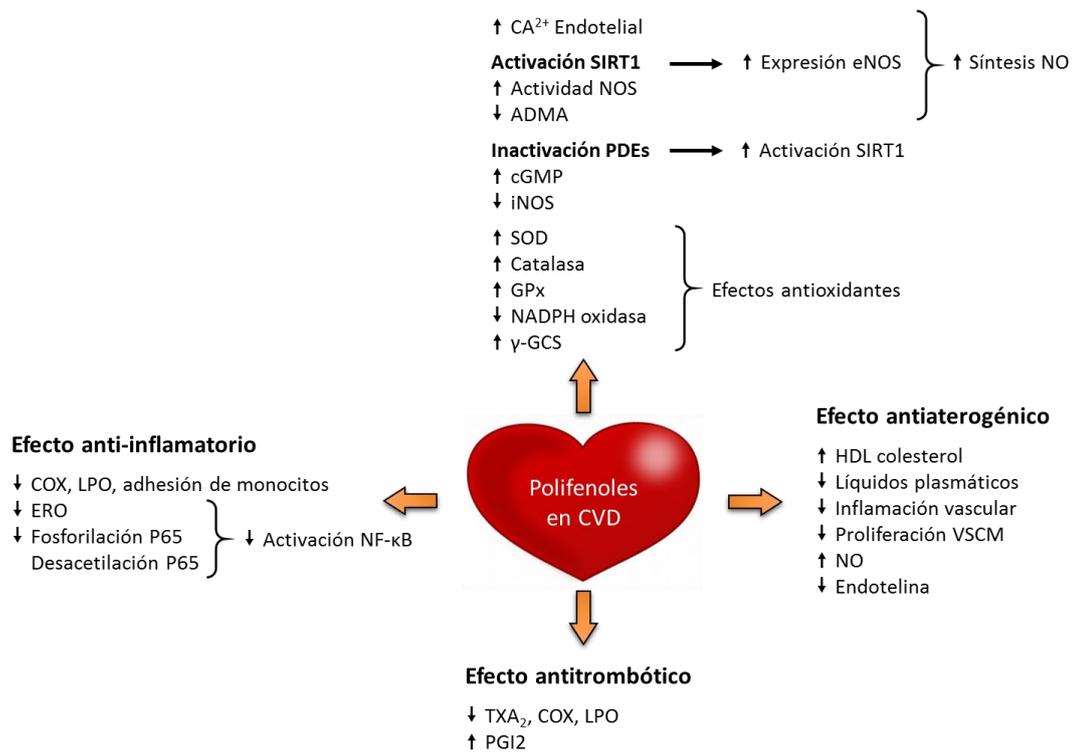


Figura 31. Efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la enfermedad cardiovascular (adaptado de (Quiñones et al., 2013))

- **Efectos antioxidantes**

Los mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides incluyen:

- 1) Eliminación de la formación de ERO ya sea por inhibición de enzimas o quelación de metales implicados en la producción de radicales libres
- 2) Pueden actuar como captadores (“scavengers”) de ERO y como antioxidantes rompedores de cadena, es decir, finalizan la cadena de formación de especies prooxidantes mediante la donación o aceptación tanto de un átomo de hidrógeno como de un electrón
- 3) La regulación o protección de las defensas antioxidantes (Pietta, 2000).

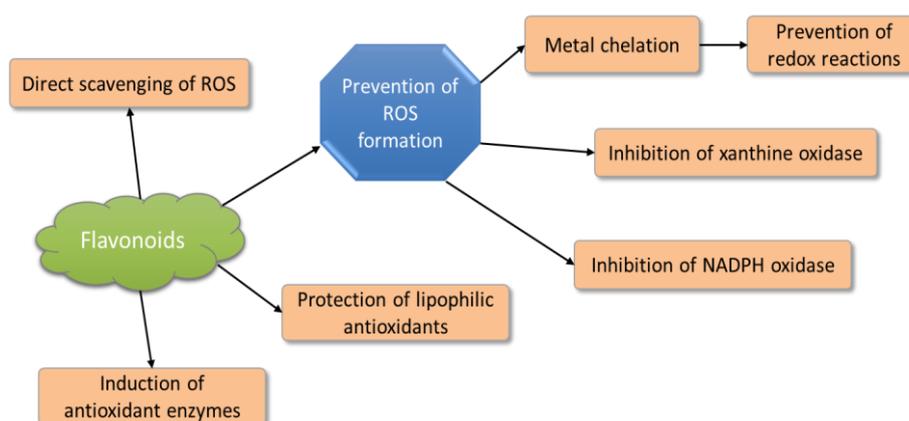


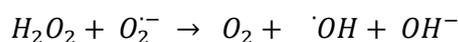
Figura 32. Mecanismos de los efectos antioxidantes de los flavonoides (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009))

(1) y (3) Los flavonoides inhiben las enzimas responsables de la producción del anión superóxido tales como la xantina oxidasa y la PKC. También inhiben la COX, LOX, monooxigenasa microsomal, glutatión S-transferasa y NADH oxidasa, todos implicados en la generación de ERO (Pietta, 2000).

Por otro lado, diversos flavonoides han mostrado su eficacia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Martínez-Flórez et al., 2002). Ensayos clínicos realizados, han puesto de manifiesto que los polifenoles disminuyen los niveles cardíacos de ERO y de malonildialdehído (MDA), un metabolito que se forma cuando las ERO y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas atacan los ácidos grasos de las membranas celulares (Quiñones et al., 2012).

También se ha demostrado que los polifenoles también pueden interactuar con los sistemas de detoxificación celular, como la SOD, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Curin and Andriantsitohaina, 2005), e incluso modular su expresión (actividad epigenética).

La quelación de metales de transición es una importante característica que contribuye a la alta capacidad antioxidante. Los flavonoides tienen una serie de características estructurales que les permiten quelatar iones de metales de transición divalentes tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} (González-Gallego et al., 2007), lo cual juega un importante papel en el metabolismo del oxígeno (Quiñones et al., 2012), evitando además que hierro y cobre potencien la formación de ERO por reducción de H_2O_2 con generación del altamente agresivo radical hidroxilo (reacción de Fenton y Haber-Weiss) (Pietta, 2000).



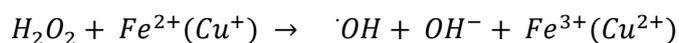


Figura 33. Reacción de Fenton (adaptado de (Pietta, 2000))

Además, estos metales son los son esenciales para muchas funciones fisiológicas, así como constituyentes de hemoproteínas y cofactores de diferentes enzimas, incluyendo aquellos implicados (hierro de la catalasa, cobre de ceruloplasmina y Cu, Zn-superóxido dismutasa) en la defensa antioxidante (Pietta, 2000).

Los flavonoides más comunes tienen dos o tres posibles sitios de unión al metal (I-III), aunque algunas estructuras adicionales muy poco comunes que presentan grupos hidroxilo en el anillo A pueden tener hasta seis (IV-VI) (figura 34). Los grupos ceto muestran una menor afinidad por el metal, por tanto, se prefiere el sitio I sobre el II y III. Sin embargo, el sitio II es el más probable para la quelación de los iones metálicos de Fe (Halbwirth, 2010).

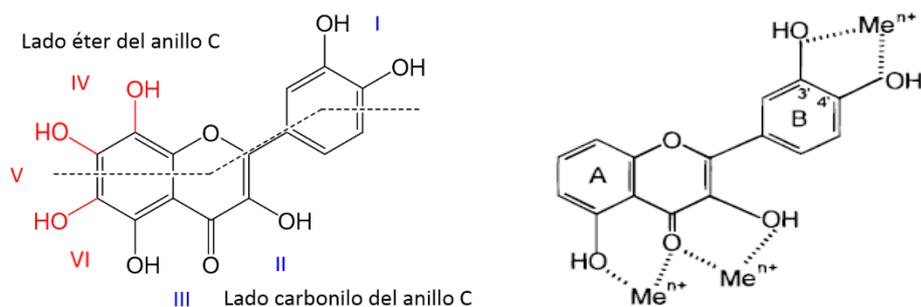


Figura 34. Posibles sitios de unión de metales a flavonoides (adaptado de (Halbwirth, 2010))

- (2) Debido a sus bajos potenciales redox (0,23-0,75V), los flavonoides (FI-OH) son termodinámicamente capaces de reducir radicales libres altamente oxidantes con potenciales redox en torno al rango 2,13-1,0 V, tales como superóxido, peroxilo, alcoxilo e hidroxilo mediante donación de un átomo de hidrógeno (Meng et al., 2010). Los radicales se hacen inactivos según la siguiente reacción:

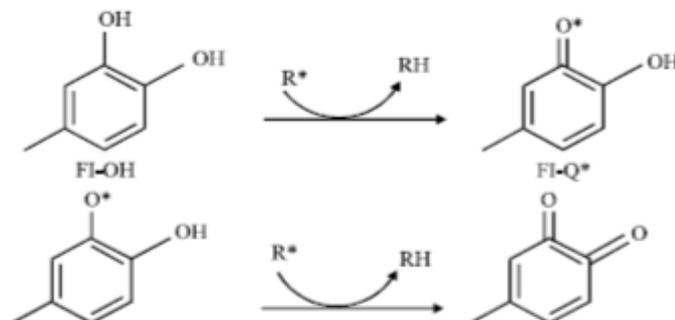


Figura 35. Captación de ERO por los flavonoides (adaptado de (Gupta et al., 2010))

donde $R\cdot$ es un radical libre y $O\cdot$ es un radical libre de oxígeno (Nijveldt et al., 2001) mucho menos reactivo, ya que en él, los electrones desapareados están más deslocalizados (Quiñones et al., 2012).

Así pues, la capacidad antioxidante de los flavonoides depende no sólo del potencial redox del par $Fl-O\cdot / Fl-OH$ sino también de las posibles reacciones laterales del radical aroxilo. La captación de superóxido es particularmente importante, debido a que este radical es uno de los más ubicuos en las células aeróbicas y a pesar de su leve actividad, es un potencial precursor del radical hidroxilo en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss ((Gupta et al., 2010); (Pietta, 2000)).

Es importante aclarar que los antioxidantes polifenólicos, entre ellos los flavonoides, no son realmente capaces de captar y bloquear en condiciones fisiológicas radicales como el hidroxilo ($OH\cdot$), y superóxido ($O_2\cdot^-$) con vidas medias comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-9} s aunque sí lo son respecto a radicales lipídicos o hidroperóxidos.

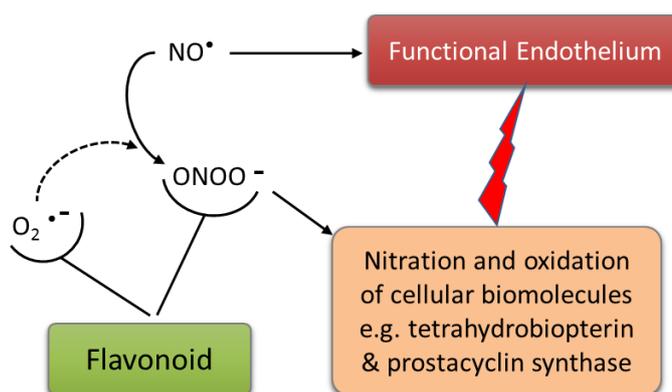


Figura 36. Flavonoide captando superóxido y peroxinitrito (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009))

En definitiva, tras el proceso de actuación como antioxidante, el radical aroxilo $Fl-O\cdot$ (radical flavínico) puede reaccionar con un segundo radical, adquiriendo una estructura estable de quinona (Pietta, 2000). También podría interactuar con oxígeno, generando quinonas y anión superóxido, en lugar de terminar las reacciones de cadena. Esta última reacción tiene lugar en presencia de altos niveles de metales de transición y es responsable de los no deseados efectos prooxidantes de los flavonoides. Por ello, para evitar dichos efectos, la estructura molecular del flavonoide empleado potencialmente como antioxidante deberá incluir una serie de elementos estructurales que se detallan a continuación:

- Presencia de una estructura O-dihidroxi en el anillo B (posiciones 3', 4'), lo que le confiere una mayor estabilidad a la forma radical por el

incremento en la capacidad de deslocalización de los electrones (Martínez-Flórez et al., 2002) (Figura 37i).

- Presencia de un grupo pirogalol (trihidroxi) en el anillo B de un catecol, como mircetina, lo que produce aún mayor actividad. El doble enlace en 2 y 3 del anillo C parece aumentar la actividad captadora porque confiere estabilidad al radical fenoxi producido (Jain et al., 2010).
- El grupo oxo (C=O) en la posición 4 del anillo C especialmente en asociación con doble enlace en posiciones C2 y C3, aumenta la actividad captadora por deslocalización de electrones del anillo B.
- La presencia de un grupo OH- en las posición 3 del anillo C, genera un captador extremadamente activo (Figura 37ii) (Jain et al., 2010).
- Un grupo meta 5 y 7 dihidroxi en el anillo A en combinación con el grupo 4-oxo también pueden añadir potencial captador en ciertos casos (Figura 37iii). Esto es debido a que se consigue una buena estabilización radicalaria por deslocalización del electrón desapareado en la estructura del radical aroxilo (Halbwirth, 2010).

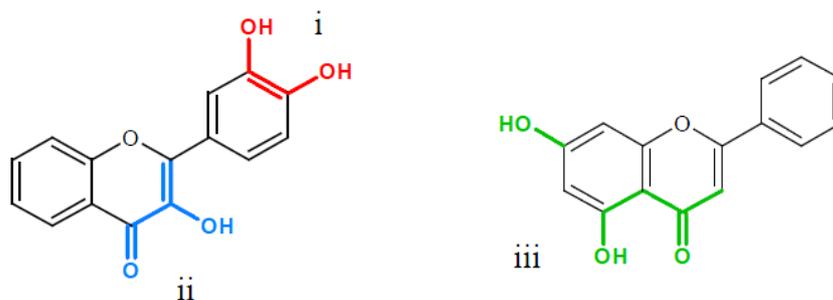


Figura 37. Los tres principales requisitos estructurales de los flavonoides para tener un alto potencial antioxidante (adaptado de (Halbwirth, 2010))

Por tanto, los flavonoles y flavonas que contienen un grupo catecol en el anillo B, son muy activos, siendo los flavonoles más potentes que las flavonas debido a la presencia del grupo 3-hidroxilo. La glicosilación de este grupo, como ocurre en la rutina, reduce en gran medida la capacidad de captación de radicales libres. Los flavanoles y flavanonas debido a la falta de conjugación proporcionada por el doble enlace en posiciones C2 y C3 con el grupo 4-oxo, son débilmente antioxidantes. En el caso de las isoflavonas, la ubicación del anillo B en la posición 3 del anillo heterocíclico afecta en un gran grado a la capacidad captadora (Pietta, 2000).

En base a estos criterios, la actividad captadora de los flavonoides sigue el siguiente orden (Jain et al., 2010):

miricetina (3,3',4,5',5,7-hexahidroxi-flavona) >
quercetina (5,7,3',4'tetrahidroxi-flavonol) >
rhamnetina (3,3',4',5-tetrahidroxi-7-metoxi-flavona) >
morina (2-(2,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicromon-4-ona) >
diosmetina (3',5,7-trihidroxio-4'-metoxi-flavona) >
naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavonona) >
apigenina (4',5,7-trihidroxiflavona) >
catequina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromona-3,5,7-triol) >
5,7-dihidroxio-3', 4', 5'-trimetoxi-flavona >
robinina (kaempferol-3-O-robinósido-7-O-rhamnósido) >
kaempferol (3,5,7-trihidroxio-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona) >
flavona (2-fenil-1-benzopiran-4-ona).

Por último, indicar que aunque algunos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, estas se producen sólo a dosis muy elevadas, fisiológicamente irrazonables (Martínez-Flórez et al., 2002).

- **Efectos anti-inflamatorio**

La inflamación es un proceso biológico inducido por una infección microbiana o lesión de un tejido (García-Lafuente et al., 2009). La artritis es un término general que describe la inflamación en las articulaciones. Algunos tipos de artritis incluyen: artritis reumatoide o artritis gotosa y polimialgia reumática (Rajasekaran et al., 2008). Se ha demostrado que los flavonoides son capaces de inhibir una serie de enzimas que se activan en el curso del proceso inflamatorio. Entre las actividades anti-inflamatorias de estos compuestos se incluyen:

- Inhibición de enzimas pro-inflamatorias
 - Inhibición de enzimas pro-inflamatorias tales como COX-2, la lipoxigenasa (LOX) y la iNOS, a través de la activación del receptor activado por el factor proliferador de peroxisomas gamma (PPAR γ) (Santangelo et al., 2007).
 - Inhibición de fosfoinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa), tirosina quinasas, factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B), gen C-JUN (Santangelo et al., 2007) y activación de la proteína activadora-1 (AP-1) (Serafini et al., 2010).
 - Activación de enzimas detoxificantes de fase II, protein quinasa activada por mitógeno (MAPK), protein quinasa C (PKC), serina /treonina protein quinasa Akt/PBK (Santangelo et al., 2007); (Serafini et al., 2010) y factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2p45 (Nrf2) (Serafini et al., 2010).
- Modulación de la producción de moléculas pro-inflamatorias (citoquinas y quimiocinas)

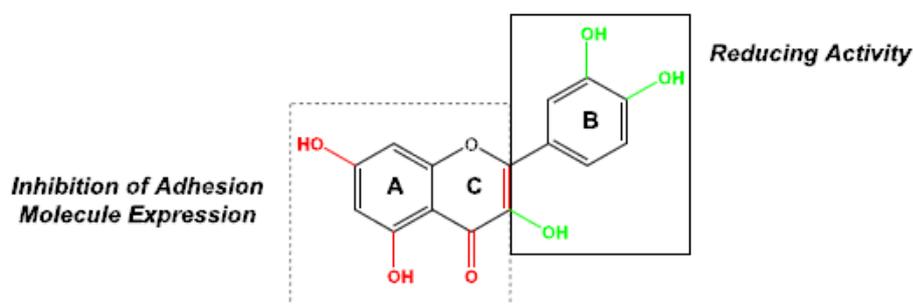


Figura 39. Características estructurales de las actividades antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides (adaptado de (Lotito and Frei, 2006))

Sólo las flavonas monohidroxiladas (sobre todo) como apigenina y crisina y algunos flavonoles tales como galangina, kaemferol y quercetina han sido capaces de inhibir la expresión endotelial de moléculas de adhesión. Sin embargo, flavonas polisustituidas, algunas flavanonas y flavan-3-oles, parecen resultar ineficaces.

Por tanto, los efectos inflamatorios de los flavonoides en la expresión endotelial en moléculas de adhesión depende de su estructura molecular, su concentración y transformación metabólica pero no de su actividad antioxidante (Lotito and Frei, 2006). La apigenina, luteonina y hesperidina son flavonoides con actividad antiinflamatoria (Raj et al., 2001). Existe en la actualidad, un gran interés en la aplicación de flavonoides en el tratamiento de la EII (Enfermedad Inflamatoria Intestinal) (Ballester et al., 2006).

- **Propiedades antihipertensivas**

Hay evidencias experimentales de que algunas subclases de flavonoides ejercen efectos beneficiosos sobre la PA mediante el aumento de NO derivado del endotelio, a través de la modulación de la actividad y expresión de la eNOS, cambios en la disponibilidad de sustratos de la eNOS o mediante la prevención de la conversión de radicales libres derivados del NO (por el ONOO⁻), causada por enzimas tales como NADPH oxidasa. Así por ejemplo, las antocianinas y flavonas y algunas flavan-3-ol compuestos pueden contribuir a la prevención de la hipertensión. Estas propiedades vasodilatadoras pueden resultar de similitudes estructurales específicas (tales como la hidroxilación en el anillo B y el patrón de metoxilación) (Cassidy et al., 2011).

Recientemente se ha encontrado que tanto la quercetina como metabolitos metilados de ésta, ejercen efectos antihipertensivos y reducen la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la ED y mejoran el estatus oxidativo plasmático y hepático (Tenorio López et al., 2006). Los efectos de protección endotelial de estos compuestos pueden estar relacionados con con la inhibición de la síntesis de ET-1 o arginasa, aumentando la disponibilidad de L-Arginina la cual constituye el factor limitante en la producción celular de NO (Weseler and Bast, 2010).

Por otro lado, la reabsorción de Na en el riñón es uno de los factores clave en la regulación de la presión sanguínea mediante el control del volumen del líquido extracelular del cuerpo. En el riñón, la reabsorción de Na a través de las células epiteliales de la nefrona distal juega un papel importante en el control del volumen de fluido extracelular. El transporte de Na epitelial se lleva a cabo en dos pasos:

- 1) El primer paso es la entrada de Na⁺ en el espacio citosólico a través de la membrana apical vía canal de Na epitelial sensitivo a amilorida (ENaC)
- 2) El segundo paso es la extrusión de Na⁺ desde el espacio citosólico a través de la membrana basolateral por el Na⁺, K⁺-ATP asa (Aoi et al., 2007).

Este canal tiene un papel crucial en el mecanismo mediante el cual los flavonoides disminuyen la PA (Tenorio López et al., 2006) debido a que la regulación de su actividad y expresión, es fundamental en la homeostasis de la presión sanguínea. De hecho, mutaciones de ENaC se ha demostrado que contribuyen a perturbaciones heredables de la PA tales como el síndrome de Liddle y pseudohipoaldosteronismo tipo 1 (PHA-1) (Aoi et al., 2007). Además, todas las formas genéticas conocidas de hipertensión resultan de un aumento en la absorción de Na⁺ a través de ENaC, ya sea mediante la alteración de la función o regulación del canal (Snyder, 2002).

El ENaC es un efector final en el RAAS y reside en la membrana plasmática apical de los conductos colectores renales corticales, en los que la reabsorción de Na⁺ a través de ENaC es el paso final para el reajuste renal del equilibrio de Na⁺. Debido a su regulación y función, el ENaC juega un papel crítico en la modulación de la homeostasis de Na⁺ y por lo tanto en la PA crónica (Sun et al., 2011).

El canal ENaC está compuesto de tres subunidades (α -, β - y γ -ENaC) que comparten el 30-35% de la secuencia identificativa. Una cuarta subunidad, δ -ENaC, puede sustituir funcionalmente a α -ENaC, aunque el papel fisiológico de esta subunidad no se conoce todavía. Las subunidades de ENaC tienen dos segmentos de membrana, citoplasmática N y C terminal, y un amplio dominio extracelular glicosilado (Snyder, 2002).

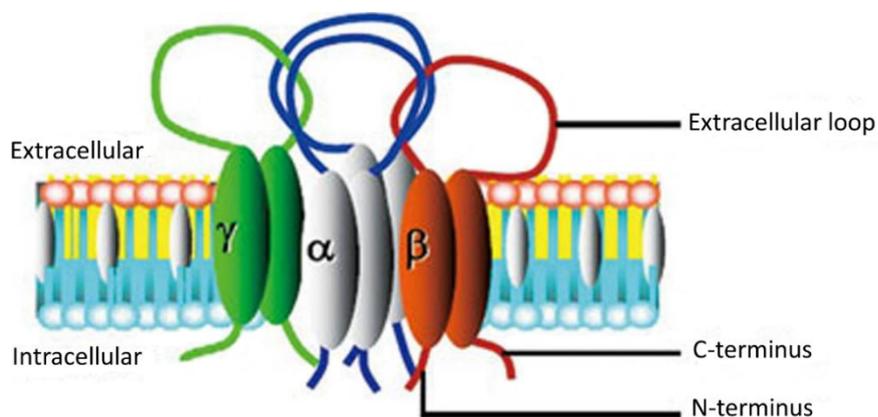


Figura 40. Topología del ENaC (adaptado de (Sun et al., 2011))

El SRAA juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de Na^+ y en la defensa contra la hipovolemia e hipotensión. Los incrementos en plasma de aldosterona estimulan la absorción de Na^+ en el conducto colector del riñón y colón distal, en parte por el aumento de la velocidad de entrada de Na^+ a través de ENaC. Asimismo, la aldosterona aumenta la actividad de la $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ basolateral facilitando la salida de Na^+ desde la célula (Snyder, 2002).

Las células endoteliales son un blanco para la aldosterona, que activa el ENaC situado apicalmente, y su actividad modifica las propiedades biomecánicas del endotelio. Por tanto, ENaC es un mediador clave en el control de la PA dependiente de aldosterona en el endotelio (Sun et al., 2011).

La reducción de aldosterona en plasma causa una disminución del nivel de ARNm de la subunidad α -ENaC (Sun et al., 2011). Se ha demostrado que la quercetina disminuye la expresión en el mRNA del α -ENaC, observando una clara disminución en las cifras de PAS elevada debido a una dieta alta en sal, lo que sugiere que uno de los mecanismos de los efectos antihipertensivos de los flavonoides en la HTA sensible a sal podría estar mediado por la regulación de la expresión del ENaC en el riñón (Aoi et al., 2004).

La vasopresina es la otra importante hormona que regula la absorción de Na^+ . En respuesta a hipovolemia, hipotensión o cambios osmóticos, la vasopresina se libera en la sangre por el hipotálamo. En el conducto colector del riñón, se une a los receptores V2 de la membrana basolateral, lo cual activa la adenil ciclasa, resultando en un aumento de de cAMP celular (Snyder, 2002).

La inhibición endotelial de ENaC puede activar la NOS, siendo completamente posible que el flujo de sangre alterado (estimulación por rozamiento), el cual es causado por más reabsorción de Na^+ a través de ENaC situado en la nefrona distal, pueda afectar a la producción de NO en el endotelio (Sun et al., 2011).

Por último, también se ha demostrado que ciertos flavonoides pueden tener un efecto inhibitorio sobre la ECA, lo cual podría jugar un papel importante en la regulación de la PA. Las principales características en las estructuras de los flavonoides que aumentan la actividad inhibitoria serían: un grupo catecol en el anillo B, un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C y un grupo cetona en el carbono 4 del anillo C. Adicionalmente se ha establecido también la influencia sobre esta capacidad de inhibición de los distintos grupos funcionales presentes en las moléculas de los flavonoides; este orden sería: el doble enlace entre el carbono 2 y 3 del anillo C > 4'-O-metoxilación \approx grupo carbonilo en el carbono 4 > 3'-hidroxilación > 3-hidroxilación > 3-O-glicosilación (Guerrero et al., 2012).

- **Efectos vasodilatadores y vasoconstrictores**

El consumo de flavonoides puede prevenir la DE mediante la mejora del proceso vasorelajante conduciendo a una reducción de la PA evitando enfermedades

cardiovasculares que incluyen la hipertensión y la aterosclerosis ((Tapas et al., 2008); (Jain et al., 2010)).

Los estudios realizados han revelado que el efecto vasodilatador de los flavonoides, se debe principalmente a la producción de NO en el endotelio y al aumento del guanosín monofosfato cíclico (GMPC). Recientemente se ha descrito, además, que esta mejora en la función vascular está relacionada con mecanismos dependientes de la guanilil ciclasa soluble (Quiñones et al., 2012).

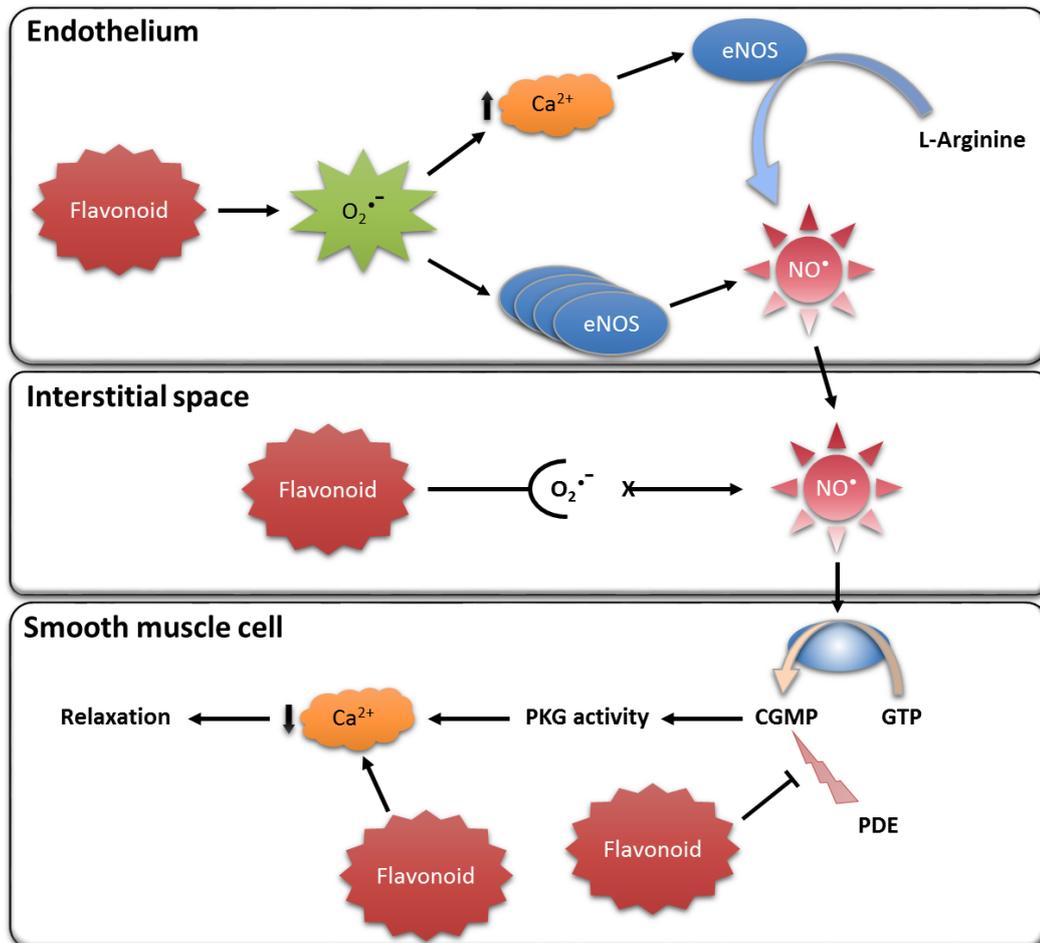


Figura 41. Efecto de los flavonoides sobre la relajación dependiente de endotelio (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009))

Las acciones de los polifenoles que dan lugar a una mayor disponibilidad de NO y a un mantenimiento de la presión arterial son:

- i) Incremento de la expresión y/o actividad de la eNOS;
- ii) Disminución y/o expresión de la actividad de NOX, la cual es la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ en la vasculatura;
- iii) Modulación de enzimas y receptores asociados a la producción de ERO, por ejemplo, la ECA, ATP1, vías mediadas por Ang II, etc. (Galleano et al., 2010). Habría

además que señalar, que estos compuestos también pueden inhibir la ECA, y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Quiñones et al., 2012).

Los flavonoides también ejercen un efecto vasodilatador en el músculo liso vascular aislado (Álvarez and Orallo, 2003) estando el mecanismo de esta acción relacionado con la inhibición de la proteína cinasa C (PKC), pudiendo también contribuir la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) de nucleótidos cíclicos y/o disminución de la absorción de calcio (Herrera et al., 1996). Tres de ellos, han mostrado tener un efecto vasodilatador en el siguiente orden de potencia: luteolina> eriodictiol>naringenina en aortas torácicas de rata (Raj et al., 2001).

Por lo que se refiere a los efectos vasoconstrictores, determinados flavonoides tienen una acción bifásica sobre los vasos sanguíneos: vasoconstrictora a las concentraciones más bajas y vasodilatadora a concentraciones mayores. Es el caso de aquellos compuestos con una triple sustitución hidroxílica en posiciones contiguas de los anillos A o B, como la baicaleína y la miricetina. *Berger et al* (Berger et al., 1992) comprobaron que el efecto es postsináptico e independiente de la ruta del ácido araquidónico, de la metabolización o recaptación de las catecolaminas e incluso de las propias catecolaminas. Se trata de una potenciación no específica del efecto contráctil. En trabajos posteriores se determinó que la actividad vasoconstrictora, a bajas concentraciones, de la baicaleína y la miricetina depende del endotelio, y puede deberse a la inhibición de la producción y/o de la liberación de NO o a la estimulación de la liberación de TXA₂, respectivamente (Álvarez and Orallo, 2003).

- **Efectos antiarterioscleróticos**

Otra propiedad significativa de los compuestos polifenólicos es su capacidad de reducir la sensibilidad a la oxidación de lípidos (Curin and Andriantsitohaina, 2005). Un incremento de las LDL y en especial de las LDL oxidadas (oxLDL) es uno de los factores de riesgo de enfermedad coronaria (Álvarez and Orallo, 2003). Además, se conoce que la disfunción endotelial inducida por oxLDL, es un proceso clave en el desarrollo de la aterosclerosis (Yi et al., 2011).

La aterosclerosis se caracteriza por la progresiva obstrucción de las arterias como consecuencia de la acumulación de lípidos en la pared arterial, los cuales atraviesan el endotelio y se oxidan en las células endoteliales, en las células de la musculatura lisa vascular (SMC) y en los macrófagos (Curin and Andriantsitohaina, 2005).

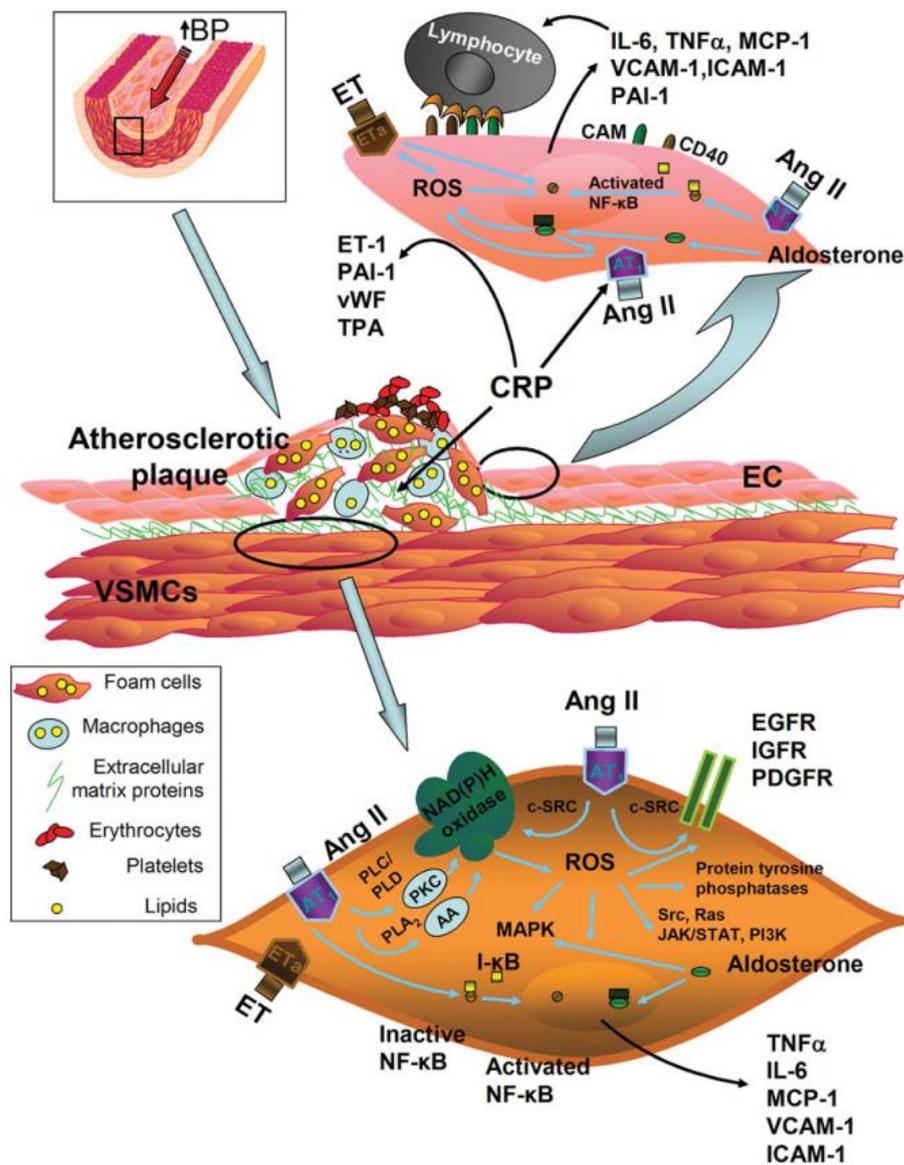


Figura 42. Mecanismos moleculares de inflamación vascular (adaptado de (Savoia and Schiffrin, 2007))

Los compuestos polifenólicos son capaces de atenuar el inicio y la progresión de esta enfermedad debido a su habilidad para inhibir la oxidación de las LDL. Son capaces además de producir un incremento en la concentración de colesterol HDL en el plasma, y también de inhibir la proliferación del músculo liso vascular (Quiñones et al., 2012).

Aunque no se han determinado los mecanismos por los cuales los flavonoides inhiben la oxidación de LDL, se han propuesto las siguientes posibilidades:

- 1) Pueden reducir la generación o liberación de radicales libres en los macrófagos o pueden proteger al α -tocoferol en el LDL, de la oxidación mediante los radicales libres (Jain et al., 2010). Además pueden inhibir enzimas estratégicas celulares como

NADPH-oxidasa, xantina oxidasa, 15-lipoxigenasa, citocromo P450 y mieloperoxidasa (Álvarez and Orallo, 2003).

- 2) Los flavonoides podrían regenerar α -tocoferol por donación de un átomo de hidrógeno al radical α -tocoferilo.
- 3) Los flavonoides pueden secuestrar iones metálicos, tales como hierro y cobre, disminuyendo así los radicales libres generados en el medio a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss ((Benavente-García and Castillo, 2008); (Jain et al., 2010)).

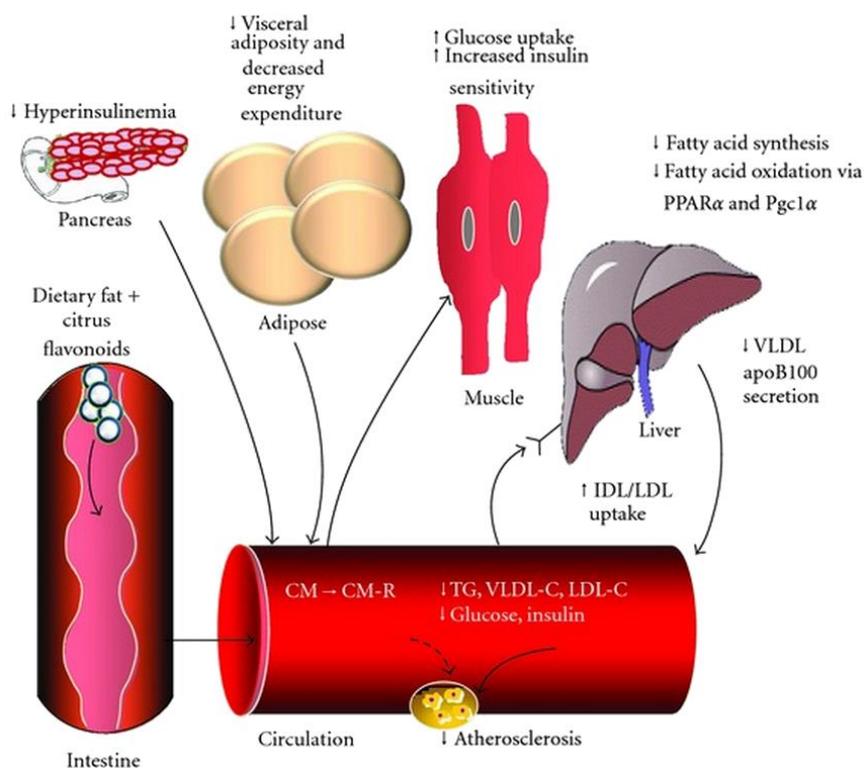


Figura 43. Posibles mecanismos para la reducción de los factores de riesgo en la aterosclerosis por los flavonoides (adaptado de (Mulvihill and Huff, 2012))

Por otro lado, se ha demostrado que la disfunción vascular endotelial inducida por el EO, desempeña un papel importante en la etapa de iniciación de la aterosclerosis. En este sentido, hay evidencias de que ciertas estructuras químicas de 4-oxo-flavonoides han sido cruciales para inhibir los efectos sobre dicha disfunción endotelial.

La presencia de 3',4'-orto-dihidroxiilo sobre el anillo B, un 3-hidroxiilo sobre el anillo C y un doble enlace en posición 2,3 y 5,7-meta-dihidroxiilo parecen ser los principales requerimientos estructurales necesarios para los efectos inhibidores sobre la disfunción endotelial.

Las isoflavonas, las cuales poseen el anillo B sustituido en C3 en lugar de la posición C2 del anillo C, podrían mejorar la liberación de NO en las células endoteliales, lo cual sugiere que la posición sustituida del anillo B puede influir en gran medida en la función secretora de las células endoteliales (Yi et al., 2011).

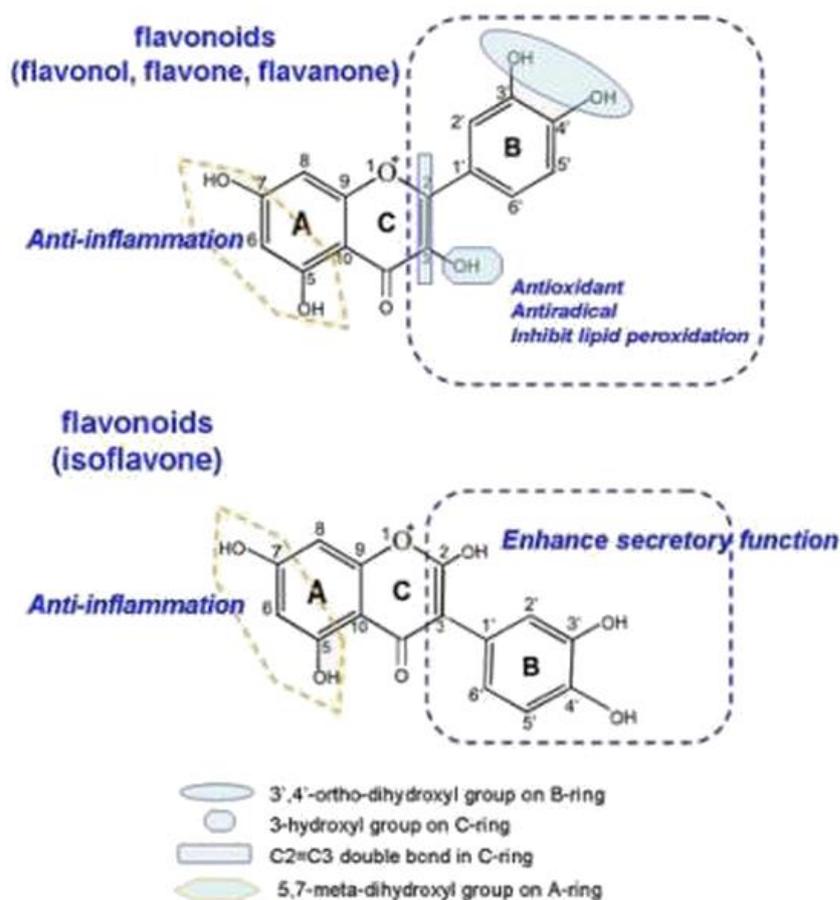


Figura 44. Representación esquemática de los requerimientos químicos de los 4-oxo-flavonoides para la inhibición de la disfunción endotelial (adaptado de (Yi et al., 2011))

Además, se ha encontrado que los flavonoides tales como la miricetina, quercetina, genisteína, apigenina y luteolina, poseen una actividad significativa en la inhibición de la DE (Yi et al., 2011).

• Efectos antitrombóticos

La agregación plaquetaria juega un papel fundamental en la fisiología de las enfermedades trombóticas y contribuye tanto al desarrollo de la aterosclerosis como a la formación aguda del trombo plaquetario (Agrawal, 2011). Tras la lesión vascular, las plaquetas se adhieren al subendotelio expuesto, se activan y se segregan ligandos biológicamente activos que incluyen difosfato de adenosina (ADP), serotonina y TXA_2 que es un potente vasoconstrictor y agonista de las plaquetas que a concentraciones micromolares, hace que éstas cambien su forma discoidal a esferas y conduce al reclutamiento y deposición de células circulantes en el lugar de la lesión y expansión de trombos (Guerrero et al., 2005).

El efecto antitrombótico de los polifenoles puede justificarse en base a su capacidad para inhibir enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides, como el TXA_2 , la COX, y la

lipooxigenasa (LPO) (Curin and Andriantsitohaina, 2005). Se ha demostrado que la quercetina inhibe las respuestas de las plaquetas inducidas por colágeno a través del bloqueo selectivo de la vía de señalización de la glicoproteína VI (Benavente-García and Castillo, 2008).

También se postula que tienen una actividad anticoagulante por inhibición de NAD(P)H: quinina aceptor oxidoreductasa, un enzima inhibido por anticoagulantes orales o por la interferencia a la exposición de fosfatidilserina (Guerrero et al., 2005).

Además de sus potenciales efectos sobre las vías de señalización, la unión de flavonoides a células receptoras también se ha postulado como posible mecanismo para su actividad antitrombótica. Así pues, se ha sugerido que las flavononas bloquean tanto los receptores de adenosina como el factor von Willebrand que une la plaqueta a la glicoproteína Ib α . Hay tres flavonoides representativos que inhiben las respuestas mediadas por el TXA₂, agipenina, genisteína y luteonina con una inhibición de la reactividad similar a la causada por la aspirina (Guerrero et al., 2005).

La fuerte unión de flavonoides a receptores de TXA₂, está influenciada por ciertas características que afectan a sus propiedades estéricas y electrostáticas. En efecto, la glicosilación (rutina) podría aumentar el tamaño de los flavonoides, complicando así la unión al receptor mientras que la metilación (diosmetina) podría disminuir la afinidad por los receptores de TXA₂ debido al cambio en la carga eléctrica del fármaco. Además, la presencia de un doble enlace en los carbonos 2 y 3 y/o un grupo ceto en el carbono 4, se consideran importantes para la unión de receptores de TXA₂, resultando la falta de tales sustituyentes en el anillo (catequina) derivando en una disminución de la afinidad de estos compuestos por el receptor (Guerrero et al., 2005).

Finalmente, los flavonoides de la familia flavan-3-oles (flavanoles), presentes en el vino tinto, té negro, cerezas y cacao (Tenorio López et al., 2006), son particularmente antitrombóticos debido fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes, siendo capaces de captar ciertos radicales libres manteniendo de ese modo la concentración adecuada de prostaciclina endotelial y de NO (Jain et al., 2010).

- **Efectos apoptótico y antiapoptótico**

La apoptosis o “muerte celular programada” es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que tiene lugar de forma fisiológica durante la morfogénesis y la renovación tisular, y también en los procesos de regulación del sistema inmunitario. La regulación de la proliferación y de la muerte celular por apoptosis en las células del músculo liso vascular, es un factor importante para la configuración de la estructura normal de la pared vascular en condiciones fisiológicas. Cuando ocurre este fenómeno, se produce una acumulación de células en el tejido del músculo liso y consecuentemente se produce un engrosamiento de la capa media y de la pared de las arterias pequeñas, que es característico de la hipertensión (Quiñones et al., 2012).

La apoptosis es además el principal mecanismo de muerte celular en el endotelio en condiciones fisiológicas. Los polifenoles pueden modular el nivel de expresión de distintos factores pro-apópticos (Quiñones et al., 2012), la actividad de las caspasas y también pueden modular el nivel de expresión de proteínas protectoras (Bcl-2, Bcl-xL, A1) o factores pro-apópticos (Bax, bid, Bak). Recientemente, se ha demostrado que la delfinidina es capaz de proteger las células endoteliales contra la apoptosis (Curin and Andriantsitohaina, 2005).

- **Insuficiencia venolinfática**

El reflujo venoso es la causa más común de los trastornos hemodinámicos venosos y produce hipertensión venosa (Recek, 2004). Los flavonoides son la familia más importante de fármacos flebotrópicos. Sus propiedades venoprotectoras y venotónicas han resultado de utilidad clínica en el tratamiento de la insuficiencia venosa (disminución de la capacidad de retorno de la sangre desde las piernas hasta el corazón). En el tratamiento de esta fisiopatología destaca Daflón 500 mg que es una fracción flavónica micronizada, compuesta por una mezcla de diosmina (90%) y hesperidina (10%) y que actúa contra la enfermedad a todos los niveles: venas, linfa y microcirculación (Álvarez and Orallo, 2003).

- **Acción anticancerígena (antineoplásica)**

La carcinogénesis es un proceso a largo plazo y los factores epigenéticos y genéticos pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Los cambios epigenéticos, como la metilación del ADN, modificaciones de histonas y microRNAs, son fácilmente influenciados por factores dietéticos y ambientales. Los polifenoles de la dieta pueden influir en estas tres modificaciones epigenéticas, lo que a su vez contribuye a su potencial quimiopreventivo (Link et al., 2010).

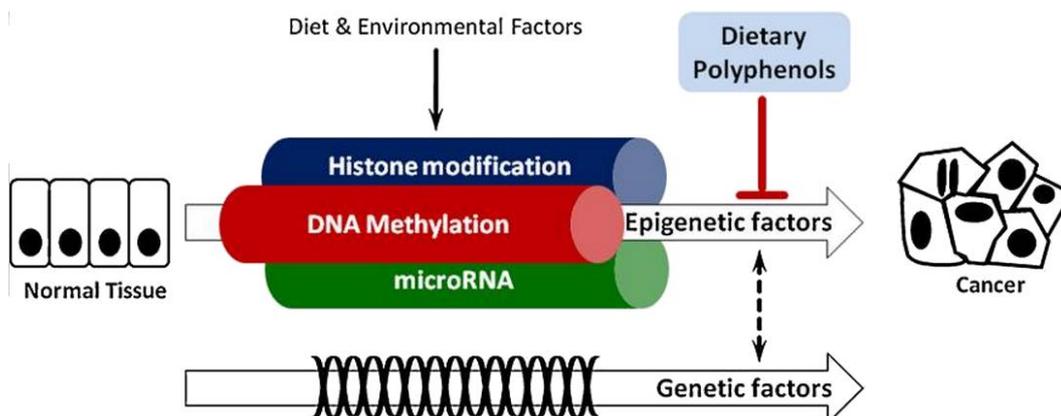


Figura 45. Mecanismos epigenéticos implicados en la carcinogénesis (adaptado de (Link et al., 2010))

Los flavonoides son unos eficaces y naturales inhibidores de la invasión del cáncer y metástasis siendo ésta la causa principal de muertes relacionadas con cáncer y que se produce a través de varios procesos interconectados que comienzan con la entrada de

células del tumor primario en la vasculatura, migración hacia órganos distantes, adhesión a células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos y extravasación la cual conduce a la infiltración en el tejido subyacente (Weng and Yen, 2012).

La acción anticancerígena de los flavonoides se produce a través de cinco procesos:

1) Estimulación de la desintoxicación enzimática de la fase II

Los flavonoides son agonistas de las enzimas de desintoxicación de la fase II que catalizan las reacciones que promueven la excreción de productos químicos potencialmente tóxicos o carcinógenos.

2) Preservación de la regulación normal del ciclo celular

Este proceso activa los caminos que conducen a muerte de la célula (apoptosis) si el daño en la replicación del ADN ha sido irremediable (Paredes and Clemente, 2005).

3) Inhibición de la proliferación y activación de la apoptosis

Los efectos antiproliferativos de los flavonoides están mediados por la inhibición de varios quinasas e inhibidores quinasas, implicados en la inhibición del ciclo celular y la apoptosis y depende de la estructura particular de cada flavonoide, aunque una estructura plana y al menos dos sustituyentes pequeños (hidroxilo o metoxilo) en los anillos A y B del esqueleto del flavonoide son esenciales (Benavente-García et al., 2007).

Algunos flavonoides como la apigenina, fisetina y luteonina empiezan a ser potenciales inhibidores de la proliferación celular (Agrawal, 2011).

Se ha demostrado que ciertos polifenoles del vino (quercetina, rutina, ácidos gálico y tánico) inducen la apoptosis de células de cáncer de próstata (Martínez, 2005).

4) Inhibición de la invasión del tumor y de la angiogénesis

Los tumores invasores deben desarrollarse en los nuevos vasos sanguíneos por un proceso conocido como angiogénesis para aprovisionarse de nutrientes en su rápido crecimiento. Los flavonoides evitarían que las células cancerosas invadan el tejido normal (proceso conducido por las enzimas llamadas metaloproteinasas) (Paredes and Clemente, 2005) siendo capaces de inhibir varias etapas clave de la angiogénesis tales como la proliferación y migración de células del músculo liso vascular y la expresión de dos factores principales proangiogénicos, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y metaloproteinasas de matriz-2 (MMP-2). La quercetina y sus derivados son los flavonoides más ampliamente estudiados encontrándose que inhiben varias etapas de la angiogénesis (Benavente-García et al., 2007).

5) Disminución de la inflamación

Ésta puede dar lugar a una producción local y creciente de radicales libres por las enzimas inflamatorias, así como el lanzamiento de los mediadores que promueven la proliferación y la angiogénesis de la célula, y que simultáneamente inhiben la apoptosis (Paredes and Clemente, 2005).

Las propiedades antiinvasivas y antimetastásicas de los flavonoides en varios tipos de cáncer incluyendo el cerebral, oral, tiroides, hipofaríngeo, de mama, de pulmón, hígado, del tracto biliar, gástrico, pancreático, intestinal, de colon, renal, de ovario, de cuello uterino, de próstata, epidérmico, fibrosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi y melanoma (Weng and Yen, 2012).

- **Efectos sobre el sistema gastrointestinal**

- Anti-ulcerosa

Algunos autores, indican que muchos flavonoides poseen actividad anti-ulcerogénica (Raj et al., 2001), así las catequinas actúan como agentes antiulcerosos mediante la inhibición de la H^+ / K ATPasa.

Por otro lado, se ha estudiado la capacidad de inhibición que presentan ciertos flavonoides sobre el crecimiento de la bacteria *Helicobacter pylori* causante de un elevado número de úlceras gastro-duodenales en los países desarrollados. La diosmetina, hesperetina, naringenina y poncirina, presentan dicha actividad, siendo esta última la que muestra mayor eficacia. Otros estudios parecen asociar también las propiedades antiulcerosas de diversas plantas a la capacidad que presentan ciertos flavonoides para inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (Zaragozá et al., 2002).

- Anti-hepatoprotectora

Los flavonoides poseen también actividad hepatoprotectora. Se considera posible que ejerzan una acción estabilizadora de la membrana, lo que inhibe la peroxidación lipídica (Tanwar and Rajni, 2012). En un estudio llevado a cabo para investigar flavonoides derivados de la silimarina, apigenina, quercetina y naringenina como agentes terapéuticos contra la hepatotoxicidad inducida por microcistina tipo LR, se encontró que la silimarina, un flavano lignano obtenido de la semilla del cardo mariano (su producto en farmacia es el Legalon 500) era el más efectivo. Los flavonoides rutina y su derivado venoruton (rutina etilada), mostraron efectos regenerativos y hepatoprotectores en la cirrosis experimental (Tapas et al., 2008).

- **Antidiabéticos**

La diabetes mellitus se caracteriza por niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre, ya sea debido a la insuficiencia de la producción de insulina o debido a su ineficacia. Las formas más comunes de diabetes son la de **tipo 1** (5%), un trastorno autoinmune de la diabetes y la de **tipo 2** (95%), que se asocia con la obesidad (Rajasekaran et al., 2008).

Los flavonoides, como antioxidantes, pueden evitar el progresivo deterioro de la función de las células β del páncreas debido al EO y así reducir la aparición de la diabetes de tipo 2 (Song et al., 2005). Cabe citar especialmente a la quercetina, que posee actividad

antidiabética ya que estimula la liberación de la insulina y mejora la captación de Ca^{2+} en islotes o acúmulos de células, de ahí que los flavonoides tengan importancia especialmente en la diabetes no-insulina dependiente o de tipo 2 (Tapas et al., 2008).

Un posible mecanismo por el que la quercetina puede ser beneficiosa en la diabetes de tipo 2, consiste en la inhibición de los transportadores de glucosa. Además, también inhibe la α -glucosidasa previniendo la digestión intestinal de carbohidratos más potentemente que la acarbosa que también puede ayudar a reducir la hiperglicemia postprandial (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010).

- **Antimicrobiana**

Se han investigado los flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos por sus efectos antibacteriostáticos, antifúngicos y antivirales (Raj et al., 2001).

- Actividad antibacteriostática

Se ha encontrado actividad antibacteriostática para un número de flavonoides. Así por ejemplo, se ha descrito que la quercetina inhibe completamente el crecimiento de la *Staphylococcus aureus* (Tapas et al., 2008). La mayoría de la flavononas que no tienen el grupo azúcar, muestran actividades antimicrobianas (Raj et al., 2001); (Agrawal, 2011).

Se han aislado e identificado la estructura de flavonoides que poseen actividad antibacteriostática y también se ha cuantificado la actividad de los comercialmente disponibles. Ejemplos de estos flavonoides son: apigenina, galangina, pinocembrina, ponciretina, genkwanina, soforaflavanona G y sus derivados, naringina y naringenina, galato de epigallocatequina y sus derivados, luteolina y luteolina 7-glucósido, quercetina, 3-O-metilquercetina y diversos glicósidos de quercetina y kaempferol y sus derivados. También se han identificado otras flavonas, glicósidos flavonas, isoflavonas, flavanonas, isoflavanonas, isoflavanos, flavonoles, glicósidos flavonoles y chalconas con actividad antibacteriana (Cushnie and Lamb, 2005).

- Actividad antifúngica

Un número aislado de flavonoides obtenidos a partir de la cáscara de mandarina, se han probado para estudiar la actividad antifúngica en *Deuterophoma tracheiphila* mostrando una actividad prometedora. La cloroflavonina fue el primer flavonoide antifúngico tipo antibiótico que contenía cloro producido por cepas de *Aspergillus candidus* (Raj et al., 2001); (Agrawal, 2011).

- Actividad antiviral

La actividad antiviral parece estar asociada con los compuestos no glicosídicos y la hidroxilación en la posición 3. La quercetina, morina, dihidroquercetina (taxifolina), apigenina, y catequina, poseen actividad antiviral contra once tipos de virus (Tanwar and Rajni, 2012).

Un área de investigación reciente es la aparente actividad inhibidora de algunos flavonoides contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cushnie and Lamb, 2005). Los flavanoles son generalmente más eficaces que las flavonas y flavononas en la inhibición selectiva de HIV-1 y HIV-2 o infecciones similares al virus de la inmunodeficiencia (Tapas et al., 2008). Los estudios in vitro han mostrado que la baicalina inhibe la infección VIH-1 y la replicación (Cushnie and Lamb, 2005).

También se ha encontrado que los flavanoles son más efectivos que las flavonas contra el virus Herpes simplex (VHS) de tipo 1 siendo el orden de importancia: galangina (3,5,7-trihidroxil-2-fenilcroman-4-ona) > kaempferol (3,5,7-trihidroxil-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona) > quercetina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol) (Raj et al., 2001).

Los flavonoides también tienen actividad inhibidora contra una variedad de otros virus. Por ejemplo, Selway (Cody et al., 1986) publica que la quercetina, morina, rutina, dihidroquercetina, dihidrofisetina, leucocianidina, cloruro de pelargonidina y catequina poseen actividad inhibidora hasta contra siete tipos de virus, incluyendo el Herpes simplex virus, virus respiratorio sincitial ((RSV) y virus Sindbis (SINV). Los mecanismos de acción antiviral incluyen la inhibición de la polimerasa viral y la unión de ácidos nucleicos virales o proteínas de cápside viral (Cushnie and Lamb, 2005).

- **Efectos sobre hormonas**

Los flavonoides también tienen un papel de regulación sobre diferentes hormonas como estrógenos, andrógenos y la hormona tiroidea. La quercetina, miricetina, rutina y kaempferol, afectan al transporte, metabolismo y acción de la hormona tiroidea (Ananth et al., 2012); (Rathee et al., 2009). Por otro lado, las isoflavonas inhiben la biosíntesis de la hormona tiroidea y pueden ejercer a altas concentraciones efectos bociogénicos en los seres humanos (Egert and Rimbach, 2011), de ahí que también reciban el nombre de fitoestrógenos.

- **Efectos anti-osteoporóticos**

Los flavonoides presentes en el té pueden ser responsables de la prevención de la osteoporosis (Hegarty et al., 2000).

- **Efectos sobre el sistema nervioso central**

Los efectos neuroprotectores de muchos polifenoles se basan en su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y captar directamente la concentración patológica de ERO/ERN y quelatar iones metálicos de transición (Kovacsova et al., 2010).

Algunas investigaciones indican que flavonoides no glicosilados, así como las flavononas hesperetina, naringenina y sus productos de conjugación y sólo algunos flavonoides glicosilados como el 3-β-rutinósido de cianidina y el glucósido de pelargonina, atraviesan la BHE. Al parecer, la capacidad de los flavonoides de permear la BHE no sólo depende de su lipofilicidad sino también de su capacidad de conjugación; metabolitos que son

conjugados por metilación en el intestino delgado y en el hígado, al ser más lipofílicos, pueden permear la BHE con mayor facilidad que sus agliconas de origen (Estrada-Reyes et al., 2012).

Los flavonoides ejercen una multiplicidad de acciones neuroprotectoras dentro del cerebro, incluyendo la protección de neuronas contra lesiones inducidas por neurotoxinas, capacidad para suprimir la neuroinflamación, y el potencial de promover la memoria, el aprendizaje y las funciones cognitivas (Vauzour et al., 2008). En particular, hay evidencias de que alimentos ricos en flavonoles, antocianidinas y/o flavanonas, poseen el mayor potencial para actuar sobre los procesos cognitivos (Kovacsova et al., 2010).

Estas acciones neuroprotectoras se llevan a cabo por diferentes mecanismos que incluyen principalmente:

- 1) La actividad antioxidante, principalmente la inhibición de la NADPH oxidasa y la posterior generación de ERO;
- 2) Un activador efecto de la eNOS neuronal y una inhibitoria acción de la iNOS con la posterior producción de NO;
- 3) Reducción de la neuroinflamación a través de la atenuación de la liberación de citoquinas, tales como la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral α y la baja regulación β factores de transcripción tales como NF-kB
- 4) Modulación de rutas de señalización tales como la cascada de la proteína quinasa activada por mitógeno y la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREB) dando lugar a la mejora de la memoria y el rendimiento cognitivo (Kovacsova et al., 2010).

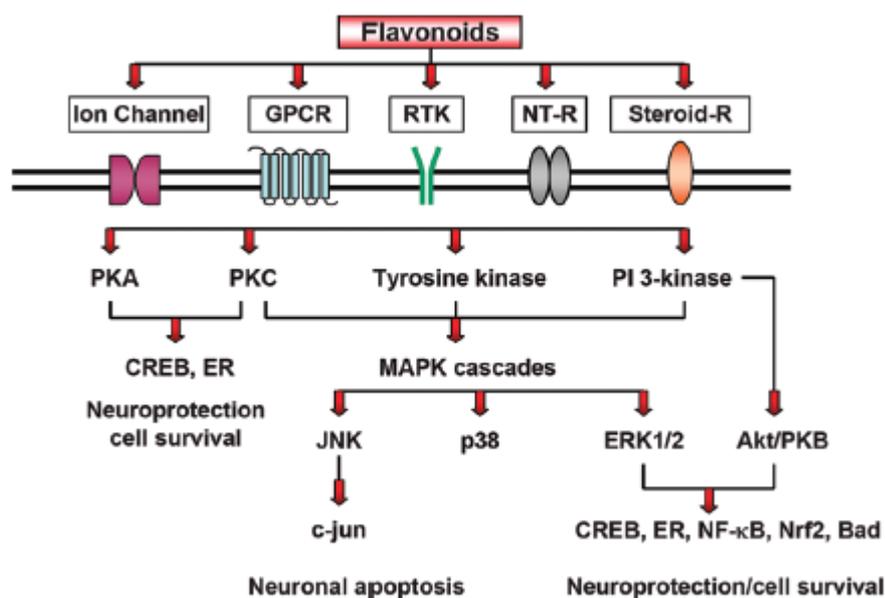


Figura 46. Potenciales objetivos de señalización de flavonoides asociados con neuroprotección (adaptado de (Hwang et al., 2012))

Enfermedades neurodegenerativas

La inflamación crónica del cerebro, predominantemente mediada por las células astro y microgliales, se cree que juega un importante papel en la muerte celular neuronal progresiva que se observa en muchas enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedades priónicas, enfermedad de Parkinson (PD), esclerosis múltiple y accidente cerebrovascular. La activación de la microglia y la astrogliosis aumentan (secretan o llevan a la producción) las enzimas inflamatorias tales como la iNOS y COX-2. Además aumenta las citoquinas pro-inflamatorias tales como interleukina-1 β (IL-1 β), IL-6 y el factor de necrosis tumoral, así como un mayor nivel de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. ERO y ERN contribuyen a alteraciones en la absorción de glucosa neuronal, inhibición de enzimas mitocondriales, disminución en el potencial de membrana mitocondrial, transporte axonal y de señalización sináptica deteriorados (Hansen et al., 2010).

• Alzheimer y Parkinson

La neurodegeneración en PD y EA y otras enfermedades neurodegenerativas, parece estar desencadenada por acontecimientos multifactoriales, incluyendo la neuroinflamación, excitotoxicidad glutamatergica, aumentos de hierro y/o agotamientos de antioxidantes endógenos. Hay evidencias de que los flavonoides son capaces de contrarrestar el daño neuronal subyacente a estos trastornos (Spencer, 2009).

La EA es un trastorno cerebral progresivo que afecta a las regiones del cerebro que controlan la memoria y las funciones cognitivas, destruyendo gradualmente la memoria y la capacidad para aprender de una persona, de razonar, comunicarse y llevar a cabo las actividades diarias (Rubio-Pérez and Morillas-Ruiz, 2012). Se ha comprobado que el

extracto *Ginkgo biloba*, cuyas hojas poseen flavonoides pertenecientes a la familia de los flavonoles (kaempferol 7-glucósidos y sus derivados), tiene efectos beneficiosos en relación a las demencias relacionadas con la edad y con la EA ya que protege a las neuronas del hipocampo y también se ha demostrado que el consumo de té verde puede tener efectos beneficiosos en la reducción del riesgo de esta enfermedad (Vauzour et al., 2008).

En la PD, que resulta de lesiones nerviosas producidas en ciertas regiones del cerebro causando rigidez muscular, temblores y dificultad para caminar (Rajasekaran et al., 2008), se ha encontrado que flavonoides tales como la flavonona cítrica tangeretina, pueden servir como potenciales agentes neuroprotectores frente a la patología subyacente relacionada dicha enfermedad (Vauzour et al., 2008).

- **Derrame cerebral o accidente cerebrovascular**

La causa primaria de derrame cerebral es una interrupción del flujo sanguíneo cerebral que ocurre durante la obstrucción vascular por tromboembolismo o trombosis local. Los factores de riesgo que conducen a los accidentes cerebrovasculares son la hipertensión, la aterosclerosis, el colesterol, diabetes y fibrilación auricular. Los flavonoides son eficaces tanto por ser agentes preventivos así como por ser opciones de tratamiento en fase aguda del derrame cerebral.

Así por ejemplo, los flavonoles pueden actuar en diferentes fases del derrame cerebral. En la **fase aguda**, mejoran el flujo sanguíneo cerebral, previenen la agregación plaquetaria y trombosis, reducen la excitotoxicidad e inhiben el EO. Para la **fase intermedia**, los flavonoles reducen la inflamación y protegen la integridad endotelial. Para la **última fase**, interfieren con la isquemia inducida por mecanismos de muerte celular como la apoptosis y necrosis (Perez-Vizcaino and Duarte, 2010).

Por último, también destacan sus propiedades como ansiolíticos, sedantes, antidepresivos y anticonvulsivos. Se ha demostrado que estos efectos son controlados principalmente por los receptores GABA, en particular por los GABA_A, por lo que los flavonoides han sido reconocidos como una familia con efectos y resultados equivalentes a las benzodiazepinas (BDZ), con la ventaja de no presentar los efectos colaterales que éstas producen. A partir de 1960, los fármacos ansiolíticos más utilizados en la práctica clínica han sido los de la familia de las BDZ, utilizados también para el tratamiento de la epilepsia, el insomnio, ciertos estados depresivos y algunos estados afectivos (Estrada-Reyes et al., 2012).

- **Otros efectos**

- Acción inmunosupresora

La interacción de los flavonoides sobre las respuestas específicas del sistema inmunitario es compleja y permanece aún sin dilucidar completamente, aunque parece ser que actúan sobre distintos sistemas enzimáticos que están relacionados en

la respuesta inmune y en la génesis de procesos inflamatorios, especialmente en la trasducción de señales de activación celular (Zaragozá et al., 2002).

- Acción antiasmática

Algunos flavonoides como la baicaleína, medicarpina y davigenina han sido estudiados por sus propiedades inhibitorias de leucotrienos y se emplean en el tratamiento del asma bronquial (Zaragozá et al., 2002).

- Acción antialérgica

Tanto los mastocitos como los basófilos presentan en la superficie celular receptores de IgE de alta afinidad que participan en la inflamación mediante la liberación de mediadores químicos tales como histamina, cisteinil leucotrienos, citoquinas y quimiocinas (Kawai et al., 2007). Además, estas células están implicadas en la patogénesis de alteraciones tales como rinoconjuntivitis, asma bronquial, urticaria y la anafilaxia (Middleton et al., 2000); (Zaragozá et al., 2002).

La actividad antialérgica presentada por los flavonoides se debe a la capacidad que tienen para actuar sobre los mastocitos y los basófilos a través de la regulación de los mismos (Park et al., 2008). Varios flavonoides, en particular, luteolina, apigenina y fisetina, inhiben la liberación de histamina (responsable de reacciones alérgicas e inflamatorias), síntesis de IL-4, y IL-3 y la expresión del ligando CD40 en basófilos y mastocitos (Kawai et al., 2007). También cabe citar a la quercetina como antihistamínico natural (Rajasekaran et al., 2008).

- Acción antiespasmódica

Numerosos flavonoides han sido estudiados por sus propiedades espasmolíticas. La utilización de plantas medicinales como el tomillo con este fin, se justifica por la presencia de flavonas como la luteolina o la apigenina. Lo mismo ocurre con los flavonoides de la menta como xantomicrool, gardeninas B y D o eridictiol y los del regaliz, liquiritigenina o isoliquiritigenina (Zaragozá et al., 2002).

- Cosméticos y farmacéuticos

Los ésteres de flavonoides pueden actuar como descongestionantes, agentes de tratamiento de piel sensible, agentes de fortalecimiento de capilares sanguíneos y antienvjecimiento (Ochoa M and Ayala A, 2004).

Por otro lado, los inhibidores de la Tirosinasa como Butein (2', 4'3, 4-tetrahidroxichalcona) y otras chalconas, están siendo cada vez más importantes en los productos cosméticos y medicinales usados en hiperpigmentación (Shohaib et al., 2011).

- Saborizantes y edulcorantes

Recientemente, la naringina y la neohesperidina han adquirido mucha importancia ya que algunos de sus derivados (dihidrochalconas) tienen un dulzor de aproximadamente 2000 veces el de la sacarosa considerándose que podrían ser sustitutos de los edulcorantes sintéticos (Ochoa M and Ayala A, 2004).

▪ Oculares

Los flavonoides son útiles en desórdenes circulatorios de la retina y el ojo tales como la retinopatía originada por diabetes (Martínez, 2005).

▪ Acción diurética

Una de las drogas más utilizadas por sus propiedades diuréticas es la hoja de ortosifón. Esta planta también llamada té de Java, posee flavonoides polimetoxilados que presentan propiedades diuréticas (Zaragozá et al., 2002).

▪ Acción antidiarreica

La quercetrina (3-ramnosilquercetina) es un flavonoide contenido en varios medicamentos tradicionales utilizado por su actividad antidiarreica. Este compuesto y flavonoides relacionados, desempeñan un importante papel en la reparación intestinal después de una lesión crónica de la mucosa (Gálvez et al., 1995). Esta actividad antidiarreica de la quercetrina es debida a su aglicona, la quercetina, que es liberada por el glicósido en el intestino (Gálvez et al., 1993).

▪ Acción insecticida

Otra clase de flavonoides como los denominados rotenoides tienen uso como insecticidas (Martínez, 2005).

En la siguiente tabla, se muestran a modo de resumen, ejemplos de flavonoides y algunas de sus propiedades farmacológicas:

Tabla 8. Actividades farmacológicas de los flavonoides (adaptado de (Tanwar and Rajni, 2012))

Enfermedad	Flavonoides
Úlcera	Kaempferol, Quercetina (+)-Cyandanol-3, Meciadanol, Catequinas
Artritis reumatoide	Apigenina, Rutina
Inflamación	Quercetina, Apigenina, Catequina Hesperidina, Rutina, Luteolina Kaempferol, Miricetina, Fisetina
Cáncer	Quercetina, Kaempferol, Galangina, Apigenina Naringina, Genisteína, Luteolina, Catequinas
Disfunción de la memoria	Genisteína, Quercetina, Fisetina
Depresión	Naringenina, 2S-Hesperidina, Linarina

Enfermedad	Flavonoides
Enfermedades cardiovasculares	Quercetina 7-Monohidroxietilrutósido 7',3',4'-Trihidroxirutósido, Diosmina
Diabetes mellitus	Fisetina, Quercetina
Antialérgica	Quercetina Rutina, Citrina
Hepatoprotectiva	Quercetina Avicularina, Luteolina
Trombosis	Hesperidina, Quercetina, Rutina Trihidroxietilrutósido, O-(-Hidroxietil) Rutósido Tangeretina, Nobiletina, Sinensetina

1.5.5 Limitaciones de los flavonoides

Algunos compuestos flavonoides podrían tener limitaciones de uso a nivel fisiológico ya que ciertas estructuras trihidroxiladas pueden actuar como prooxidantes a altas dosis causando efectos adversos (Martin and Christy, 2010).

Otra sería la limitada biodisponibilidad de los flavonoides, debido a su baja absorción y rápida eliminación (González-Gallego et al., 2007). En los alimentos, los flavonoides están principalmente glicosilados y los ácidos fenólicos están en forma de éster y, después de la conversión a agliconas, son sulfatados, glucuronizados o metilados en nuestro cuerpo. Esto hace difícil determinar la dosis óptima requerida de polifenoles para conseguir efectos protectores y evitar la formación de compuestos tóxicos (Riccio et al., 2011).

Por otro lado, los polifenoles pueden presentar efectos adversos en diversos sistemas biológicos. Por ejemplo, varios flavonoides podrían inhibir la enzima peroxidasa tiroidea e interfieren con la biosíntesis de la hormona tiroidea y finalmente, con la función tiroidea. También pueden presentar efectos antinutricionales mediante la complejación de minerales tales como el hierro. Aunque podría ser un efecto protector, también puede conducir a la deficiencia del hierro (Martin and Christy, 2010).

Hay publicaciones que indican que el consumo elevado de isoflavonas puede reducir la fertilidad y retardar la madurez sexual (Martin and Christy, 2010).

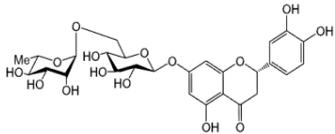
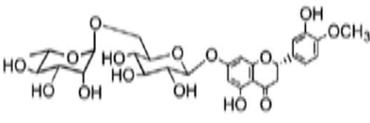
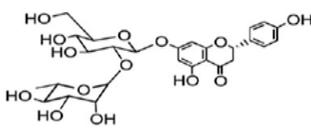
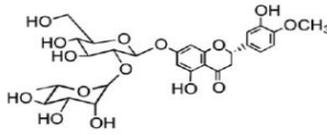
En resumen, no hay datos suficientes que puedan proporcionar pruebas concluyentes sobre los efectos en la salud de la mayoría de las subclases de flavonoides debido a que todavía existen una serie limitaciones como son efectos del procesamiento, la biodisponibilidad y el metabolismo, el desarrollo fisiológico apropiado de modelos *in vitro*, métodos normalizados de análisis y la adecuación de biomarcadores clínicos. La investigación futura dependerá de la resolución de estos temas (Kay, 2010).

Por otro lado, el estudio de flavonoides es complejo debido a la heterogeneidad de las diferentes estructuras moleculares y la escasez de datos sobre su biodisponibilidad. Hay una necesidad de mejorar las técnicas analíticas que permitan la recogida de más información sobre absorción y excreción (Nijveldt et al., 2001). Los datos sobre las consecuencias a largo plazo de la ingestión crónica de flavonoides son especialmente escasos. Finalmente se cree que flavonoides naturales, semisintéticos y sintéticos, solos o en combinación con otras estrategias preventivas y/o terapéuticas, se convertirán en futuros eficaces fármacos contra las enfermedades degenerativas más comunes, como cáncer, diabetes y complicaciones cardiovasculares (Tapas et al., 2008).

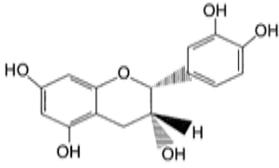
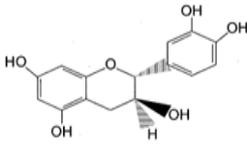
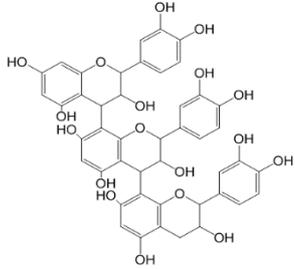
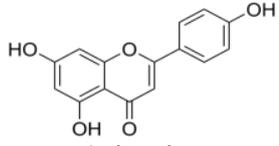
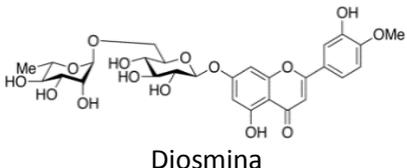
1.5.6 Flavonoides estudiados

Los flavonoides que han sido objeto de estudio en la realización de esta tesis, son de dos tipos: extractos vegetales ricos en flavonoides y flavonoides de alta pureza. Se muestran con más detalle en la siguiente tabla:

Tabla 9. Componentes y estructuras químicas de los flavonoides estudiados

Nombre	Abreviatura	Composición y estructura química	Tipo de estructura glicosídica
Extractos vegetales ricos en flavonoides			
Extracto de Limón	(LBC) Lemon Biflavonoids Complex	 <p>Eriocitrina</p>	Rutinósido
		 <p>Hesperidina</p>	Rutinósido
Extracto de Pomelo (Citrus Paradisi) + Naranja amarga (Citrus aurantium)	(GBC) Grapefruit and Better Orange Citrus	 <p>Naringina</p>	Neohesperidósido
		 <p>Neohesperidina</p>	Neohesperidósido

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Nombre	Abreviatura	Composición y estructura química	Tipo de estructura glicosídica
Extracto de Cacao (Catequinas)	(COE) Cocoa Extract	 <p>(-)-Epicatequina</p>	Aglicón
		 <p>(+)-Catequina</p>	Aglicón
		 <p>Procianidinas</p>	Aglicón
Flavonoides de alta pureza			
Apigenina (obtenida a partir de pomelo)	(A) Apigenina	 <p>Apigenina</p>	Aglicón
Diosmina (obtenida a partir de naranja dulce)	(D) Diosmina	 <p>Diosmina</p>	Rutinósido

1.5.6.1 Extractos vegetales ricos en flavonoides

- Extracto de Limón (LBC):

El jugo de limón ha sido comúnmente utilizado por pacientes hipertensos con el fin de reducir la presión arterial aguda o como una terapia alternativa/complementaria para la mejora crónica (Sari et al., 2012).

El limón (*Citrus limon*) contiene significativas concentraciones de flavonoides además de componentes tan conocidos como los carotenoides y ácido ascórbico. Los flavonoides presentes en el limón, son fundamentalmente flavanonas glicosiladas, concretamente de tipo rutinósido y son la eriocitrina (eriodictiol 7-O- β rutinósido) y la hesperidina (hesperetina 7-O- β rutinósido) (Miyake et al., 2007).

La eriocitrina es un flavonoide con importante actividad antioxidante para la inhibición de la autooxidación de lípidos y tiene un efecto supresor sobre el EO en ratas inducido por estreptozotocina y ejercicio agudo.

La hesperidina ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antihipertensivos sobre animales experimentales, aunque su actividad antioxidante es menor en comparación con la de la eriocitrina (Miyake et al., 2007). El producto empleado en el estudio, es un extracto purificado obtenido de cortezas de limón.

- Extracto de Pomelo + Naranja amarga (GBC):

El zumo y jugo de pomelo contienen ciertas cantidades de flavonoides principalmente naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido) y narirutina (naringenina-7-O- rutinósido) (Díaz-Juárez et al., 2009). Por su parte, la naranja amarga contiene importantes cantidades de neohesperidina, una flavanona similar a la hesperidina de la naranja dulce y del limón; contiene también naringina.

Investigaciones médicas han demostrado que el jugo de pomelo reduce la formación de la placa aterosclerótica e inhibe la proliferación celular del cáncer de mama y la tumorigénesis de células mamarias. Posee propiedades antioxidantes, antinitrosamínicas, antisépticas, cardiotónicas, hipocolesterolémicas, y sedantes entre otras varias funciones (Kiani and Imam, 2007). Además, en sujetos hipertensos, el consumo de flavanonas ricas en jugo de pomelo ejerce un efecto beneficioso sobre la PA (Morand et al., 2011).

En humanos, el jugo de *Citrus Paradisi*, disminuye la PAS y PAD tanto en sujetos normotensos como hipertensos (Díaz-Juárez et al., 2009). El producto empleado en este estudio, es un extracto rico en flavanonas glicosiladas obtenido a partir de frutos inmaduros de pomelo y naranja amarga (1:1).

Limón, Pomelo y naranja amarga, se han seleccionado como objeto de estudio en la realización de esta tesis, debido a que son las fuentes más utilizadas en la preparación de suplementos nutricionales.

- Extracto de Cacao (COE):

Los flavonoides del cacao se caracterizan por ser flavan-3-oles o flavanoles e incluyen las formas monoméricas, (-)-epicatequina y (+)-catequina, y la forma oligomérica de las unidades monoméricas, las procianidinas (mayoritariamente de tipo B, que son oligómeros de epicatequina) (Fraga et al., 2011). Estos flavonoides se encuentran en el grano de cacao, las semillas del fruto del árbol del cacao (*Theobroma cacao*) (Engler and Engler, 2004) y se ha demostrado que mejoran la función endotelial y disminuyen la PA en seres humanos y animales (Fraga et al., 2011).

El efecto antihipertensivo de productos ricos en cacao, se han relacionado con:

- 1) El aumento en plasma o en orina de especies derivadas de NO
- 2) La mejora de la dilatación debido al flujo de NO como indicador de la función vascular
- 3) La reducción del EO (Fraga et al., 2011)

Los flavonoides del cacao afectan favorablemente al perfil lipoproteico. Se ha descrito que las procianidinas del cacao inhiben el TNF α , marcador pro-inflamatorio en las células endoteliales vasculares, reduciendo así la adhesión al endotelio de los linfocitos-T (Quiñones et al., 2012). Además estimulan la formación de prostaciclina (PGI $_2$), un inhibidor de la agregación plaquetaria e inhiben la formación de los leucotrienos, agentes vasoconstrictores y estimulantes de la inflamación (Schramm et al., 2001).

Se ha seleccionado porque es el más estudiado a nivel cardiovascular en la actualidad y procede del alimento con mayor capacidad antioxidante valorado según unidades ORAC.

1.5.6.2 Flavonoides de alta pureza

- Apigenina (A)

La apigenina constituye uno de los compuestos flavonoides más ubicuos en el reino vegetal, encontrándose presente generalmente en forma glicosilada en una o más posiciones, siendo abundante en frutas y verduras comunes tales como perejil, apio, cebollas, manzanilla y en algunos condimentos (Patel et al., 2007).

Tiene una variedad de actividades farmacológicas incluyendo efectos hipotensivos, anti-inflamatorios, antiespasmódicos y antidiarreicos (Zhang et al., 2000), antioxidantes, antimutagénicos, antiproliferativos, antiprogresivos y anticarcinogénicos (Patel et al., 2007). También se ha demostrado que la apigenina anula las respuestas plaquetarias inducidas por TXA $_2$ sin interferir sustancialmente, en la síntesis del mismo (Guerrero et al., 2005).

Además, muestra una interesante potencialidad como agente quimiopreventivo. En los últimos años, se han podido establecer algunos de los mecanismos para la prevención y terapia del cáncer mediado por medio de la apigenina incluyendo la actividad

estrogénica/antiestrogénica, actividad antiproliferativa, inducción de la detención del ciclo celular y la apoptosis, prevención de la oxidación, regulación del sistema huésped inmune y cambios en la señalización celular (Patel et al., 2007).

La apigenina empleada en este estudio, ha sido una molécula de elevada pureza, no glicosilada y obtenida a través de varias etapas de frutos inmaduros de pomelo (ver materiales y métodos) y se ha seleccionado debido a que es un flavonoide que ha demostrado en múltiples estudios, la mayor capacidad antiinflamatoria.

- Diosmina (D):

Diversos estudios farmacológicos han demostrado que la Diosmina aumenta el tono venoso, mejora el drenaje linfático y protege la microcirculación. En edema, produce una reducción significativa en la circunferencia de la pierna, gracias a su capacidad para inhibir las reacciones inflamatorias y para disminuir la hipermeabilidad capilar. En cuanto a cambios en la piel, se ha demostrado que mejora los trastornos tróficos venosos, como la dermatitis de estasis o gravitacional y dermatofibrosclerosis (Ramelet, 2001). Se ha seleccionado debido a que es el flavonoide más utilizado en farmacología como principio activo en diversos productos relacionados con la salud del sistema cardiovascular.

Dado que la HTA es la enfermedad crónica más frecuente en el mundo y uno de los factores de riesgo cardiovascular primarios, y que recientemente los flavonoides han surgido como una nueva terapia como posibles candidatos en la prevención y/o tratamiento de la HTA, en esta tesis doctoral, nos hemos propuesto abordar el estudio de la actividad antihipertensiva de distintos flavonoides en dos modelos animales experimentales de HTA.

Por ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar los efectos de diversos flavonoides sobre la presión arterial y la función renal en ratas con HTA por déficit de óxido nítrico y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).
- 2) Estudiar el efecto de los diversos flavonoides sobre la función endotelial en los animales hipertensos.
- 3) Evaluar posibles mecanismos implicados en los potenciales efectos beneficiosos de los diferentes flavonoides tras su administración a los animales hipertensos.
- 4) Intentar establecer cuál debería ser el consumo recomendable mínimo de flavonoides para obtener dichos efectos beneficiosos, bien a través de la dieta o de la ingesta específica de suplementos nutricionales y/o productos farmacéuticos, sin olvidar la potencial influencia de la duración del tratamiento.

3.1 Animales

Los animales utilizados en este estudio, han sido ratas macho SD (Sprague-Dawley) para el modelo de hipertensión L-NAME, y ratas macho SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) con dos tipos de controles normotensos: WKY (Wistar-Kyoto) para el tratamiento de doce semanas de duración y Wistar para el tratamiento de seis semanas, todas de unas ocho semanas de edad y suministradas por la Sección de laboratorio de animales del Servicio de Apoyo a la Investigación, de la Universidad de Murcia (con licencia nº REGAES 300305440012). Un total de 145 ratas fueron utilizadas finalmente en este trabajo experimental.

Los animales permanecieron en condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa ($55 \pm 10\%$) y períodos de luz y oscuridad de 12 horas.

Todos los experimentos se han llevado a cabo según el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos y a la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, del Gobierno de España y en cumplimiento con la directiva Europea (86/609/EEC) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

3.2 Tratamientos suministrados

En función del tratamiento suministrado se distinguen los siguientes grupos: los grupos no tratados sin HTA o normotensos, los grupos no tratados con HTA o hipertensos y los grupos hipertensos tratados.

Los grupos no tratados son ratas no tratadas que se mantuvieron con una dieta estándar y agua corriente. A los animales tratados, se les administraron diferentes tratamientos constituidos por flavonoides, disueltos en el agua de bebida o mezclados con la comida, y por el fármaco control durante seis o doce semanas.

Como compuestos de referencia o fármacos control se usaron: la flavona Diosmina, principio activo principal de diversos fármacos venotónicos usados para la vasoprotección periférica e

insuficiencia venosa crónica, como Daflón, Diosminil, Venosmil, etc; y el Captopril, un principio activo antihipertensivo que inhibe a la ECA (enzima convertidora de angiotensina I a II).

Todos los productos, excepto el Captopril, han sido suministrados por Nutrafur S.A. y todos se administraron en el agua de bebida excepto la Diosmina.

En todos los extractos y compuestos purificados ensayados, los únicos compuestos activos son los flavonoides, cuya descripción pormenorizada y cuantitativa es la de la tabla 9. El resto de los componentes hasta completar el 100% de la composición es: agua (\approx 3-5%), sales minerales (\approx 5 4%, dependiendo de cada extracto), polisacáridos vegetales propios de las materias primas empleadas, algunas pectinas y una mínima cantidad de lípidos.

Tabla 10. Composición de los extractos utilizados mediante técnica HPLC

Compuesto/Extracto	Flavonoides: Resultados ensayo HPLC
Apigenina (A)	Apigenina: 92-94% Otros flavonoides minoritarios: 3-5%
Extracto de Limón (LBC)	Eriocitrina: 35% Hesperidina: 1-1.5%
Extracto de pomelo + Naranja amarga (GBC)	Naringina: 54,30% Neohesperidina:10,90% Isonaringina: 1,76% Poncirina: 0,87% Naringenina: 0,32% Rhoifolina: 0,47% Otros flavonoides: 1,60%
Extracto de Cacao (COE)	Epicatequina: 6,84% Catequina: 0,86% Procianidinas (dímeros): 4,88% Otros flavan-3-oles: 18,19%
Diosmina (D)	Diosmina: 93,20% Hesperidina: 5,20% Isorhoifolina: 0,88% Didymina: 0,20% Linarina: 0,86% Otros: 0,83%

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La tabla 11 muestra las dosis utilizadas de los diferentes compuestos (mg/Kg/día) y la cantidad total de los flavonoides más abundantes que tiene cada compuesto (mg/Kg/día) o mg activos (*) que se calcularon de la siguiente manera:

- mg activos **A**/kg/día = [0,93 (A) + 0,04 (otros flavonoides minoritarios)] x 1,44 (mg/Kg/día) = 1,40
- mg activos **LBC**/kg/día = [0,35 (Eriocitrina) + 0,0125 (Hesperidina)] x 2,84 (mg/Kg/día) = 1,00
- mg activos **GBC**/kg/día = [0,543 (Naringina) + 0,109 (Neohesperidina)] x 9,28 (mg/Kg/día) = 6,00
- mg activos **COE**/kg/día = [0,0684 (Epicatequina) + 0,0086 (Catequina) + 0,0488 (Proantocianidinas) + (0,1819) Otros flavan-3-oles] x 2,52 (mg/Kg/día) = 0,75
- mg activos **D**/kg/día = [0,932 (Diosmina) + 0,0088 (Isorhoifolina) + Linarina (0,0086)] x 7,16 (mg/Kg/día) = 6,80
- mg activos **CPT**/kg/día = 100 (mg/Kg/día)

Tabla 11. Tratamientos y dosis suministradas de flavonoides

Flavonoides	Dosis (mg/Kg/día)	mg activos Flavonoides/Kg/día *
Apigenina (A)	1,44	1,40
Extracto de Limón (LBC)	2,84	1,00
Extracto de pomelo + Naranja amarga (GBC)	9,28	6,00
Extracto de Cacao (COE)	2,52	0,75
Compuestos de referencia o control		
Diosmina (D)	7,16	6,80
Captopril (CPT)	100	100

La dosis elegida de cada uno de los tratamientos responde a un criterio objetivo de potencial posterior aplicación en humanos. Como puede comprobarse, las dosis ingeridas diariamente por los animales son muy bajas comparadas con las utilizadas en otros estudios con compuestos similares.

Generalmente, en estudios con animales se emplean dosis muy superiores, proporcionalmente, a las que luego se aplican en una terapéutica humana, en este caso, se trata exactamente de las mismas. Además, dichas dosis se encuentran afectadas por otro factor escasamente científico, pero, evidentemente necesario en el realismo de una posible validación y extrapolación de resultados al campo de la farmacia o de los ahora denominados suplementos nutricionales, se trata del coste de aplicación del producto. En todos los casos, la dosis utilizadas supondría un coste de 2-3 céntimos de €/día, valor establecido habitualmente como referencia en este tipo de productos.

Es evidente que estos dos condicionantes ejercen un efecto negativo en cuanto a los posibles resultados a obtener en este estudio, sin embargo, veremos cómo algunos de los compuestos estudiados muestran un comportamiento significativamente positivo en el tratamiento de la HTA y factores relacionados.

3.3 Grupos experimentales

Los animales se distribuyeron en tres grandes grupos: un grupo L-NAME, con tratamiento de seis semanas de duración, y dos grupos SHR, uno de ellos con tratamiento de seis semanas de duración y el otro con tratamiento de doce semanas, con sus correspondientes controles.

Grupo L-NAME (n=38)

En este grupo utilizamos hipertensión inducida por L-NAME, un inhibidor de la NOS, administrado a una dosis de 10 mg/Kg/día, en el agua de bebida, durante 6 semanas. Se utilizaron un total de 38 ratas SD entre 8-10 semanas de edad y unos 266-359 g de peso al inicio del estudio (semana 1). Dentro de este grupo, los animales se dividieron de la siguiente manera:

- 1) Grupo Control (n= 4): Ratas que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) Grupo hipertenso L-NAME (n= 6): Ratas tratadas sólo con L-NAME. Dos ratas murieron a lo largo del estudio.
- 3) Grupo hipertenso L-NAME + tratamientos: Ratas tratadas con L-NAME y los diferentes flavonoides o con el compuesto de referencia (n=28):
 - a) Grupo hipertenso L-NAME + Apigenina (A) (n=5)
 - b) Grupo hipertenso L-NAME + Extracto de limón (LBC) (n=6)
 - c) Grupo hipertenso L-NAME + Extracto de pomelo+naranja amarga (CBG) (n=5)
 - d) Grupo hipertenso L-NAME + Extracto de cacao (COE) (n=6)
 - e) Grupo hipertenso L-NAME + Diosmina (D) (n=6)

En función de los datos de este grupo, se decidió ampliar el período de estudio pero utilizando ahora como referencia un tratamiento “venotónico”/ “vasoprotector” a más largo plazo, la diosmina.

Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)

En este grupo y en el siguiente, utilizamos ratas con hipertensión espontánea o SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). Se utilizaron un total de 62 ratas, de 8-9 semanas de edad y con un peso inicial comprendido entre 213-230 g en el caso de las controles y entre

185-271 g para el resto. Dentro de este grupo, los animales se dividieron en los siguientes subgrupos experimentales:

- 1) Grupo Control (n= 6): Ratas Wistar que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) Grupo hipertenso SHR (n= 13): Ratas SHR que no recibieron ningún tratamiento.
- 3) Grupo hipertenso SHR + tratamientos: Ratas SHR tratadas con los diferentes flavonoides o con el compuesto de referencia (n=43):
 - a) Grupo hipertenso SHR + Apigenina (A) (n=5)
 - b) Grupo hipertenso SHR + Extracto de limón (LBC) (n=13),
 - c) Grupo hipertenso SHR + Extracto de pomelo + naranja amarga (CBG) (n=13)
 - d) Grupo hipertenso SHR + Extracto de cacao (COE) (n=6).
 - e) Grupo hipertenso SHR + Captopril (CPT) (n=6).

En función de los datos de este grupo, se decidió ampliar el período de estudio pero utilizando ahora como referencia un tratamiento “venotónico”/ “vasoprotector” a más largo plazo, la diosmina.

Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)

En este caso, se utilizaron un total de 44 ratas de 8-9 semanas de edad y con pesos iniciales comprendidos entre 212-230 g para las ratas control y entre 210-267 g para el resto. Los subgrupos dentro de este grupo quedaron de la siguiente manera:

- 1) Grupo Control (n= 6): Ratas Wistar-Kyoto (WKY) que no recibieron ningún tratamiento.
- 2) Grupo hipertenso SHR (n= 9): Ratas SHR que no recibieron ningún tratamiento.
- 3) Grupo hipertenso SHR + tratamientos: Ratas SHR tratadas con los diferentes flavonoides o con el compuesto de referencia (n=29):
 - a) Grupo hipertenso SHR + Apigenina (A) (n=6)
 - b) Grupo hipertenso SHR + Extracto de limón (LBC) (n=5)
 - c) Grupo hipertenso SHR + Extracto de pomelo + naranja amarga (CBG) (n=6)
 - d) Grupo hipertenso SHR + Extracto de cacao (COE) (n=6)
 - e) Grupo hipertenso SHR + Diosmina (D) (n=6)

3.4 Protocolos experimentales

3.4.1 Estudios metabólicos y obtención de muestras

Para realizar estos estudios, las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales y alimentadas *ad libitum* con comida estándar convenientemente triturada (Panlab, Barcelona,

España) y agua corriente o agua con L-NAME o el correspondiente tratamiento flavonoide disuelto en ella. La dieta estándar de las ratas contiene una concentración de sodio de 104 mEq/Kg de comida.

Tras dos períodos de adaptación del animal de 24 h cada uno, durante dos semanas sucesivas (semanas antepenúltima y penúltima de tratamiento), se hace el estudio metabólico también de 24 h de duración, en la última semana de tratamiento.

En dicho estudio, se determina la ingesta de agua y comida, el volumen urinario y la concentración urinaria de sodio. Las muestras de orina recogidas, se centrifugan a 2.500 rpm, durante 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4i, Jouan, Saint-Herblain, Francia) para eliminar posibles residuos y se dividen en dos partes, una que es congelada a -80°C para la determinación de la excreción urinaria de nitritos, y otra que es depositada a 4°C, para medir la concentración urinaria de sodio.



Figura 47. Jaulas metabólicas donde se llevaron a cabo los estudios metabólicos

3.4.1.1 Parámetros metabólicos

- Ingesta de comida y agua, se determina mediante la diferencia de peso entre la comida (g/24h) o agua (ml/24h) colocadas en el comedero o bebedero, respectivamente, y el residuo encontrado a las 24h.
- Volumen urinario, V_u (ml/24h), se calcula, restando al peso del recipiente que contiene la orina de 24h, el peso del recipiente vacío.
- La concentración urinaria de sodio, Na_u (mEq/L) se determina mediante un electrodo iónico selectivo que mide el potencial (mV) de un ión específico en una solución. Este potencial se mide respecto a un electrodo de referencia estable que tiene un potencial constante. El electrodo que hemos usado tiene en uno de sus extremos una membrana o sensor específico para el Na^+ y es combinado, tiene tanto el electrodo de referencia como el de medida (Glass Micro-Sodium Combination Electrode 9811BN; Thermo Scientific Orion, USA). Al sumergir el electrodo en una solución o muestra acuosa con Na^+ , se desarrolla en su membrana un potencial y lo mide. Para saber qué concentración de Na^+

se corresponde con los valores del potencial (mV) medidos por el electrodo, se realiza, antes de iniciar las mediciones, una calibración con concentraciones crecientes y conocidas de Na⁺.

- Ingesta de sodio, (Na_i), la ingesta diaria de Na se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Na}_i \text{ (mEq/24h)} = P_c \text{ (g/24h)} \times \text{Na}_c \text{ (mEq/g)}$$

donde P_c es el peso de la comida y Na_c es la concentración de Na de la comida.

- Excreción urinaria de sodio, (ExUNa). Con parámetros ya descritos previamente, se puede calcular la excreción diaria de sodio con la ecuación:

$$\text{ExUNa (mEq/24h)} = V_u \text{ (L/24h)} \times \text{Na}_u \text{ (mEq/L)}$$

- Balance de Na, Se estima el balance de Na como la diferencia entre la ingesta de Na diaria y su excreción urinaria en 24 h. No se considera la excreción fecal de Na ya que es prácticamente despreciable:

$$\text{BNa (mEq/24h/100 g peso)} = \text{Na}_i - \text{ExUNa (ambos, mEq/24h/100 g peso)}$$

3.4.1.2 Medida de la presión arterial

Se realizó mediante un procedimiento no invasivo utilizando un esfigmomanómetro de cola (Cibertec, Madrid, Spain) que permitió la medida de la presión sistólica (PAS). Esta técnica, denominada “tail-cuff” o del manguito en la cola, fue originalmente descrita por Buñag (Buñag, 1973); (Buñag and Butterfield, 1982) y consiste en la introducción del animal en un cilindro de inmovilización o cepo dejándolo en reposo, en oscuridad y en ausencia de ruido a la vez que se le aplica un foco calórico próximo a los 38°C en su cola para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Posteriormente, el manguito de presión se coloca en la cola y junto a éste, el sensor de las pulsaciones. El manguito se infla para que de esta forma se colapse la arteria caudal y desaparezca el pulso arterial; y luego, se desincha lentamente, siendo ambos automáticos.

Los cambios de presión del manguito (0-220 mmHg) se registran paralelamente a los cambios de pulso en un sistema de adquisición de señales (MacLab/8e, ADInstruments, Oxford, UK) conectado a un ordenador que permite registrarlas y grabarlas para su posterior análisis (LabChart 3.4.1.). Viendo la señal en el monitor, se determina la PAS que es el valor de presión que se corresponde con la reaparición del pulso arterial en la señal de pulso. Una vez estabilizados los animales, se realizaron al menos tres mediciones válidas de cada uno, obteniéndose la media de todas ellas.

Las medidas de la PAS se realizaron cuando los animales tenían 14 semanas de vida para el caso del tratamiento de 6 semanas de duración y a las 20 semanas cuando el tratamiento fue de 12 semanas. Previamente, los animales se fueron acostumbrando al procedimiento durante las dos semanas previas a la medida definitiva.

También se midió la presión arterial media (PAM) mediante canulación directa de la arteria femoral durante el protocolo de extracción de la aorta torácica que se describe a continuación.

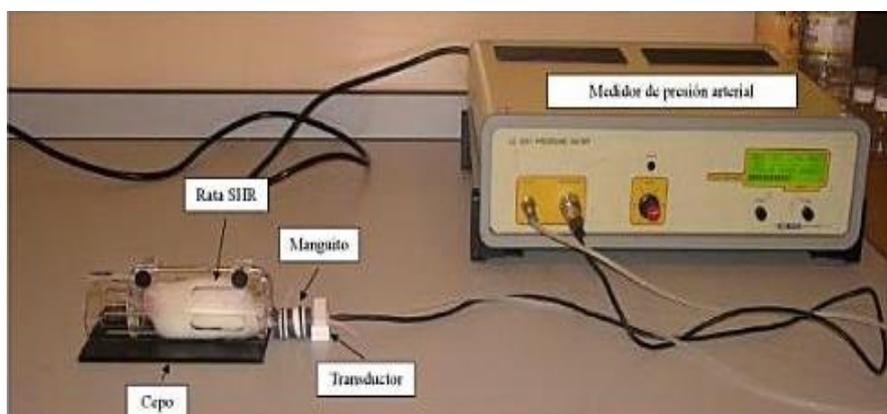


Figura 48. Medida de la presión arterial en una rata mediante el método del manguito en la cola

3.4.2 Estudio de la reactividad vascular en anillos aórticos de rata

3.4.2.1 Extracción de aorta torácica

Los animales se pesaron antes de comenzar el experimento y se anestesiaron con Pentobarbital (50 mg/ 10 ml NaCl al 0,9%), a razón de 0,1 ml/100 g de peso vivo.

Una vez que el animal ha alcanzado la fase de anestesia profunda, se canula la arteria femoral con una cánula de polietileno (PE-50) para medir la PA.

Seguidamente, mediante una laparotomía de unos pocos centímetros por debajo de la apófisis xifoides, se procedió a la extracción de muestras de sangre y riñones, y a continuación se obtuvo la aorta torácica mediante la realización de una toracotomía media, separando los pulmones y el corazón para visualizar la arteria. Posteriormente, se diseccionó la aorta descendente desde el cayado al diafragma, y se colocó en una placa de Petri que contiene una disolución oxigenada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂, Sociedad Española del Oxígeno, Murcia) de Krebs a una temperatura de 37°C y un pH de 7,4 donde se limpió cuidadosamente de grasas adheridas y tejidos circundantes.



Figura 49. Extracción de la aorta torácica



Figura 50. Aorta torácica extraída

La composición de la solución Krebs utilizada es (mM): NaCl, 128; KCl, 4.7; MgCl₂·6H₂O, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; CaCl₂·2H₂O, 2.5; EDTA, 0.01; NaHCO₃, 12.5; Glucosa (C₆H₁₂O₆) 11.

3.4.2.2 Proceso experimental

Baño de órganos

Una vez limpia la aorta, se seccionaron los 4 anillos de una longitud aproximada de 3 mm. Por la luz de los anillos se introdujeron dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable, uno inferior que está fijo a la pared de la cámara y otro superior que se dispone paralelamente al anterior.

El gancho superior, de los dos entre los que se interpone el anillo, es el que está conectado a un transductor isométrico de señales (TRI202P, Panlab, Barcelona) y registra los cambios de tensión en gramos (g) producidos por las contracciones isométricas desarrolladas por las arterias. Las señales, una vez amplificadas (amplificador FE228), son adquiridas por un sistema de adquisición de señales (PowerLab 8/30) conectado a un ordenador que nos permite registrarlas y grabarlas para su posterior análisis mediante un software (LabChart 6.0). (FE228, PowerLab 8/30 y LabChart 6.0 ADInstruments, Oxford, UK).



Figura 51. Medición de anillos aórticos

A continuación, cada anillo se va introduciendo en su correspondiente baño el cual contiene 10 ml de solución Krebs burbujeada con carbógeno. Estos baños (LE 01004, Panlab, Barcelona) poseen como característica principal, una doble pared de vidrio que forma parte de un circuito cerrado por cuyo interior circula agua a una temperatura constante de 37°C en todo su recorrido gracias a un dispositivo que actúa como termostato, lográndose la oxigenación mediante el burbujeo continuo de carbógeno en el seno nutritivo, a través de un dispositivo situado en la parte inferior de los baños. El carbógeno es necesario para oxigenar

de forma adecuada las preparaciones y mantener un pH fisiológico constante (7,3-7,4). A su vez, los baños presentan en su parte inferior un sistema de aspiración que permite el lavado de las preparaciones.

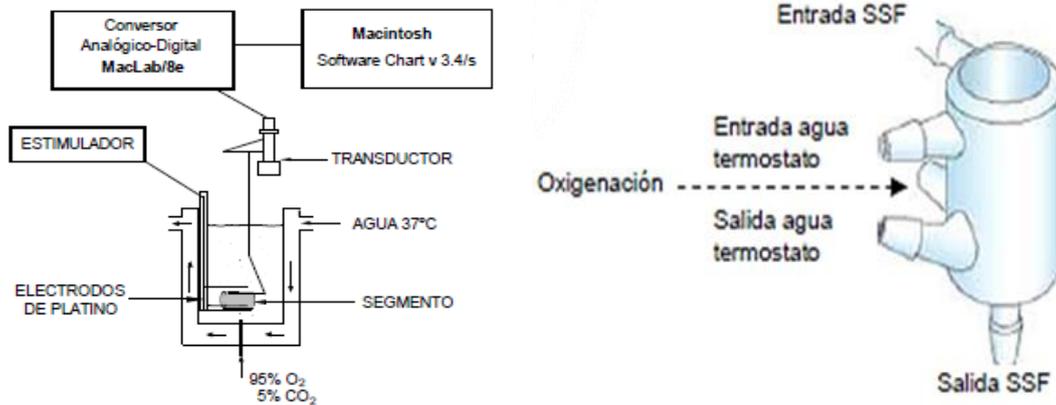


Figura 52. A) Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica. B) Copa de vidrio

Una vez colocados los anillos, se les aplicó una tensión inicial de 2 gramos mediante un tornillo micrométrico y se mantuvieron en estabilización durante 60 minutos antes del inicio de los experimentos, renovándose el líquido nutricio cada 15 minutos y reajustándose continuamente la tensión basal a 2 g, lo que corresponde a la tensión óptima para la expresión de la contracción. Tras el período de estabilización, se realizaron dos curvas dosis-respuesta consecutivas, una de vasoconstricción y otra de vasodilatación.

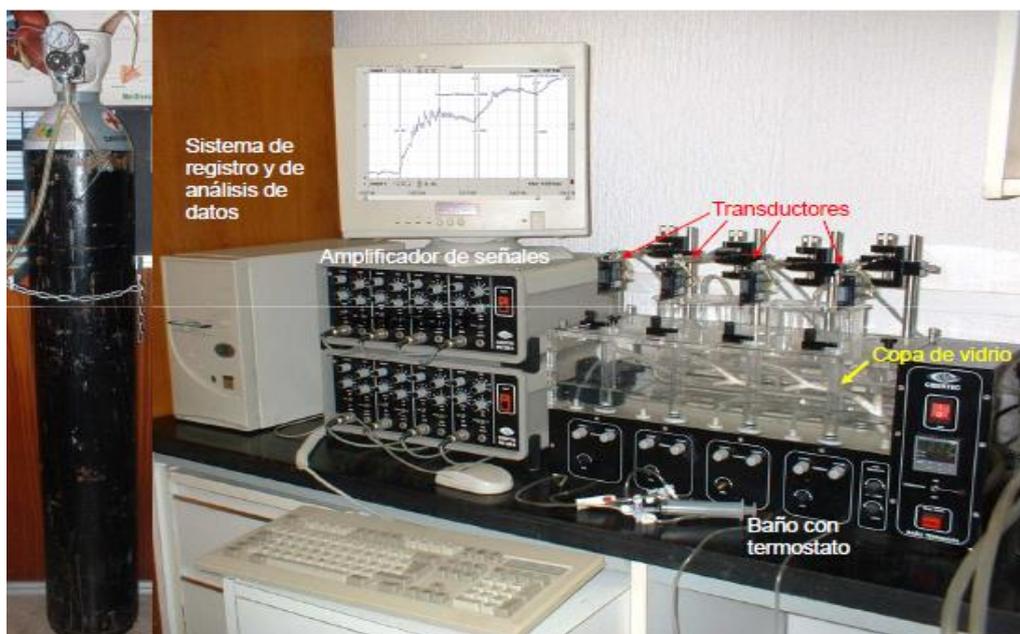


Figura 53. Esquema del sistema in vitro de baños

Respuesta vasoconstrictora sistémica a fenilefrina

La primera curva consiste en la administración de concentraciones progresivas y acumulativas de L-fenilefrina, desde 10^{-9} M a 10^{-4} M. Después, se realizan varios lavados con solución Krebs para eliminar el fármaco, a lo que le sigue un segundo período de estabilización (30-40 minutos) hasta recuperar de nuevo la tensión basal óptima de 2 g.

Respuesta vasodilatadora sistémica a acetilcolina

La curva de vasodilatación se efectúa mediante la aplicación de concentraciones progresivas y acumulativas de acetilcolina, 10^{-9} M a 10^{-4} M, tras la vasoconstricción previa utilizando una dosis máxima de fenilefrina. Las distintas concentraciones de acetilcolina, se añaden una vez alcanzada la respuesta máxima de la concentración previa de la misma. Se determina así, la vasodilatación dependiente del endotelio. En aquellos grupos donde se administró el inhibidor de la NOS, L-NAME, se agregó a los baños de forma aguda 30 minutos antes de la realización de la curva correspondiente, a una concentración de 10^{-4} M. Una vez finalizada la curva de acetilcolina, y recuperada la contracción máxima, se les adiciona a los anillos nitroprusiato sódico 10^{-4} M para determinar la vasodilatación independiente del endotelio.

Parámetros determinados

La respuesta de contracción a fenilefrina, se expresó en gramos respecto al valor basal de 2 g, y la relajación a acetilcolina y nitroprusiato sódico, como porcentaje de la máxima contracción obtenida con fenilefrina. Además, se calcularon las dosis efectivas del 50% de las respuestas a fenilefrina y acetilcolina (DE50) mediante un análisis de regresión individual para cada anillo.

Muestras de sangre, plasma y tejido

Con la sangre obtenida se determinó el hematocrito mediante capilares de vidrio y se obtuvo plasma mediante centrifugación de la sangre a 2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4i, Jouan, Saint-Herblain, Francia).

Respecto a los tejidos, además de la aorta torácica, se extrajeron distintos vasos y órganos para estudios posteriores, conservándose de la siguiente manera: el corazón, un trozo de riñón y un segmento de aortas torácica y abdominal, fueron fijados en formol al 10% para su análisis histológico y estudio de las alteraciones estructurales y morfológicas. El resto de las muestras (orina, plasma y riñón), se mantuvieron en el congelador a -80°C para determinar:

- La proteinuria mediante el ensayo de proteínas.
- Los niveles de EO mediante el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- La concentración de Na^+ en orina usando el electrodo de sodio.
- Niveles de NO, mediante la determinación de nitritos con la reacción de Griess.

3.4.3 Compuestos químicos

Todos los compuestos químicos utilizados se compraron a Sigma-Aldrich (Madrid, España) excepto en los casos donde se indica. La acetilcolina, fenilefrina, nitroprusiato sódico y L-NAME se prepararon previamente en agua destilada, en soluciones concentradas 100 veces y se mantuvieron congelados a -20°C . Estas sustancias fueron diluidas en solución Krebs para alcanzar las concentraciones adecuadas el mismo día en que se necesitaron y su concentración está expresada como concentración final en el baño de órganos.

3.4.4 Medidas analíticas

3.4.4.1 Determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

El método espectrofotométrico del TBA es el más comúnmente utilizado para la cuantificación de MDA como medida de peroxidación lipídica, el cual se forma a partir de la descomposición de ciertos productos primarios y secundarios de dicha peroxidación (Bartzatt et al., 2013).

La reacción ocurre por ataque del MDA sobre el grupo metileno activo del TBA (Figura 56). Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura formando un pigmento rosa (Guillermo Reglero, 2008). La velocidad de esta reacción depende de la concentración de TBA, la temperatura y el pH. El pigmento generado posee un pico máximo de absorbancia a 532-535 nm y otro secundario a 245-305 nm (Russell O. Sinnhuber and Teh C. Yu, 2006).

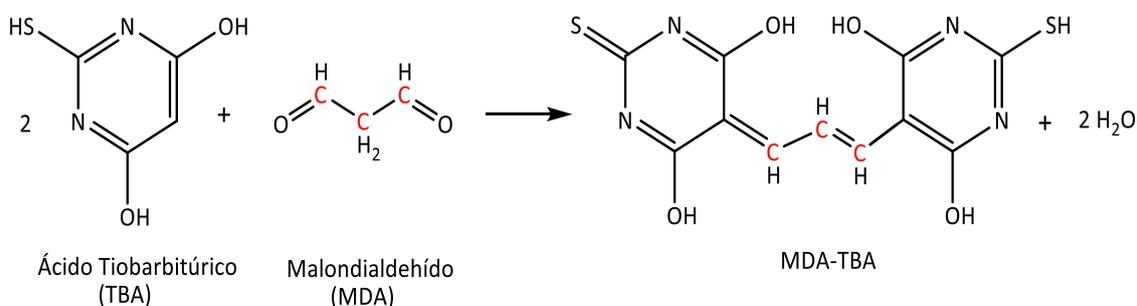


Figura 54. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico

Los TBARS se determinaron en todos los grupos experimentales en muestras de riñón, plasma y orina. Las muestras plasmáticas y de orina se obtuvieron como se mencionó antes. Las muestras o lisados de riñón se obtuvieron de la siguiente forma:

De los riñones congelados a -80°C extraídos del animal, se corta una sección (más o menos similar en todos los grupos: 0,13-0,16 g) de uno de sus extremos, de forma que se obtenga una porción representativa de corteza y médula renal. Luego se mantienen las muestras en nitrógeno líquido y se pulverizan sobre un lecho de hielo carbónico con un biopulverizador (Biospec, OK, USA). El polvillo y trozos de tejido restantes se diluyen en aproximadamente 300

µl de tampón de lisis (a 4°C) y se homogeniza con un homogeneizador (Polytron, PT 10/35, Kinematica, Suiza). Posteriormente, se centrifugan los lisados a 13.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C recuperándose el sobrenadante.

Este método es un ensayo colorimétrico en donde se utiliza 25 µl de cada una de las muestras de plasma, 50 µl de los lisados de riñón (entre 1-3 mg de proteína) o 200 µl de las muestras de orina. A cada una de las muestras junto con los estándares preparados con 1,1,3,3-tetraetoxipropano se les adiciona 0,5 ml de tampón fosfato, se mezcla muy bien para añadirle después 1 ml de la solución que contiene los siguientes reactivos: 0,066% de deferoxamina mesilato; 7,5% de ácido tricloroacético (100%) que hace precipitar las proteínas; 0,25M HCl y 0,37% de ácido tiobarbitúrico. Tras ser agitadas todas las muestras y estándares, se calientan a una temperatura de 100°C (cubiertas con papel de aluminio para evitar la evaporación) en un termobloque digital (Heatblock II, VWR, Thorofare, NJ USA) durante 10-15 min aproximadamente, que es cuando aparece un color rosado.

Se dejan enfriar a temperatura ambiente para añadirles más tarde 1 ml de butanol que ayuda a extraer el color rosa de las muestras. Se agitan luego varias veces los tubos vigorosamente y se centrifugan a 2500 r.p.m, durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, la capa color rosa extraída por el butanol, es la que se mide en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer Plus, Hamburgo, Alemania) a una longitud de onda de 532 nm. Los valores quedan expresados como nmol de TBARS por mg de proteína plasmática, renal o urinaria.

3.4.4.2 Determinación de la excreción de nitritos de orina

Los nitritos en orina se determinan a partir de la conocida reacción de Griess, la cual transcurre a través del siguiente mecanismo: El ión nitrito en medio ácido se encuentra en la forma de ácido nitroso. Éste es capaz de reaccionar con un grupo amino de la sulfanilamida para formar un compuesto de diazonio. En el siguiente paso, por acomplamiento de la sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina se forma un colorante azoico de color fucsia que absorbe a 525 nm y puede ser medido por métodos espectrofotométricos.

En base a lo anterior, 100 µl de orina se mezclan con 50 µl de Sulfanilamida al 1% en fosfato potásico al 5%. A esta mezcla se le añade 50 µl de Naftiletildiamina al 0,1% y se deja incubar 15 minutos. Al cabo de ese tiempo, la concentración de nitritos se cuantifica a partir de la absorbancia medida a una longitud de onda de 550 nm.

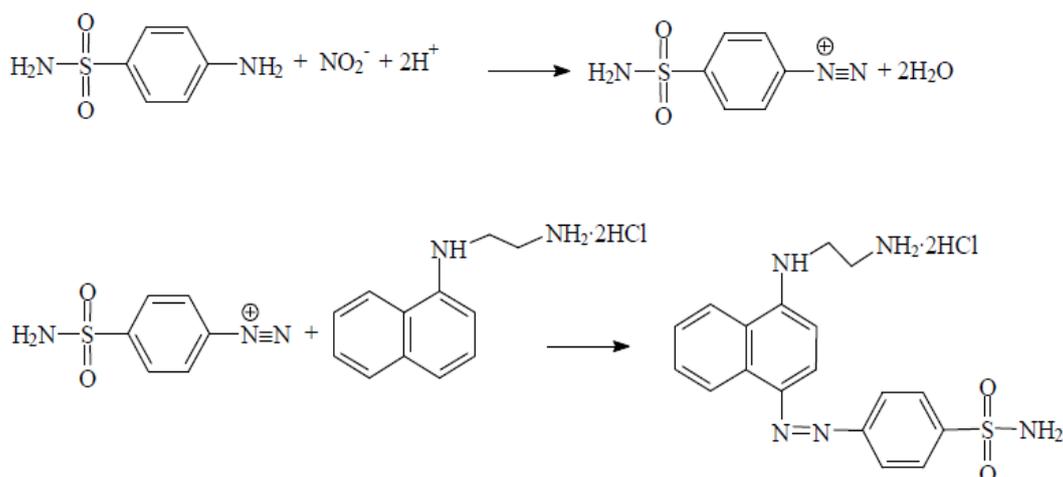


Figura 55. Reacción de Griess

El aparato usado fue un lector de placas (MCC/340, Labsystems Multiskan, Finlandia). Se elaboran unos estándares a concentraciones crecientes de nitrito sódico para obtener la curva patrón así como los blancos de cada una de las muestras (100 μ l de muestra en 100 μ l de agua destilada sin reactivo de Griess). La concentración final de nitritos es expresada en μ g/día.

En el caso del plasma, se añade TCA al 10% previamente, en una relación 1:1, para precipitar y eliminar al máximo las proteínas que pueden interferir en el ensayo. La concentración final de nitritos es expresada en μ g/mL.

3.4.4.3 Determinación de la concentración de proteínas

El contenido de proteína total se determina empleando el método del ácido bicinconínico (BCA). Este método es una modificación del método de (Lowry et al., 1951), que a su vez está basado en la reacción Biuret. El método del BCA consiste en la incubación de una solución de proteínas con una solución que contiene sulfato cúprico (reactivo B) y ácido bicinconínico (reactivo A).

Los enlaces peptídicos de las proteínas, así como los grupos laterales de los aminoácidos cisteína, triptófano y lisina promueven la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^+). El Cu^+ forma un complejo con el ácido bicinconínico dando un color púrpura que absorbe fuertemente luz a 562 nm. Esta absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteína en la solución.

El ensayo empleado es el BCA de Sigma en el que se utilizan volúmenes muy pequeños, de manera que la determinación de la concentración de proteínas se realiza en placas de 96 pocillos. El reactivo A se mezcla con el B en relación 50:1 (v/v) constituyendo el reactivo de trabajo. Las muestras se diluyen 1:5 en el caso del plasma y 1:40 en tejido renal y orinas, y se diseña una curva patrón de estándares a partir de una disolución estándar de albúmina (2 mg/ml). Seguidamente se añaden 10 μ l de la muestra o de los estándares a cada pocillo para luego añadirle 200 μ l del reactivo de trabajo, se agita la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min.

Finalmente, se lee la absorbancia a 570 nm en el mismo lector de placas usado previamente. La concentración de proteína se calcula a partir de la absorbancia obtenida, comparándola con la curva patrón y se expresa en mg/ml.

3.4.4.4 Estudio histopatológico

El procesamiento de las muestras tisulares se llevó a cabo en una serie de etapas que se describen a continuación:

Fijación

Las muestras de tejido cardíaco, riñón y aorta fueron fijadas en formalina tamponada al 10% (Panreac, Barcelona, España) durante 48 horas a temperatura ambiente y posteriormente mantenidas en alcohol etílico al 70% hasta su procesamiento.

Prosección

Una vez fijadas, se seleccionó una sección transversal de 0,5 cm de riñón que incluía cortical y medular, 3 secciones transversales de tejido cardíaco a tres diferentes alturas de cavidades ventriculares; y una sección transversal de aorta torácica de 0,5 cm y otra longitudinal.

Inclusión

Los fragmentos de tejido cardíaco, renal y aórtico fueron introducidos debidamente etiquetados en casetes de plástico (Casa Álvarez, Madrid, España) en un procesador automático de tejidos Excelsior ES (Thermo Scientific, CA, USA) para ser embebidos en parafina según el protocolo que incluye los siguientes reactivos y tiempos de contacto:

Tabla 12. Reactivos y tiempos de contacto de la etapa de inclusión

Reactivo	Tiempo de contacto
Formalina tamponada	1 h
Alcohol etílico 70%	1 h
Alcohol etílico 96%	2 X 1 h
Alcohol absoluto	3 X 1 h
Xileno	3 X 1 h
Parafina	4 X 1 h

Confección de bloques de parafina

Cada una de las muestras fue orientada adecuadamente y fueron confeccionados los bloques de parafina con el tejido embebido en la misma sustancia en una estación de montaje con dosificador de parafina caliente y placa fría a 4°C modelo EC350 (Casa Álvarez, Madrid, España). En el caso de las muestras de aorta, se confeccionó manualmente una matriz de tejido con diferentes casos en el mismo bloque de parafina.

Corte

Tras confeccionar un bloque de parafina las muestras fueron cortadas mediante un micrótopo de rotación tipo Minot (Microm) a 4 micras de espesor. Las secciones tisulares fueron recogidas en baño de flotación, depositadas sobre portaobjetos y secadas en estufa a 37°C durante 24 h.

Tinción

Las secciones tisulares fueron teñidas con hematoxilina-eosina y Ácido Periódico de Schiff. Las secciones tisulares montadas sobre portas secados en estufa a 37°C durante 24 horas fueron introducidas sin desparafinar en un histoteñidor automático modelo Varistain Gemini (Thermo Shandon, CA, USA), siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Tabla 13. Reactivos y tiempos de contacto en la etapa de tinción

Tinción de Hematoxilina-Eosina (Estación de calentamiento 25 min)

Reactivo	Tiempo de contacto
Xilol	3 X 10 min.
Alcohol 100%	1 min.
Alcohol 96%	1 min.
Alcohol 70%	1 min.
Lavado agua corriente	2 min.
Hematoxilina de Harris	2,20 min.
Lavado de agua corriente	1 min.
Agua de Amoniocal	30 seg.
Lavado agua corriente	5 min.
Eosina alcohólica	1 min.
Lavado agua corriente	1 min.
Alcohol 100%	3 X 1 min.
Dejar secar	
Montaje con EUKITT (O. Kindler GmbH, Alemania)	

Tinción Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Estación de calentamiento 25 min)

Reactivo	Tiempo de contacto
Xilol	3 X 10 min.
Alcohol 100%	1 min.
Alcohol 96%	1 min.
Alcohol 70%	1 min.

Reactivo	Tiempo de contacto
Lavado agua corriente	2 min.
Ácido Periódico	10 min.
Lavado agua corriente	1 min.
Reactivo de Schiff	30 min.
Lavado agua corriente	5 min.
Hematoxilina de Harris	2 min.
Lavado agua corriente	1 min.
Alcohol 100%	3 X 1 min.
Dejar secar	
Montaje con EUKITT (O. Kindler GmbH, Alemania)	

Valoración de las tinciones

Las diferentes secciones tisulares fueron observadas al microscopio por un histopatólogo experto que realizó a ciegas (sin conocer los grupos experimentales) la valoración semicuantitativa (dicotómica) y cuantitativa de los siguientes parámetros:

- **Corazón**

- Infartos cardiacos (0: ausencia; 1: presencia) y número de infartos cardiacos medidos en todos los cortes.
- Arteriopatía hialina y necrosis fibrinoide cardiaca (0: ausencia; 1: presencia). Se han observado en todas las arterias coronarias principales e intramurales. Se han visto 3 secciones transversales completas de cada corazón que abarcaban ambas cavidades ventriculares a diferentes niveles.
- Relación luz/pared de las arterias del corazón: Se han medido en las arterias coronarias principales e intramurales.

La evaluación histomorfométrica se llevó a cabo usando un microscopio de luz BX51 (Olympus Optical Company, Ltd., Tokio, Japón) equipado con una cámara de vídeo de alta resolución (3CCD, DP70, Olympus) conectado a un PC y monitor (Intel Core 2, Intel, de Santa Clara, CA), mediante el software histomorfométrico ImageJ® 1.47 (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Se realizaron 5 medidas de cada arteria (pared y luz, extrayendo la relación entre ambas.) con el objetivo 20X.

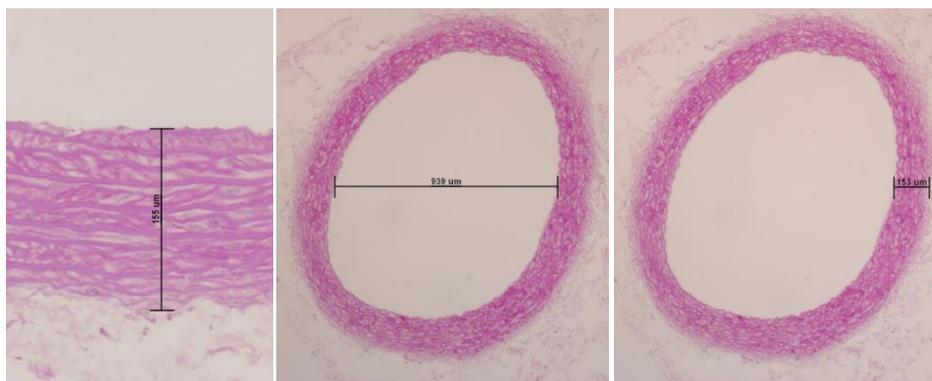


Figura 56. Medición del espesor de la pared muscular y de la relación pared/luz vascular en la aorta torácica de una rata control (Hematoxilina 20x y 4x, respectivamente)

- Espesor del tabique interventricular (lado izquierdo) medido en la zona media de las cavidades cardíacas.
- **Riñón**
 - Arteriopatía hialina renal (0: ausencia; 1: presencia). Se ha determinado en la totalidad de la sección y en la red vascular (arterias y arteriolas).
 - Relación luz/pared de las arterias renales. Se ha determinado en la arteria renal en hilio renal y si no estaba presente, en sus principales divisiones, en la arteria renal superior o inferior.
 - Presencia de cilindros tubulares (0: ausencia; 1: presencia). Se ha examinado en todo el corte, en las regiones cortical y medular.
- **Daño vascular conjunto cardíaco y renal** (0: ausencia; 1: presencia). Se puntuó 1 sólo en el caso de daño en ambos, corazón y riñón. Se puntuó 0 si el daño se restringía a riñón o corazón.
- **Aorta torácica y abdominal**
 - Espesor de la pared aórtica. De cada aorta se han realizado 3 medidas en 3 zonas distintas tomadas al azar y en áreas sin artefactos de corte, a un aumento de 40X.

3.5 Métodos estadísticos

Los resultados están expresados como la media aritmética \pm error estándar de la media.

En los estudios de reactividad vascular para valorar las diferencias dentro de un mismo grupo, se aplica el análisis de varianza simple para comparaciones múltiples, y cuando los resultados fueron significativos se realizó el test de Duncan para obtener las diferencias estadísticas dos a dos.

Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis de varianza doble para comparaciones múltiples y cuando fue necesario, se realizó un test de Duncan posterior.

Para el resto de comparaciones entre grupos, se aplicó un análisis de varianza simple. En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo un valor del nivel de significación $p < 0.05$.

4.1 Diagnóstico de HTA

El diagnóstico de HTA se realizó mediante la medida directa de la PAM en la arteria femoral y/o la medida indirecta de la PAS en el rabo, en los animales hipertensos respecto a sus respectivos controles. Tras 6 semanas de tratamiento con L-NAME nuestros animales mostraron una elevación de la PAM respecto a los animales controles, que fue de $165,31 \pm 6,89$ vs $116,57 \pm 3,18$ mmHg.

En el caso de los animales SHR, en el grupo de 6 semanas, la PAM fue de $162,27 \pm 5,73$ y $112 \pm 3,71$ mmHg en el control. Estos animales tenían unas catorce semanas de edad. En el grupo SHR de 12 semanas, las ratas tenían veinte semanas de edad y la PAM fue de $175,09 \pm 5,44$ y $97 \pm 7,09$ mmHg en el control.

Respecto a la PAS, el grupo SHR de 6 semanas de tratamiento, mostró una PAS de $182,26 \pm 5,65$ y de $117,19 \pm 3,10$ mmHg en el control. El grupo de tratamiento de 12 semanas, la PAS fue de $195,12 \pm 2,79$ y de $138,33 \pm 5,23$ mmHg en el control.

Para el modelo de hipertensión **L-NAME**, no se disponen de datos de la presión sistólica medida mediante el método del manguito en la cola o “tail-cuff”. Ello es debido a que este modelo/ensayo, constituyó el modelo piloto para evaluar inicialmente los potenciales efectos de los flavonoides estudiados y, por consiguiente, únicamente se determinó la PAM. Una vez comprobado que los tratamientos aplicados mostraban efectos significativos, se diseñaron y llevaron a cabo las experiencias con ratas SHR, cuyo modelo de HTA es similar al humano, y es en ellas en las que se ha trabajado tanto con la PAS como con la PAM.

En este modelo de HTA (SHR) también se hizo un estudio de la evolución de la PAS en función del número de semanas en las SHR no tratadas comenzando dicho estudio a las cinco semanas de nacer y llegando como mínimo hasta la semana veinte que correspondería a la doceava semana de tratamiento (los tratamientos se empiezan a aplicar a partir de la octava semana de edad). En él se pudo observar que en la quinta semana, el valor promedio de la medición de la PAS de estas ratas era de 141,20 mmHg, lo cual ponía de manifiesto que ya eran hipertensas. A partir de la undécima semana, se observa un aumento brusco de la presión (186,94 mmHg) siendo máximo en la semana veinte (201,06 mmHg).

Con respecto a la evolución de la FC en función del número de semanas, se observa un comportamiento bastante variable durante las primeras semanas de medición, alcanzándose un

ascenso notable hacia las últimas semanas principalmente, pero sin significación estadística hasta la semana 21 de vida.

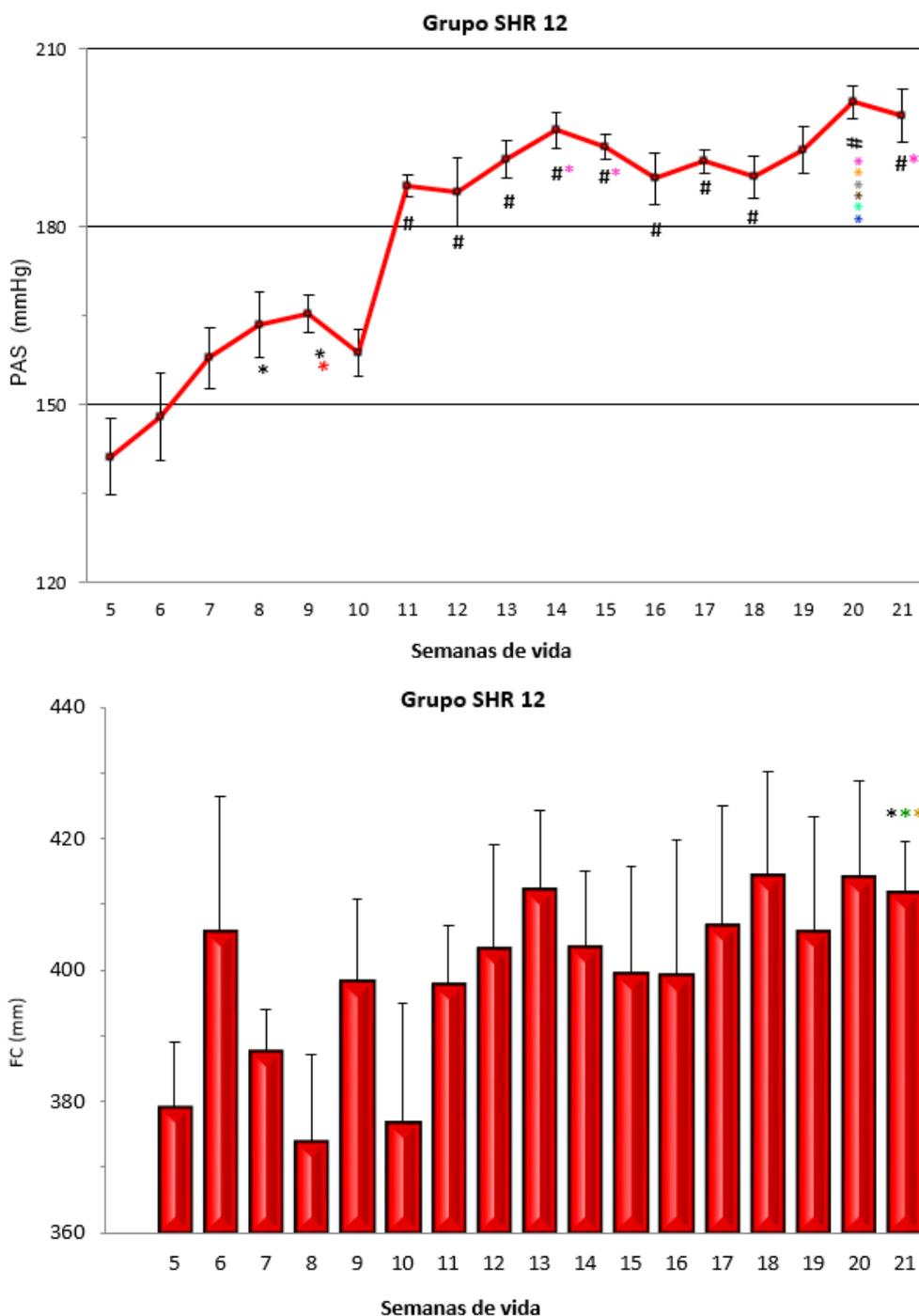


Figura 57. Evolución de la medida de la PAS y de la FC en el modelo de HTA (SHR) para el grupo no tratado.

(*) P<0.05 vs SHR 5; (*) P<0.05 vs SHR 6; (*) P<0.05 vs SHR 7; (*) P<0.05 vs SHR 8; (*) P<0.05 vs SHR 11; (*) P<0.05 vs SHR 12; (*) P<0.05 vs SHR 13; (*) P<0.05 vs SHR 16; (*) P<0.05 vs SHR 17; (*) P<0.05 vs SHR 18. (#) P<0.05 vs SHR 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

En la tabla siguiente se muestran los valores de la evolución de la PAS y la FC para el grupo SHR 12 no tratado:

Tabla 14. Valores de la presión arterial sistólica (PAS) y frecuencias cardíacas (FC) del grupo SHR 12 no tratado.

Nº Semanas de vida	PAS (mmHg)	FC (ppm)
5	141,20±6,52	379,13±9,94
6	147,87±7,34	405,73±20,76
7	157,83±5,08	387,61±6,50
8	163,44±5,51 *	373,83±13,29
9	165,28±3,09 **	398,33±12,42
10	158,80±3,93	376,87±18,06
11	186,94±1,94 #	397,78±9,08
12	185,89±5,70 #	403,33±15,69
13	191,44±3,07 #	412,33±11,97
14	196,33±3,12 # *	403,44±11,55
15	193,56±2,06 # *	399,56±16,14
16	188,22±4,37 #	399,28±20,58
17	191,06±2,05 #	406,67±18,25
18	188,44±3,57 #	414,39±15,83
19	192,89±3,97 #	405,72±17,61
20	201,06±2,69 # ****	414,00±14,73
21	198,83±4,40 # *	411,72±7,80***

(*) P<0.05 vs SHR 5; (*) P<0.05 vs SHR 6; (*) P<0.05 vs SHR 7; (*) P<0.05 vs SHR 8; (*) P<0.05 vs SHR 11; (*) P<0.05 vs SHR 12; (*) P<0.05 vs SHR 13; (*) P<0.05 vs SHR 16; (*) P<0.05 vs SHR 17; (*) P<0.05 vs SHR 18. (#) P<0.05 vs SHR 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

4.2 Efecto de los flavonoides sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca

Presión Arterial Media (PAM)

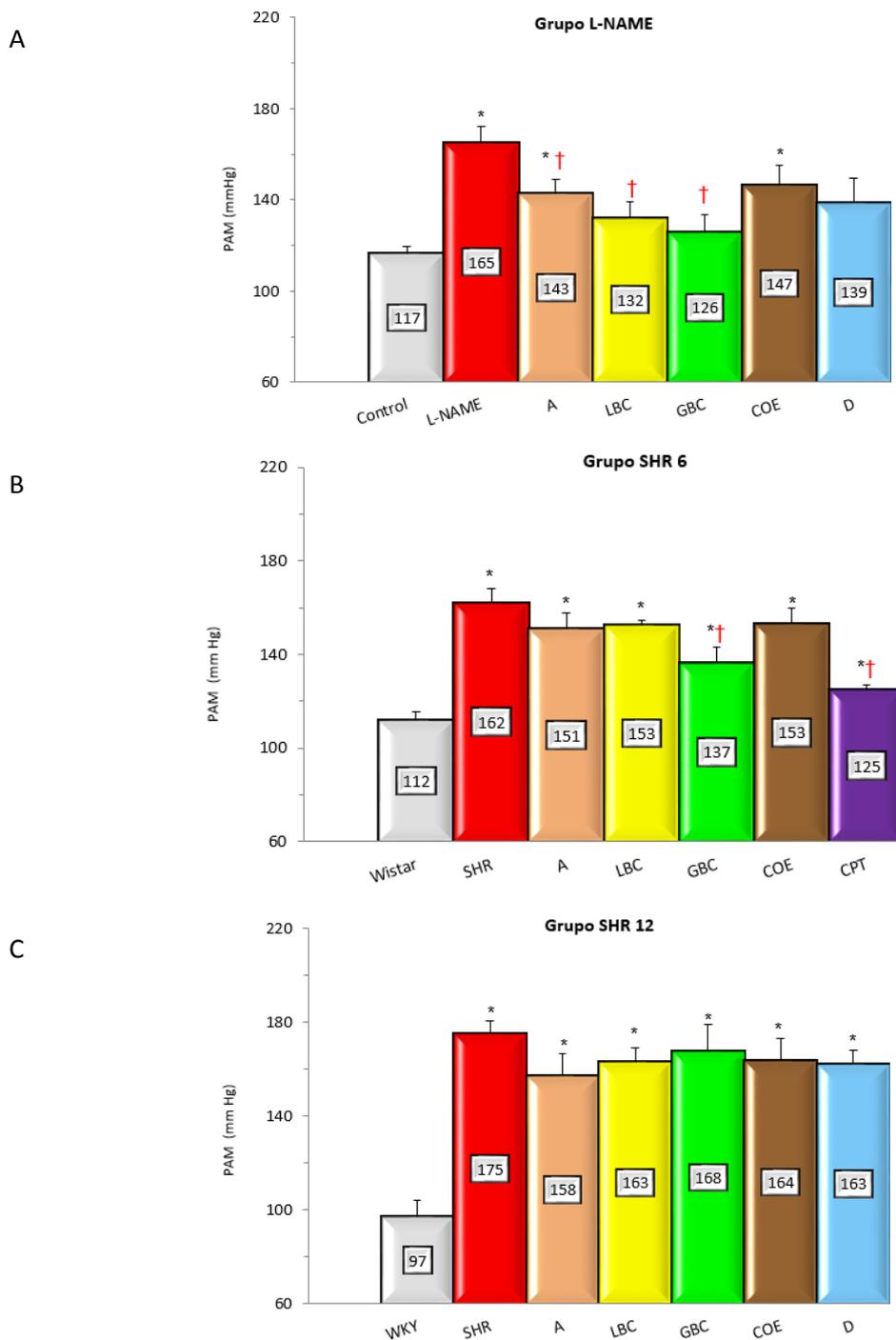


Figura 58. Presión arterial media (PAM) de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), D (Diosmina) y CPT (captopril) (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR.

En el modelo de hipertensión L-NAME (figura 58 A), la PAM de las ratas hipertensas fue aproximadamente 49 mmHg superior a la de las ratas normotensas. Las ratas tratadas

mostraron presiones inferiores a las hipertensas en distintos grados, y aunque no alcanzaron los valores de las ratas control, la mayoría de tratamientos (A, LBC y GBC) sí disminuyeron significativamente los valores de la PAM.

Por lo que se refiere al grupo SHR de seis semanas (figura 58 B), la mayoría de los grupos tratados muestran valores ligeramente inferiores de PA el grupo con HTA sin tratar, destacando un descenso notable y significativo en el caso del tratamiento con GBC (25,6 mmHg) y CPT (37,2 mmHg).

Para las SHR de doce semanas (figura 58 C), no hay datos estadísticamente significativos a pesar de existir una ligera disminución del valor de la PAM de los grupos tratados vs el grupo SHR no tratado.

Presión Arterial Sistólica (PAS) y Frecuencia Cardíaca

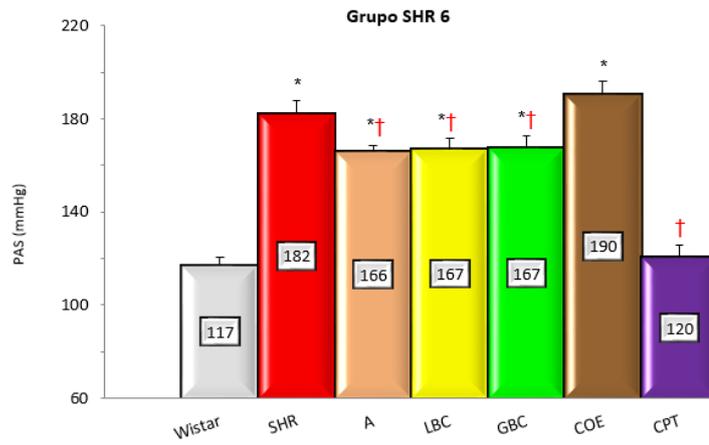
En el grupo **SHR** de seis semanas, todos los tratamientos a excepción del COE muestran menores valores de PAS que el grupo sin tratar. De los grupos tratados, A, LBC y GBC presentan una reducción estadísticamente significativa, en torno al 10% respecto a la PAS del grupo no tratado (a dosis mucho más reducidas que el CPT) y una reducción del incremento de la PAS del -24%. Por otro lado el COE, no mostró efecto alguno a la dosis empleada mientras que el CPT, a dicha dosis, recuperó los valores normales de PA (Fig. 59 A).

En el caso del grupo SHR de doce semanas, en general, todos los grupos con HTA tuvieron cifras mayores de PAS que los de seis a excepción del tratamiento con COE. Además, todos los grupos tratados muestran un comportamiento similar, con valores de PAS inferiores al grupo con HTA no tratado, si bien, la reducción de PA del grupo LBC no fue estadísticamente significativa. Por otro lado, el tratamiento con GBC fue el que presentó el menor valor promedio de PAS, siendo esta reducción estadísticamente significativa respecto al grupo SHR no tratado y cercana al 10%, al igual que ocurría en el grupo de animales de seis semanas. La reducción en el incremento de la PAS, en este caso, fue del 31% (Figura 59 C).

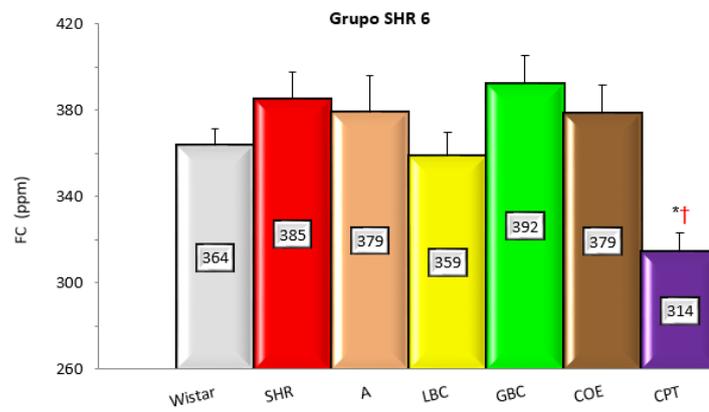
En la variación de la frecuencia cardíaca, se observa, en general, un aumento para los animales SHR de 6 y 12 semanas sin tratar y una reducción para los grupos tratados, excepto el grupo GBC, cuya frecuencia cardíaca presentaba un valor superior en el grupo de seis semanas aunque sin significación estadística (figura 59, tabla 15). Para el grupo de doce semanas la mayores reducciones estadísticamente significativas fueron para los grupos tratados con D (con una reducción del 9,83%) seguidos de COE (con una reducción del 7,96%) y GBC (7,15%) (Figura 59 B y D) y para el de 6 semanas para el grupo tratado con CPT.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

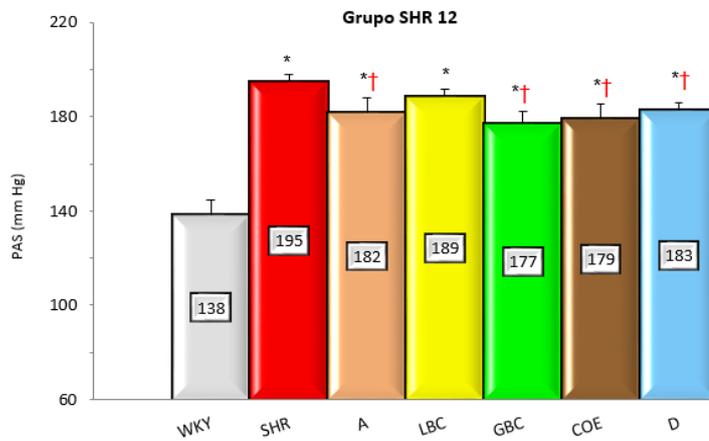
A



B



C



EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

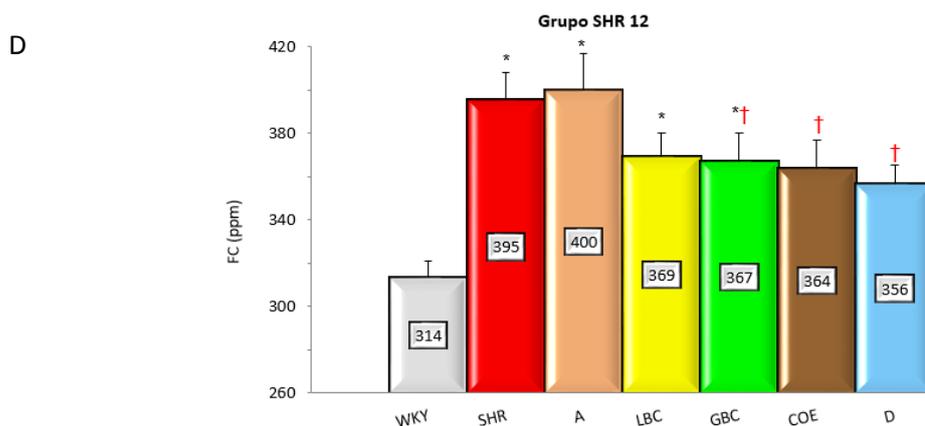


Figura 59. Presión arterial sistólica (PAS) y frecuencia cardíaca (FC) de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR.

En la tabla siguiente se muestran los valores de PAS y PAM así como la frecuencia cardíaca de la PAS:

Tabla 15. Valores de la presión arterial media (PAM), presión arterial sistólica (PAS) y frecuencias cardíacas (FC) de todos los grupos experimentales.

Tratamientos	PAS (mmHg)	FC (ppm)	PAM (mmHg)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)			
Control	ND	ND	116,57 ± 3,18
NAME	ND	ND	165,31 ± 6,89*
A	ND	ND	142,73 ± 6,12**†
LBC	ND	ND	132,22 ± 7,07 †
GBC	ND	ND	125,66 ± 7,91 †
COE	ND	ND	146,59 ± 8,38 *
D	ND	ND	138,99 ± 10,45
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)			
Wistar	117,19 ± 3,10	363,56 ± 7,50	112,00 ± 3,71
SHR	182,26 ± 5,65*	384,92 ± 12,79	162,27 ± 5,73*
A	165,93 ± 2,68**†	379,20 ± 16,69	151,00 ± 6,96*
LBC	166,77 ± 4,87**†	358,95 ± 10,76	152,73 ± 2,09*
GBC	167,38 ± 5,29**†	392,41 ± 12,91	136,67 ± 6,32**†
COE	190,39 ± 5,55*†‡ψ	378,61 ± 12,96	153,33 ± 6,41*
CPT	120,33 ± 5,10†‡ψ‡	314,33 ± 9,05**†‡ψ‡	125,00 ± 1,83 **†‡ψ‡

Tratamientos	PAS (mmHg)	FC (ppm)	PAM (mmHg)
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)			
WKY	138,33 ± 6,10	313,56 ± 17,08	97,00 ± 7,09
SHR	195,12 ± 2,79 *	395,33 ± 10,11*	175,09 ± 5,44 *
A	181,67±6,30*†	399,83 ± 8,27*	157,50 ± 9,20 *
LBC	188,79 ± 2,85*	369,17 ± 11,76*	163,33 ± 5,94 *
GBC	177,08 ± 5,22*†	367,04 ± 5,60 *†Φ	167,80 ± 11,28 *
COE	179,29 ±6,04*†	363,83 ± 12,95†Φ	163,67 ± 9,44 *
D	182,61 ±3,45*†	356,44 ± 12,58†Φ	162,50 ± 5,78 *

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (Ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE.

4.3 Efecto de los flavonoides sobre los parámetros metabólicos

Peso corporal (g)

En el grupo con HTA L-NAME, disminuyó significativamente el peso corporal. En cambio, los grupos tratados mostraron una “tendencia” a recuperar o mantener el peso de los controles normotensos, sobre todo en el caso de la apigenina (A) y, en menor grado, el LBC, COE y GBC, en este orden (tabla 16).

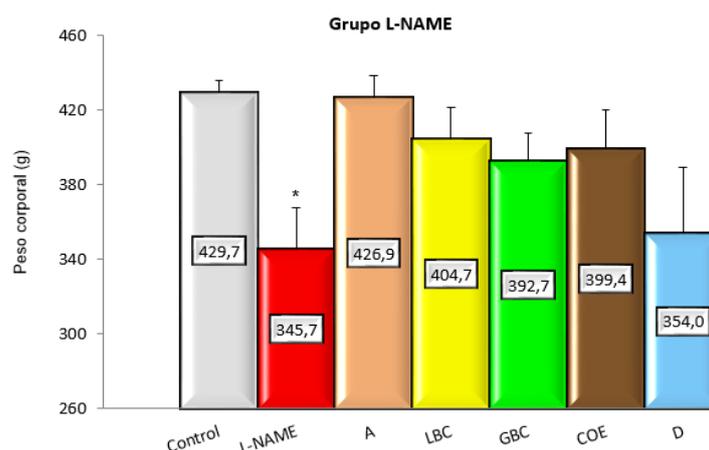


Figura 60. Peso corporal del grupo L-NAME y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, WKY; (†) P<0.05 vs SHR.

En este grupo, la ingesta de bebida (tabla 16) fue similar en todos los grupos (Control: $35,00 \pm 0,54$ ml; L-NAME: $31,25 \pm 4,70$ ml) excepto los grupos L-NAME tratados con LBC ($25 \pm 1,67$) y con GBC ($16,88 \pm 2,48$ ml) cuyos valores fueron significativamente inferiores al grupo Control.

La ingesta de comida (tabla 16) también fue similar entre los grupos Control ($23,05 \pm 0,68$ g), L-NAME ($21,10 \pm 1,21$ g) y el L-NAME tratado con Apigenina ($20,83 \pm 0,63$ g). El resto de grupos (LBC, GBC, COE y D) mostró un descenso significativo respecto al Control.

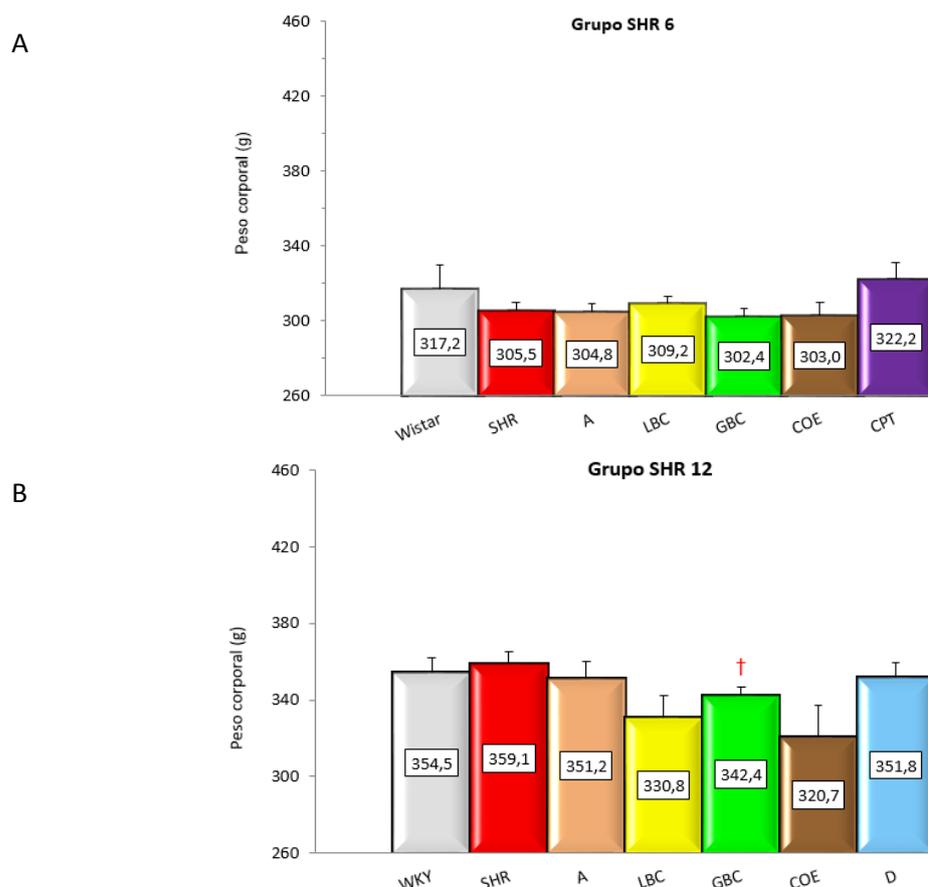


Figura 61. Peso corporal del grupo SHR y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Control, WKY; (†) $P < 0.05$ vs SHR

En el grupo SHR de 6 semanas (figura 61 A), no apreciaron diferencias significativas entre grupos experimentales, si bien se observó que los animales con HTA tratados (excepto el grupo del CPT) mostraron una tendencia a tener menor peso.

Respecto al grupo SHR de 12 semanas (figura 61 B), los mayores descensos de peso, se observaron en los grupos tratados con LBC y COE seguidos de GBC, siendo este último el único que presenta un valor significativamente estadístico.

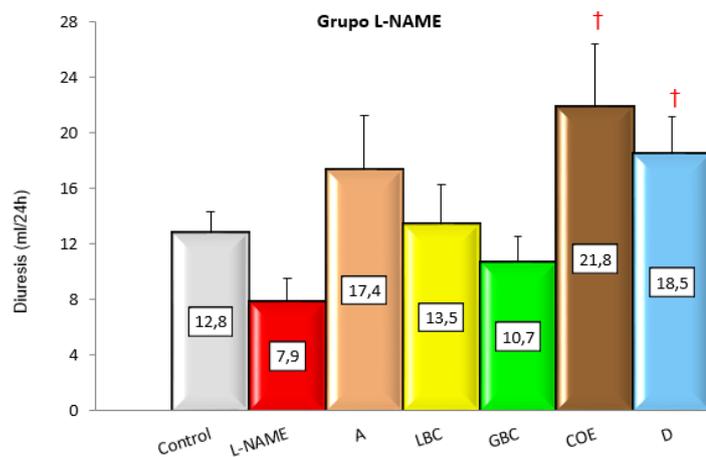
Por lo que se refiere a la ingesta de bebidas (tabla 16), las ratas SHR sin tratar beben menos (SHR 6: $28,37 \pm 0,84$ y SHR 12: $29,03 \pm 1,60$ ml) que sus controles normotensos ($41,55 \pm 4,35$

y $33,93 \pm 1,77$ ml, respectivamente), llegando a ser significativo este valor en el caso del tratamiento de seis semanas de duración. Este descenso también fue significativo para los grupos LBC y GBC en el grupo de seis semanas y para GBC en el de doce semanas. El resto de los grupos no mostraron diferencias significativas respecto a los grupos controles normotensos.

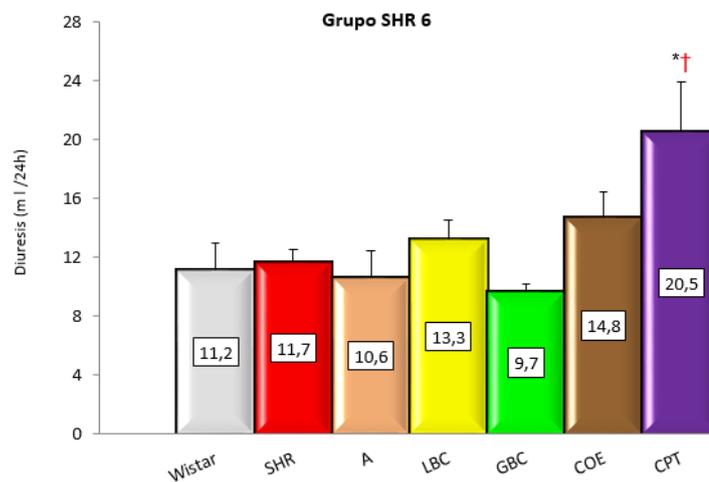
Por otro lado, no hay diferencias significativas en la cantidad de comida ingerida en ambos grupos SHR (Tabla 16), excepto para el grupo LBC en el grupo de seis semanas y para el GBC en el de doce semanas.

Diuresis (ml/ 24h)

A



B



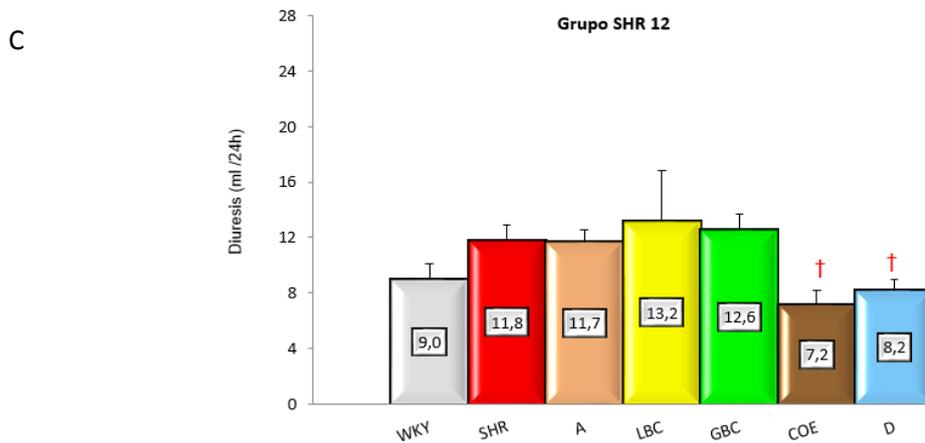
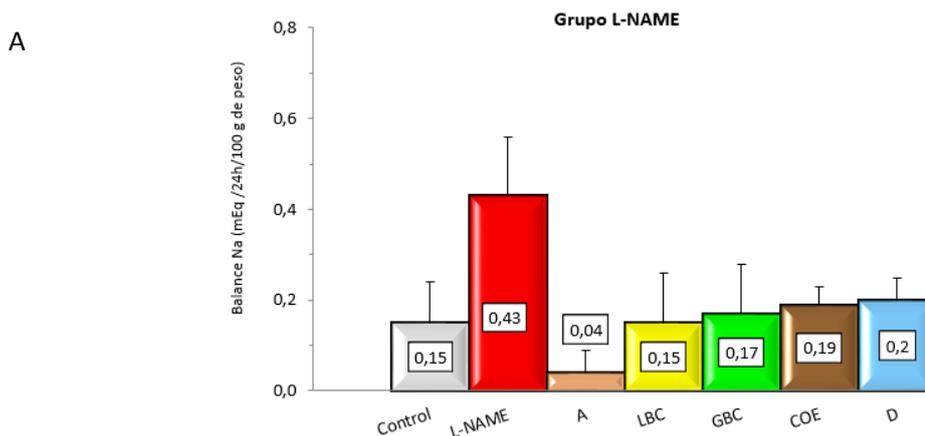


Figura 62. Diuresis de todos los grupos experimentales y efecto de los tratamientos sobre sus valores A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

En el caso de la HTA L-NAME (figura 62 A), el grupo L-NAME no tratado tiene una diuresis menor que los controles normotensos ($p=0,082$) y muy cerca de ser estadísticamente significativa. Los tratamientos tienden a recuperar la capacidad de diuresis, sobre todo el COE y la D.

En ambos grupos SHR de 6 y 12 semanas (figura 62 B y C), no se observan diferencias en la diuresis entre los diferentes grupos experimentales, excepto en: el grupo CPT en las SHR de 6 semanas, cuya diuresis fue mayor que los dos grupos sin tratamiento; y los grupos COE y D en las SHR de 12 semanas cuya diuresis fue menor que el grupo SHR sin tratar.

Balance de sodio (mEq/ 24h/ 100 g peso)



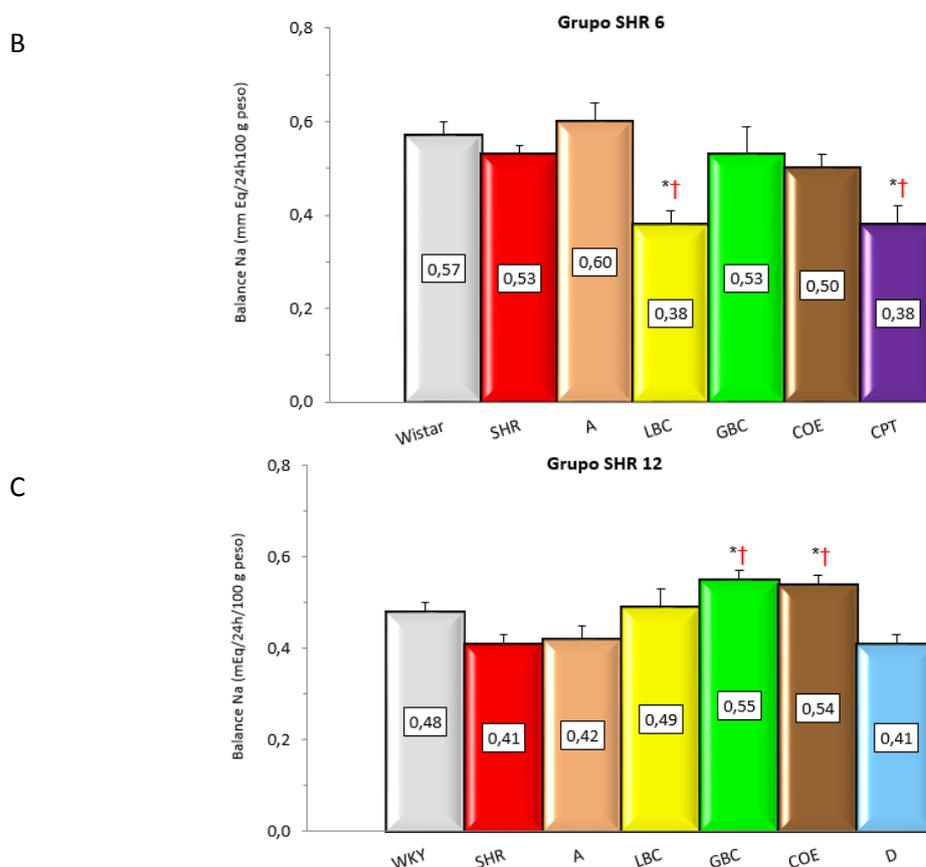


Figura 63. Balance de sodio de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, las ratas con HTA L-NAME (figura 63 A) no tratadas, tienen un balance de sodio superior respecto al grupo control, lo que significa que retienen más sodio. Los diferentes tratamientos muestran en algunos casos valores muy próximos a los del grupo normotenso, indicando que mejoran la excreción renal de sodio.

En los grupos SHR de seis y doce semanas (figura 63 B y C), los valores del grupo hipertenso no tratado son menores a los de los controles aunque sin significación estadística. La mayoría de los grupos tratados muestran valores similares a los controles normotensos excepto los grupos LBC y CPT en las SHR de 6 semanas, cuyos valores son inferiores a los controles y al grupo SHR hipertenso, y los grupos GBC y COE en las SHR de 12 semanas, con valores superiores a los controles y también al grupo SHR.

Por último, el valor del hematocrito fue similar en todos los grupos experimentales del protocolo de HTA-L-NAME. En los otros dos protocolos, todas las ratas SHR con o sin tratamiento presentaron valores superiores a los grupos controles, excepto el grupo CPT que tuvo un hematocrito similar al control.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

A continuación se muestran las tablas resumen con los valores de los parámetros metabólicos estudiados:

Tabla 16. Número de ratas, peso corporal, ingesta de bebidas y comida, diuresis, balance de sodio y hematocrito de todos los grupos experimentales

Tratamiento (Nº ratas)	Peso corporal (g)	Ingesta de bebidas (24h) (ml)	Ingesta de Comida (24 h) (g)	Diuresis (ml/ 24h)	Balance de sodio (mEq/24 h/100 g)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Control (4)	429,73 ± 6,36	35 ± 0,54	23,05 ± 0,68	12,83 ± 1,46	0,15 ± 0,09
NAME (6)	345,73 ± 22,29*	31,25 ± 4,70	21,10 ± 1,21	7,85 ± 1,69	0,43 ± 0,13
A (5)	426,90 ± 11,46	30 ± 0,22	20,83 ± 0,63	17,37 ± 3,85	0,04 ± 0,05
LBC (6)	404,72 ± 16,96	25 ± 1,67 *	18,60 ± 0,49*	13,45 ± 2,79	0,15 ± 0,11
GBC (5)	392,65 ± 14,98	16,88 ± 2,48 * [Ⓞ]	16,10 ± 1,49*	10,65 ± 1,87	0,17 ± 0,11
COE (6)	399,38 ± 20,57	31,24 ± 5,60	16,58 ± 0,90* ^{†Ⓞ}	21,84 ± 4,52 [†]	0,19 ± 0,04 [Ⓞ]
D (6)	353,98 ± 35,38	29,20 ± 2,96 [Ⓜ]	16,88 ± 1,43*	18,48 ± 2,64 [†]	0,20 ± 0,05
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Wistar (6)	317,17 ± 12,40	41,55 ± 4,35	20,92 ± 1,12	11,15 ± 1,85	0,57 ± 0,03
SHR (13)	305,52 ± 4,71	28,37 ± 0,84*	19,35 ± 0,37	11,69 ± 0,85	0,53 ± 0,02
A (5)	304,80 ± 4,36	30,30 ± 1,68	22,44 ± 0,71 [†]	10,64 ± 1,81	0,60 ± 0,04
LBC (13)	309,18 ± 4,26	28,78 ± 1,75*	18,22 ± 0,38* ^{†Ⓞ}	13,26 ± 1,25	0,38 ± 0,03 * ^{†Ⓞ}
GBC (13)	302,36 ± 4,64	26,90 ± 0,88*	19,84 ± 1,40 [Ⓞ]	9,67 ± 0,54	0,53 ± 0,06 [Ⓜ]
COE (6)	302,97 ± 6,90	33,13 ± 1,78 [†] [Ⓜ]	19,98 ± 0,66 [Ⓜ]	14,75 ± 1,74 [Ⓜ]	0,50 ± 0,03 [Ⓞ] [Ⓜ]
CPT (6)	322,17 ± 9,17	39,80 ± 4,21 [†] [Ⓜ] [Ⓜ]	18,48 ± 0,9 [Ⓞ]	20,53 ± 3,38* ^{†Ⓞ} [Ⓜ] [Ⓜ]	0,38 ± 0,04* [†] [Ⓞ] [‡]
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)					
WKY (6)	354,52 ± 7,72	33,93 ± 1,77	17,72 ± 0,80	8,98 ± 1,16	0,48 ± 0,02
SHR (9)	359,06 ± 5,88	29,03 ± 1,60	18,17 ± 0,77	11,82 ± 1,09	0,41 ± 0,02
A (6)	351,17 ± 8,65	28,27 ± 1,51	19,40 ± 0,82	11,70 ± 0,85	0,42 ± 0,03
LBC (5)	330,76 ± 11,81	28,94 ± 4,45	18,72 ± 0,58	13,18 ± 3,67	0,49 ± 0,04
GBC (6)	342,37 ± 4,63 [†]	33,68 ± 2,02*	20,10 ± 0,62*	12,57 ± 1,14	0,55 ± 0,02* [†] [Ⓞ]
COE (6)	320,68 ± 16,34	25,67 ± 1,07	18,55 ± 0,70	7,18 ± 1,04 [†] [Ⓜ] [Ⓜ]	0,54 ± 0,02* [†] [Ⓞ]
D (6)	351,75 ± 7,99	20,57 ± 0,98 [Ⓜ]	17,42 ± 0,50 [Ⓜ]	8,20 ± 0,75 [†] [Ⓞ] [Ⓜ]	0,41 ± 0,02 [Ⓜ] [‡]

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (Ⓞ) P<0.05 vs A; (Ⓜ) P<0.05 vs LBC; (Ⓜ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE.

Tabla 17. Valores de hematocrito de todos los grupos experimentales

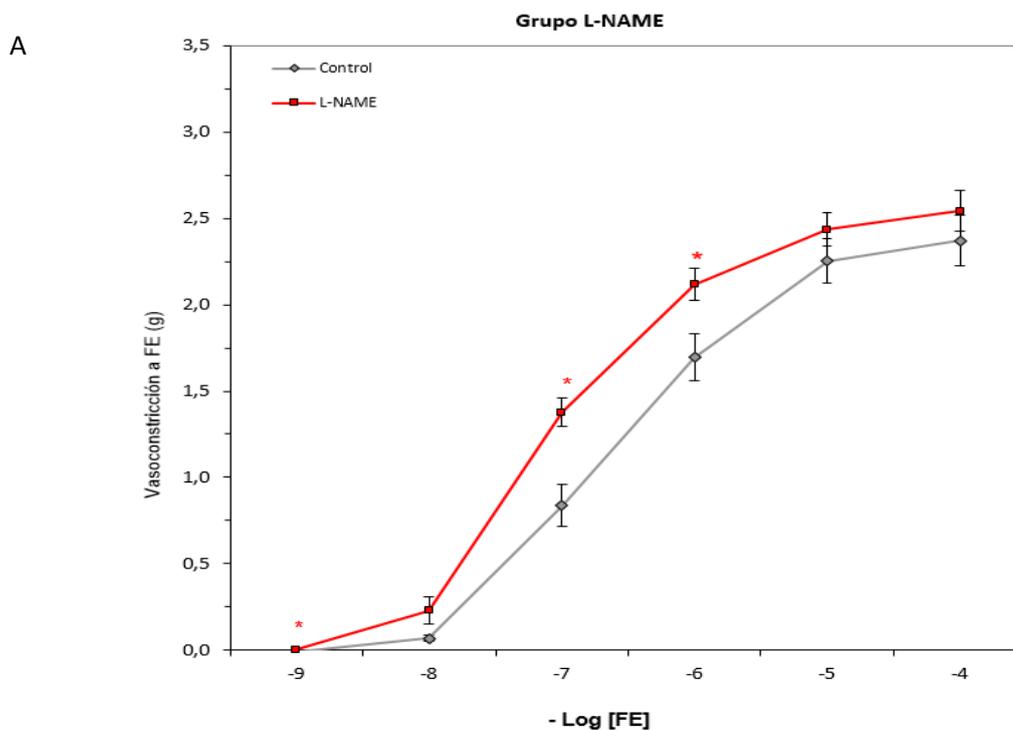
Tratamiento (Nº ratas)	Hematocrito (%)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=80)	
Control (4)	47,38 ± 0,47
NAME (6)	47,20 ± 1,20
A (5)	50,67 ± 2,38
LBC (6)	49,83 ± 1,21
GBC (5)	48,75 ± 3,35
COE (6)	49,40 ± 1,47
D (6)	49,00 ± 0,89
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=79)	
Wistar (6)	47,50 ± 0,56
SHR (13)	55 ± 1,06*
A (5)	53 ± 0,45*
LBC (13)	54,12 ± 0,80*
GBC (13)	54,73 ± 1,26*
COE (6)	51,50 ± 0,72* [†]
CPT (6)	49,67 ± 1,89 ^{†‡ψ}
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=62)	
WKY (6)	45,50 ± 0,56
SHR (9)	50,55 ± 0,90*
A (6)	52,17 ± 1,08*
LBC (5)	49,50 ± 0,43* [Ⓞ]
GBC (6)	48,40 ± 0,40*
COE (6)	50,43 ± 1,00*
D (6)	50,60 ± 0,81* ^ψ

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (Ⓞ) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE.

4.4 Efecto de los flavonoides en las respuestas vasculares de la aorta torácica

Respuesta vasoconstrictora a FE

En el modelo de hipertensión L-NAME, la **respuesta vasoconstrictora** a FE (agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos) es similar en todos los grupos, siendo la máxima respuesta del grupo L-NAME sin tratar ligeramente superior a la del control normotenso. Además, el valor ED_{50} de la respuesta vasoconstrictora del grupo L-NAME (tabla 19) es muy inferior al del grupo normotenso indicando que a una misma dosis el grupo L-NAME respondió más, con las dosis más bajas, que el grupo Control (reflejando el desplazamiento de la curva a la izquierda en la Figura 64 A). También presentaron una ED_{50} inferior al grupo Control, los tratamientos con GBC, COE y D.



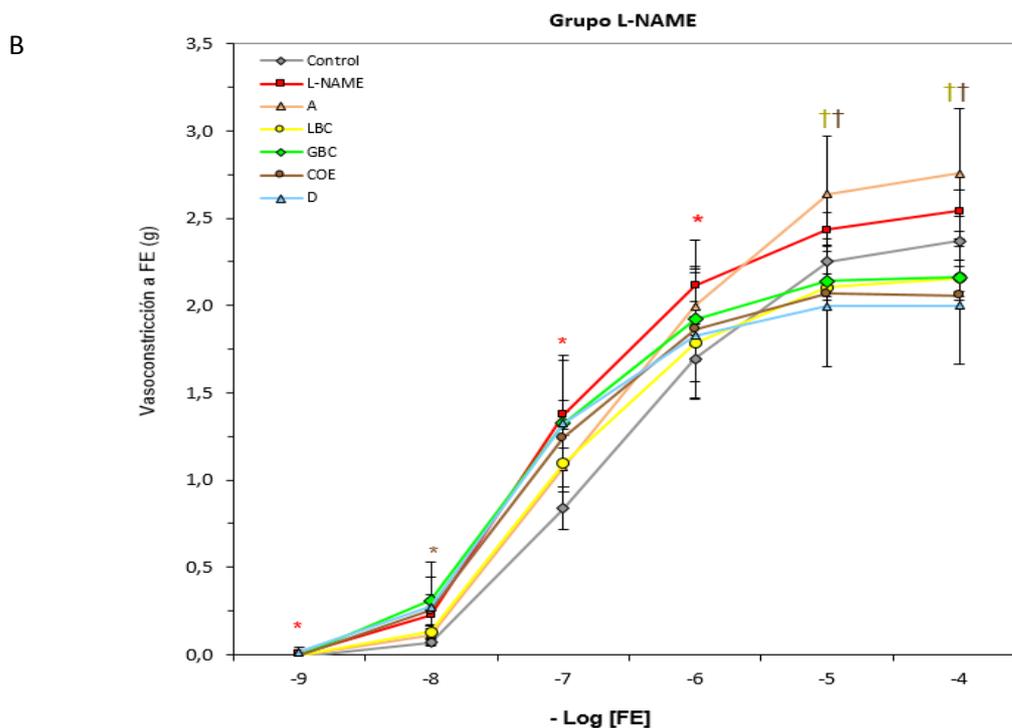


Figura 64. (A) Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de los grupos control y L-NAME no tratado; (B) Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de todos los grupos experimentales para el protocolo L-NAME.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ L-NAME vs Control; (*) $P < 0.05$ COE vs Control; (†) $P < 0.05$ LBC vs L-NAME; (†) $P < 0.05$ COE vs L-NAME.

En las ratas SHR, todos los grupos con HTA tratados y sin tratar, presentaron contracciones inferiores al grupo control, excepto el grupo LCB de 12 semanas, cuyo valor máximo no fue diferente del control. El valor de ED_{50} fue similar en todos los grupos experimentales.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

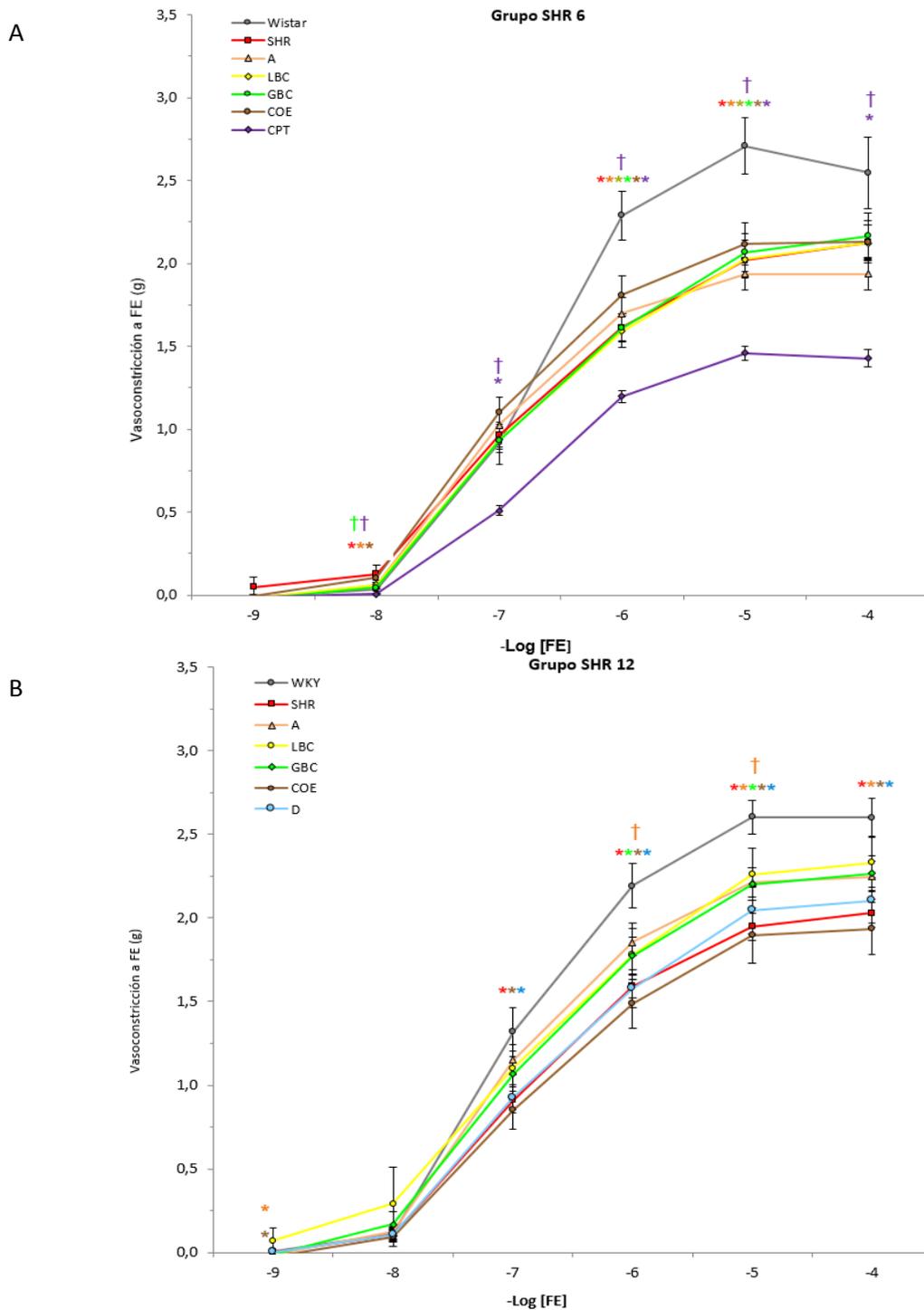


Figura 65. Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de todos los grupos experimentales para el protocolo SHR 6 y 12.

(*) $P < 0.05$ SHR vs Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ A vs Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ LBC vs Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ GBC vs Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ COE vs Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ CPT vs Wistar; (*) $P < 0.05$ D vs WKY; (+) $P < 0.05$ A vs SHR; (+) $P < 0.05$ GBC vs SHR; (+) $P < 0.05$ CPT vs SHR.

Por tanto, en la respuesta vasoconstrictora a FE, el comportamiento de las ratas L-NAME y las SHR sin tratamiento es totalmente diferente respecto a las ratas control. En el grupo

hipertenso L-NAME, la contracción es algo superior a la del grupo control y en ambos grupos SHR, es inferior a la del grupo control.

Si comparamos las máximas respuestas a FE, antes y después de administrar L-NAME 10^{-4} M, observamos que en presencia de L-NAME (10^{-4} M) (tabla 18), todos los grupos mostraron valores inferiores de la respuesta vasoconstrictora a FE respecto a las ratas control, siendo los valores de GBC, COE y D, estadísticamente significativos.

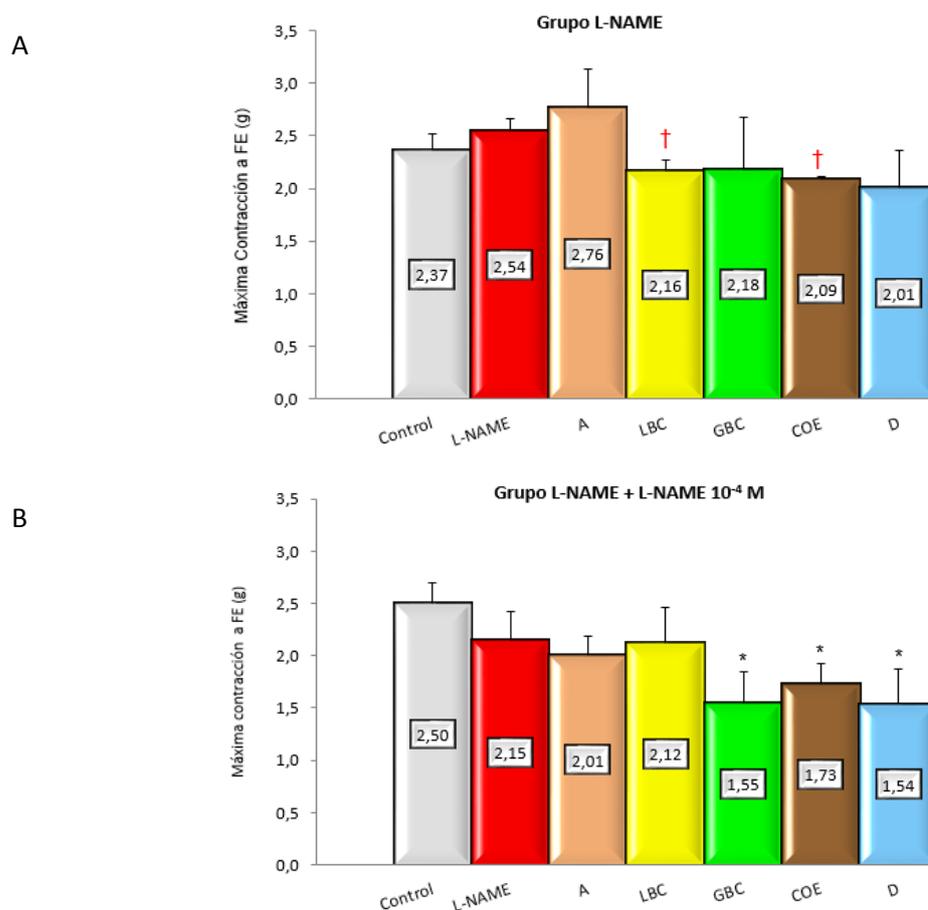


Figura 66. (A) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina y (B) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina tras la administración aguda de L-NAME (10^{-4} M) de todos los grupos experimentales del protocolo L-NAME.

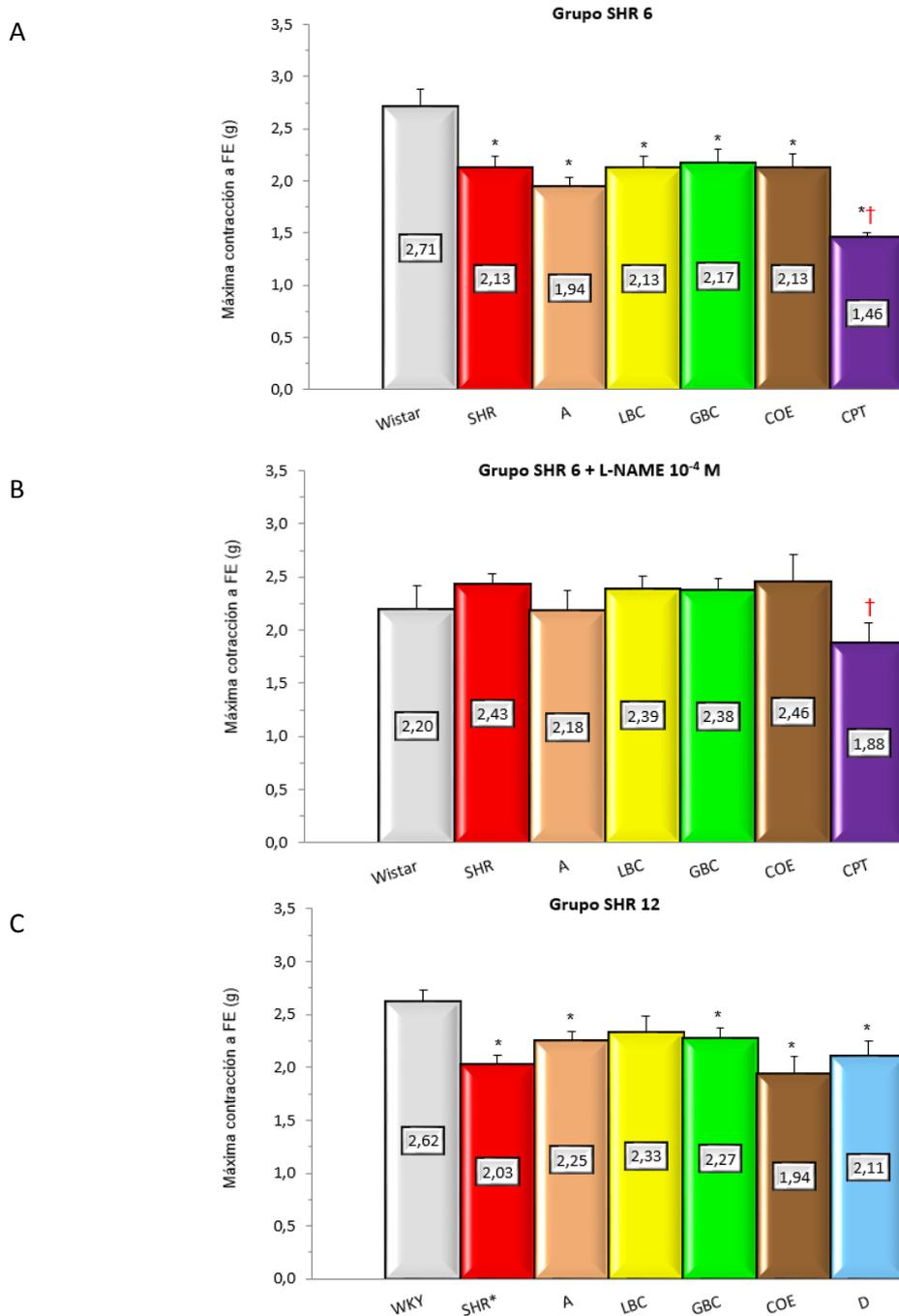
A (Apigenina), LBC (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Control, Wistar, WKY; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

En las ratas SHR de 6 semanas de tratamiento, todos los grupos tuvieron una contracción máxima a FE significativamente inferior al grupo Control, y el grupo que recibió captopril fue además significativamente menor que el resto de grupos tratados con flavonoides (figura 67 A). En presencia de L-NAME (figura 67 B, tabla 18), estas diferencias se disiparon y sólo el captopril mantuvo una menor contracción a FE con respecto a los grupos SHR, LBC y GBC.

De forma casi paralela a las SHR de 6 semanas, en las SHR de 12 semanas (figura 67 C), todos los grupos tuvieron una contracción máxima a FE significativamente inferior al grupo Control,

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

excepto el LBC. Igualmente, estas diferencias desaparecieron tras la administración de L-NAME 10^{-4} M (figura 67 D), a excepción del grupo COE que mostró un valor inferior al del Control normotenso.



D

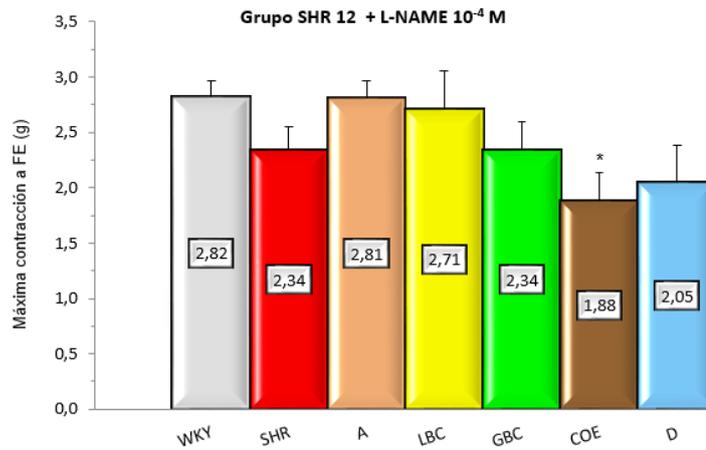
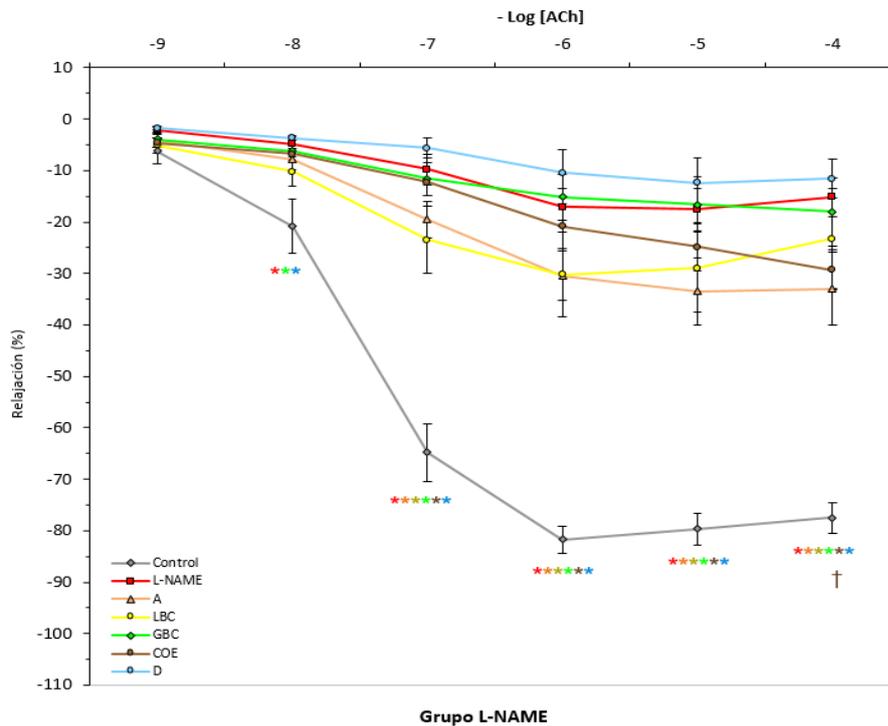


Figura 67. (A) y (C) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina; (B) y (D) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina tras la administración aguda de L-NAME (10⁻⁴ M) de todos los grupos experimentales del protocolo SHR 6 y 12. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR.

Respuesta vasodilatadora a ACh

A



EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

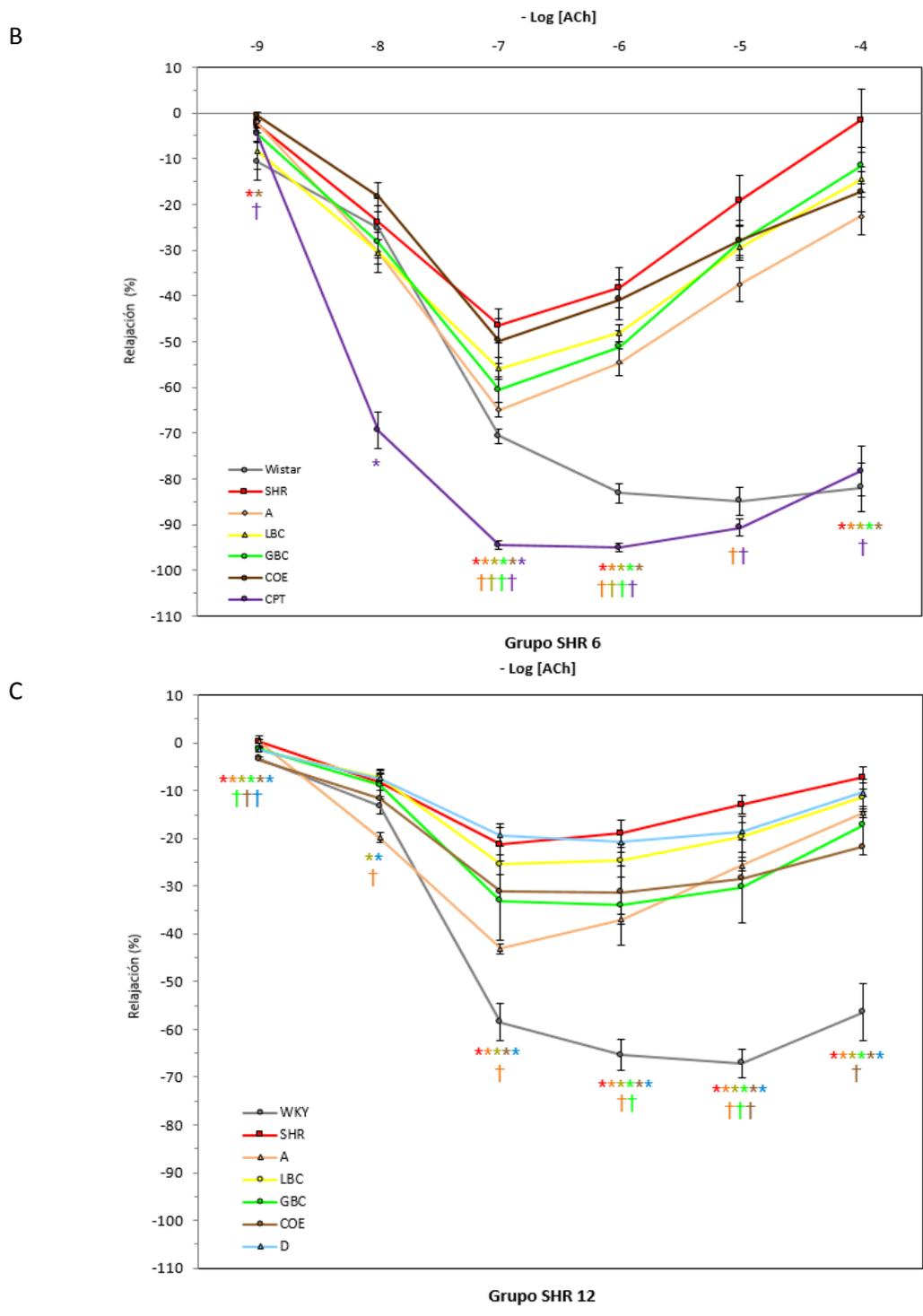


Figura 68. Reactividad vascular aórtica a Acetilcolina de todos los grupos experimentales para el protocolo L-NAME, SHR 6 y 12.

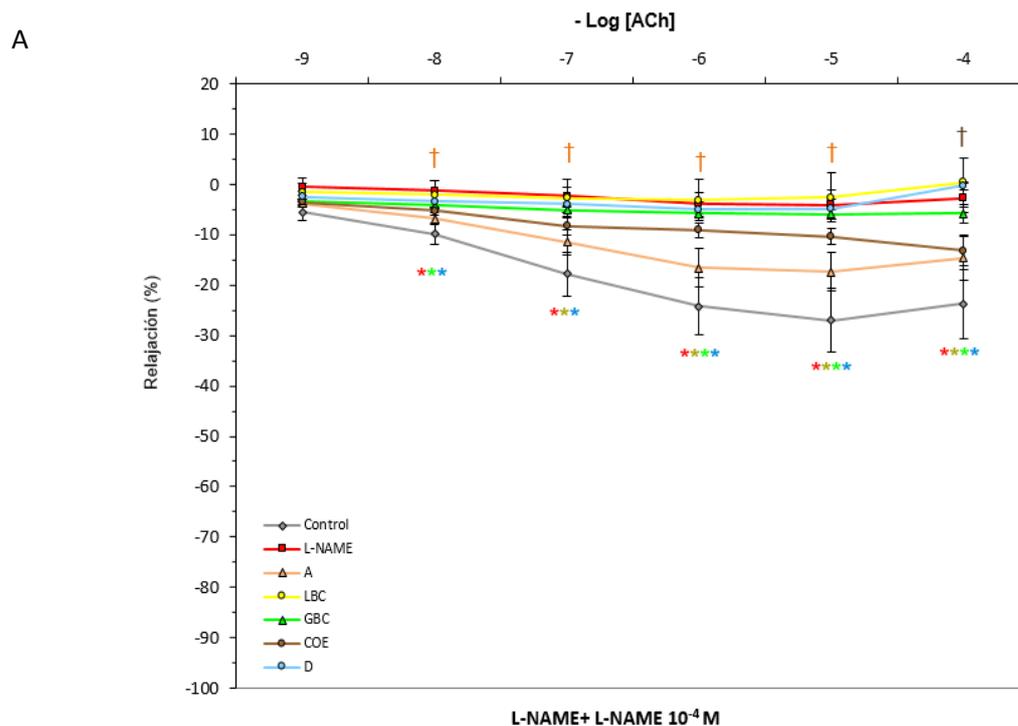
(*) P<0.05 SHR o L-NAME vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 A vs Control, wistar o WKY; (*) P<0.05 LBC vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 GBC vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 COE vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 D vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 CPT vs Control, Wistar o WKY; (†) P<0.05 A vs SHR (†) P<0.05 LBC vs L-NAME o SHR; (†) P<0.05 GBC vs SHR; (†) P<0.05 COE vs L-NAME o SHR; (†) P<0.05 CPT vs SHR.

La respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio (figura 68) en todos los grupos hipertensos no tratados (línea roja) fue significativamente inferior respecto a los grupos controles. Esta reducción fue más llamativa en la HTA L-NAME, seguida por el grupo SHR de 12 semanas y por último, por el grupo SHR de 6 semanas.

Con respecto a los grupos tratados, en el caso del grupo con hipertensión L-NAME (figura 68 A), la vasorrelajación tiende a mejorar en los grupos A, LBC y COE con respecto al grupo no tratado aunque esta mejoría no fue estadísticamente significativa.

Para el grupo SHR de seis semanas, A, LBC y GBC tienen un efecto positivo sobre la relajación que es estadísticamente significativo vs el grupo SHR no tratado (figura 68 B). Pero únicamente el CPT llega a alcanzar y sobrepasar la respuesta del grupo normotenso.

En el caso del grupo SHR de doce semanas (figura 68 C), sólo la A aumentó la relajación con un valor estadísticamente significativo vs al grupo SHR no tratado, mientras que en el resto de grupos la aparente mejoría no fue estadísticamente significativa (tabla 19).



EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

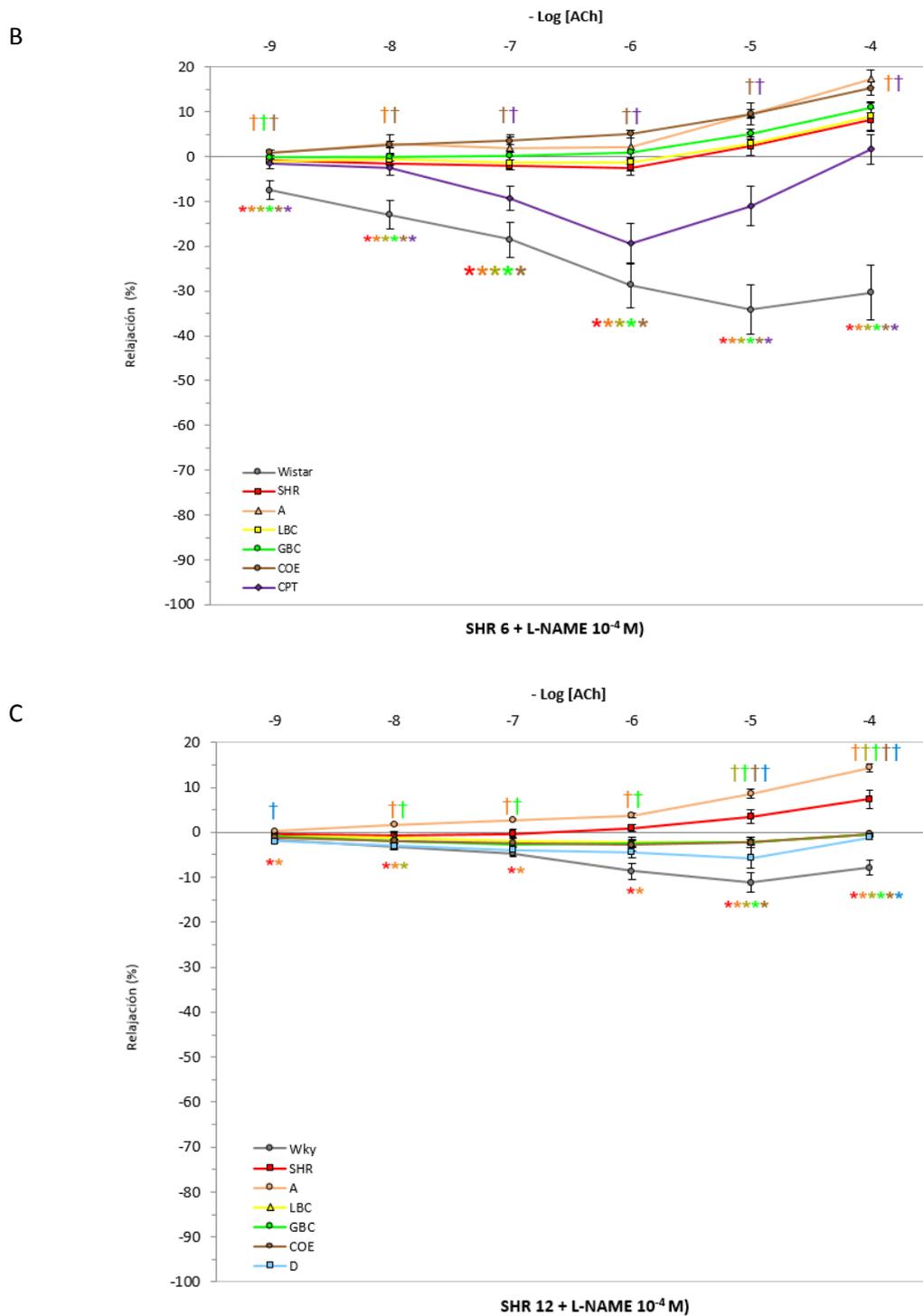


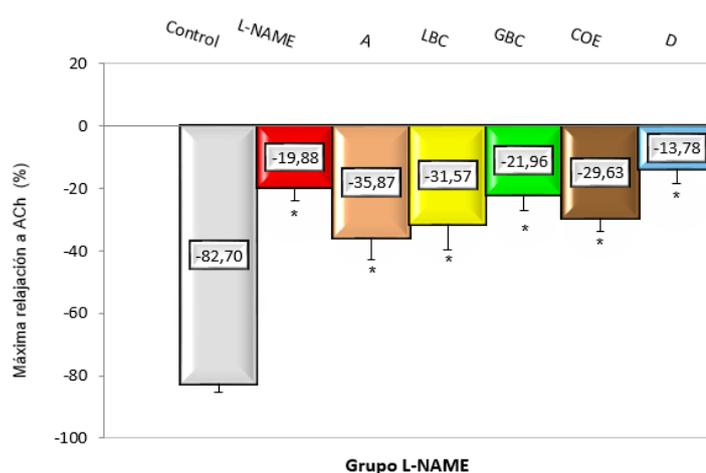
Figura 69. Efecto de la administración aguda de L-NAME (10⁻⁴ M) sobre la reactividad vascular a Acetilcolina en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 SHR o L-NAME vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 A vs Control, wistar o WKY; (*) P<0.05 LBC vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 GBC vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 COE vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 D vs Control, Wistar o WKY; (*) P<0.05 CPT vs Control, Wistar o WKY; (†) P<0.05 A vs SHR; (†) P<0.05 LBC vs L-NAME o SHR; (†) P<0.05 GBC vs SHR; (†) P<0.05 COE vs L-NAME o SHR; (†) P<0.05 CPT vs SHR.

Por otro lado, en presencia de L-NAME 10^{-4} M, la respuesta de relajación a ACh de la mayoría de los grupos prácticamente se anuló, siendo más notable este efecto en el grupo SHR de seis semanas, seguido por el de doce. Esto sugiere que en estos dos grupos hay una mayor cantidad de NO endotelial que está siendo inhibida por L-NAME, sobre todo en el SHR de 6 semanas.

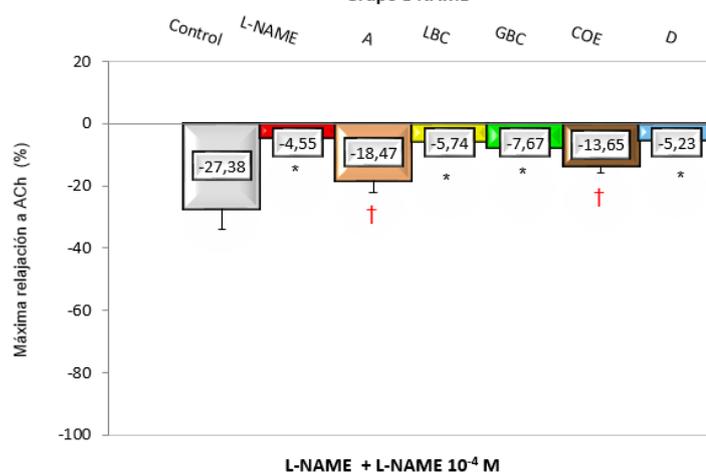
Cuando se comparan las máximas relajaciones a ACh antes y después del L-NAME, se observan los mismos efectos descritos anteriormente en la curva de ACh.

Tras la incubación con L-NAME, el protocolo HTA-L-NAME presentó porcentajes de relajación ligeramente superiores al protocolo SHR, destacando los mayores valores de los tratamientos A y COE, los cuales muestran significación estadística respecto al grupo hipertenso sin tratar. Por lo que respecta a los grupos SHR, sus valores fueron prácticamente nulos lo que indicaría que el NO es el responsable de la mayor parte de la relajación de estas arterias y que el efecto beneficioso de algunos tratamientos sobre esta respuesta sería debido a una mayor producción de NO.

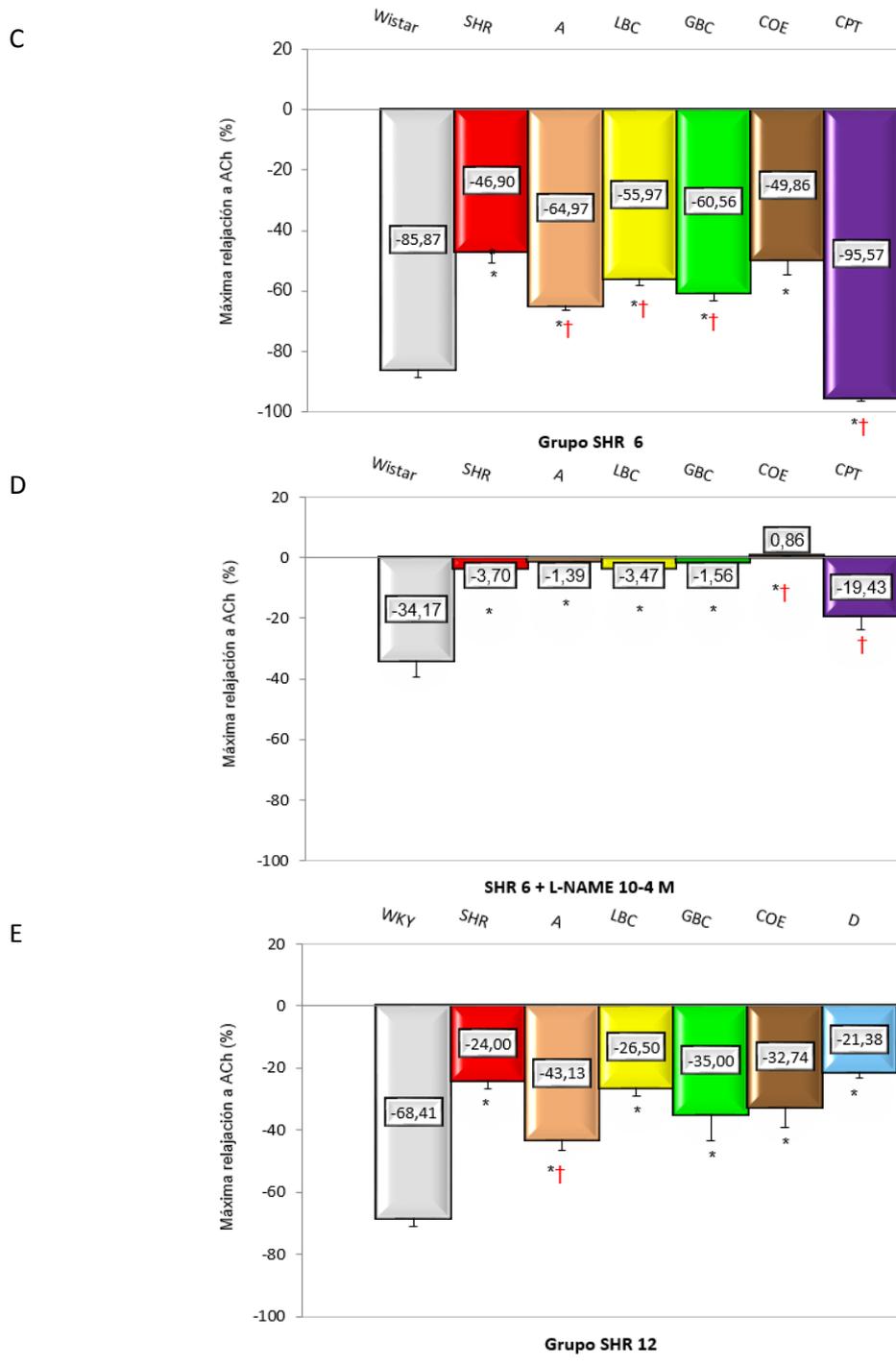
A



B



EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL



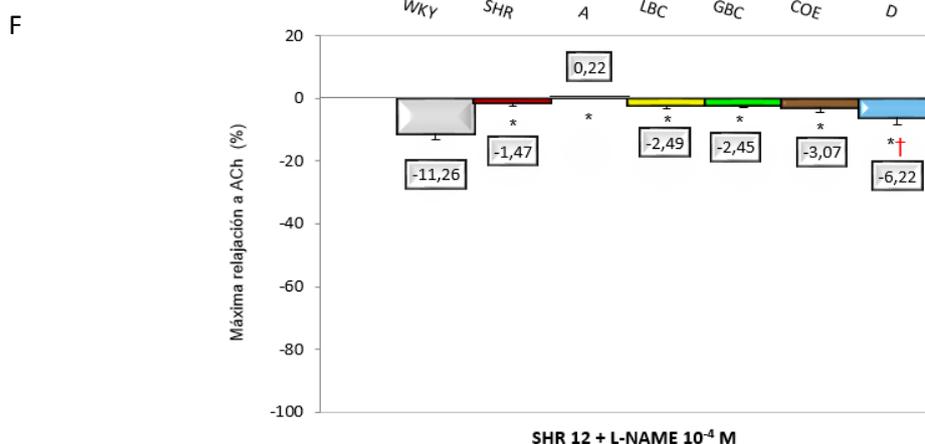


Figura 70. Máximas relajaciones a ACh antes y después de la administración aguda de L-NAME (10⁻⁴ M) en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs L-NAME o SHR.

En la siguiente tabla se muestran los valores de la máxima respuesta aórtica de contracción a fenilefrina y relajación a acetilcolina tras la administración de L-NAME 10⁻⁴ M:

Tabla 18. Valores de la máxima respuesta aórtica de contracción a fenilefrina y relajación a acetilcolina tras la administración aguda de L-NAME 10⁻⁴ M de todos los grupos experimentales

Anillos aórticos	Reactividad vascular	
	Máxima Contracción + L-NAME 10 ⁻⁴ M (g)	Máxima Relajación + L-NAME 10 ⁻⁴ M (g)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)		
Control (4)	2,50±0,20	-27,38±6,54
L-NAME (6)	2,15±0,27	-4,55±2,70*
A (5)	2,01±0,18	-18,47±3,92†
LBC (6)	2,12±0,34	-5,74±3,93*
GBC (5)	1,55±0,29*	-7,67±1,02* φ
COE (6)	1,73±0,19*	-13,65±2,40† ψ
D (6)	1,54±0,33*	-5,23±1,81* φ ‡
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)		
Wistar (6)	2,20±0,22	-34,17±5,45
SHR (13)	2,43±0,10	-3,70±1,46*
A (5)	2,18±0,19	-1,39±2,76*
LBC (13)	2,39±0,12	-3,47±1,43*

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

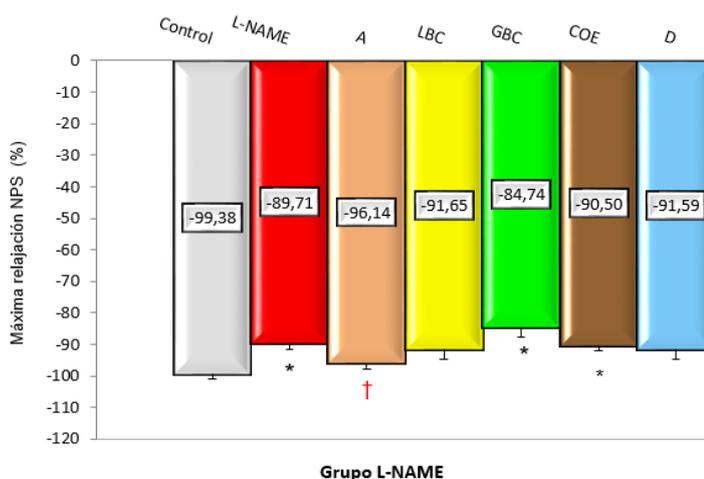
Anillos aórticos	Reactividad vascular	
Tratamiento (Nº ratas)	Máxima Contracción + L-NAME 10 ⁻⁴ M (g)	Máxima Relajación + L-NAME 10 ⁻⁴ M (g)
GBC (13)	2,38±0,11	-1,56±0,65*
COE (6)	2,46±0,25	0,86±0,61*†ψ
CPT (6)	1,88±0,19†ψ	-19,43±4,47†φψ‡
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)		
WKY (6)	2,82±0,15	-11,26±2,14
SHR (9)	2,34±0,21	-1,47±0,94*
A (6)	2,81±0,16	0,22±0,23*
LBC (5)	2,71±0,34	-2,49±1,07*φ
GBC (6)	2,34±0,25	-2,45±0,65*φ
COE (6)	1,88±0,26*φ	-3,07±1,32*φ
D (6)	2,05±0,33	-6,22±2,24*†φ

(*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (φ) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE

Respuesta a Nitroprusiato sódico

La máxima respuesta aórtica a NPS (10⁻⁴ M), fue parecida entre los grupos controles de los tres protocolos de HTA y en los grupos hipertensos sin tratamiento fue significativamente menor respecto a sus respectivos controles: de aproximadamente un 90% en el grupo L-NAME, de un 77% en el grupo SHR de 6 semanas y algo inferior en el grupo SHR de 12 semanas (65 %).

A



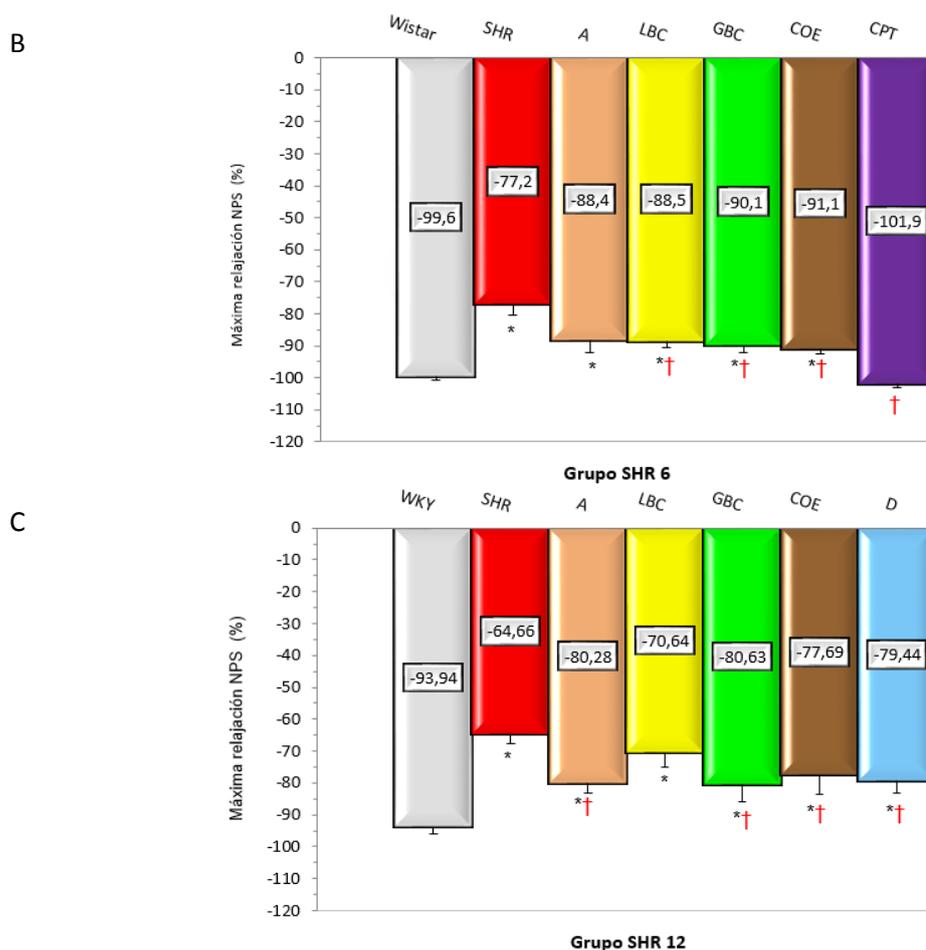


Figura 71. Efecto de la administración aguda de Nitroprusiato Sódico sobre la reactividad vascular a Acetilcolina en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales. A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ SHR o L-NAME vs Control, Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ A vs Control, wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ LBC vs Control, Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ GBC vs Control, Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ COE vs Control, Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ D vs Control, Wistar o WKY; (*) $P < 0.05$ CPT vs Control, Wistar o WKY; (†) $P < 0.05$ A vs SHR; (†) $P < 0.05$ LBC vs L-NAME o SHR; (†) $P < 0.05$ GBC vs SHR; (†) $P < 0.05$ COE vs L-NAME o SHR; (†) $P < 0.05$ CPT vs SHR.

La máxima respuesta aórtica a NPS (10^{-4} M), fue parecida entre todos los grupos del protocolo con HTA L-NAME (figura 71 A), aunque los grupos NAME, GBC y COE presentaron valores significativamente menores que los controles. Sólo la A mostró un aumento significativo de la relajación respecto al grupo hipertenso no tratado.

En el grupo SHR de 6 semanas (figura 71 B), todos los grupos excepto el CPT, mostraron un descenso de la relajación máxima a NPS respecto al control, si bien, todos los tratamientos excepto la A mostraron una mejoría significativa de la respuesta respecto al grupo SHR.

De forma parecida, en el grupo SHR de 12 semanas (figura 71 C), todos los grupos mostraron un descenso de la relajación máxima a NPS, si bien todos los tratamientos excepto el LBC, en este caso, mostraron una mejoría significativa de la respuesta.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

En la tabla siguiente se presentan los valores máximos de las respuestas y la dosis eficaz 50 (ED50) de fenilefrina y acetilcolina de todos los grupos experimentales, así como el número de animales usados para el estudio de la reactividad vascular de anillos aórticos:

Tabla 19. Valores de la dosis eficaz 50 (ED50) de fenilefrina y acetilcolina y de la máxima respuesta aórtica de contracción a fenilefrina y relajación a acetilcolina y a nitroprusiato sódico de todos los grupos experimentales.

Anillos Aórticos	Fenilefrina		Acetilcolina		Nitroprusiato Sódico
	Tratamiento (Nº ratas)	ED50 (10 ⁻⁷ mol/l)	Máxima Contracción (g)	ED50 10 ⁻⁸ mol/l	Máxima Relajación (%)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=80)					
Control (4)	3,90±0,72	2,37±0,15	ND	82,70±2,50	99,38±1,62
L-NAME (6)	1,54±0,22*	2,54±0,12	ND	19,88±4,14*	89,71±2,03 *
A (5)	3,08±0,64	2,76±0,37	ND	35,87±6,89*	96,14±1,73†
LBC (6)	1,98±0,47	2,16±0,10†	ND	31,57±8,23*	91,65±3,12
GBC (5)	0,866±0,04*Φ	2,18±0,49	ND	21,96±5,32*	84,74±2,93*Φ
COE (6)	1,01±0,38*Φ	2,09±0,02†	ND	29,63±3,99*	90,50±1,57*
D (6)	1,18±0,30*Φ	2,01±0,34	ND	13,78±4,77*Φ‡	91,59±3,13
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=79)					
Wistar (6)	2,07±0,20	2,71±0,17	ND	85,87±2,67	99,58±0,99
SHR (13)	2,51±0,33	2,13±0,10*	ND	46,90±3,72*	77,22±3,19*
A (5)	1,65±0,26	1,94±0,10*	ND	64,97±1,63*†	88,43±3,77*
LBC (13)	2,67±0,30	2,13±0,11*	ND	55,97±2,38*†Φ	88,54±1,86*†
GBC (13)	2,76±0,35	2,17±0,13*	ND	60,56±2,72*†Φ	90,09±2,18*†
COE (6)	1,72±0,11‡Ψ	2,13±0,13*	ND	49,86±4,86*	91,07±1,49*†
CPT (6)	2,26±0,26	1,46±0,04*†Φ‡Ψ‡	ND	95,57±0,77*†Φ‡Ψ‡	101,89±1,34†Φ‡Ψ‡
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=62)					
WKY (6)	1,52±0,21	2,62±0,11	ND	68,41±2,80	93,94±2,21
SHR (9)	2,36±0,28	2,03±0,08*	ND	24,00±2,68*	64,66±3,04*
A (6)	1,87±0,21	2,25±0,09*	ND	43,13±3,45*†	80,28±2,80*†
LBC (5)	2,73±0,78	2,33±0,15	ND	26,50±2,58*Φ	70,64±4,60*
GBC (6)	2,10±0,43	2,27±0,10*	ND	35,00±8,44*	80,63±5,48*†
COE (6)	2,92±0,60	1,94±0,16*	ND	32,74±6,39*	77,69±5,82*†
D (6)	2,27±0,37	2,11±0,14*	ND	21,38±2,02*Φ	79,44±3,78*†

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (Ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE.

4.5 Evaluación del Estrés oxidativo

TBARS plasmáticos

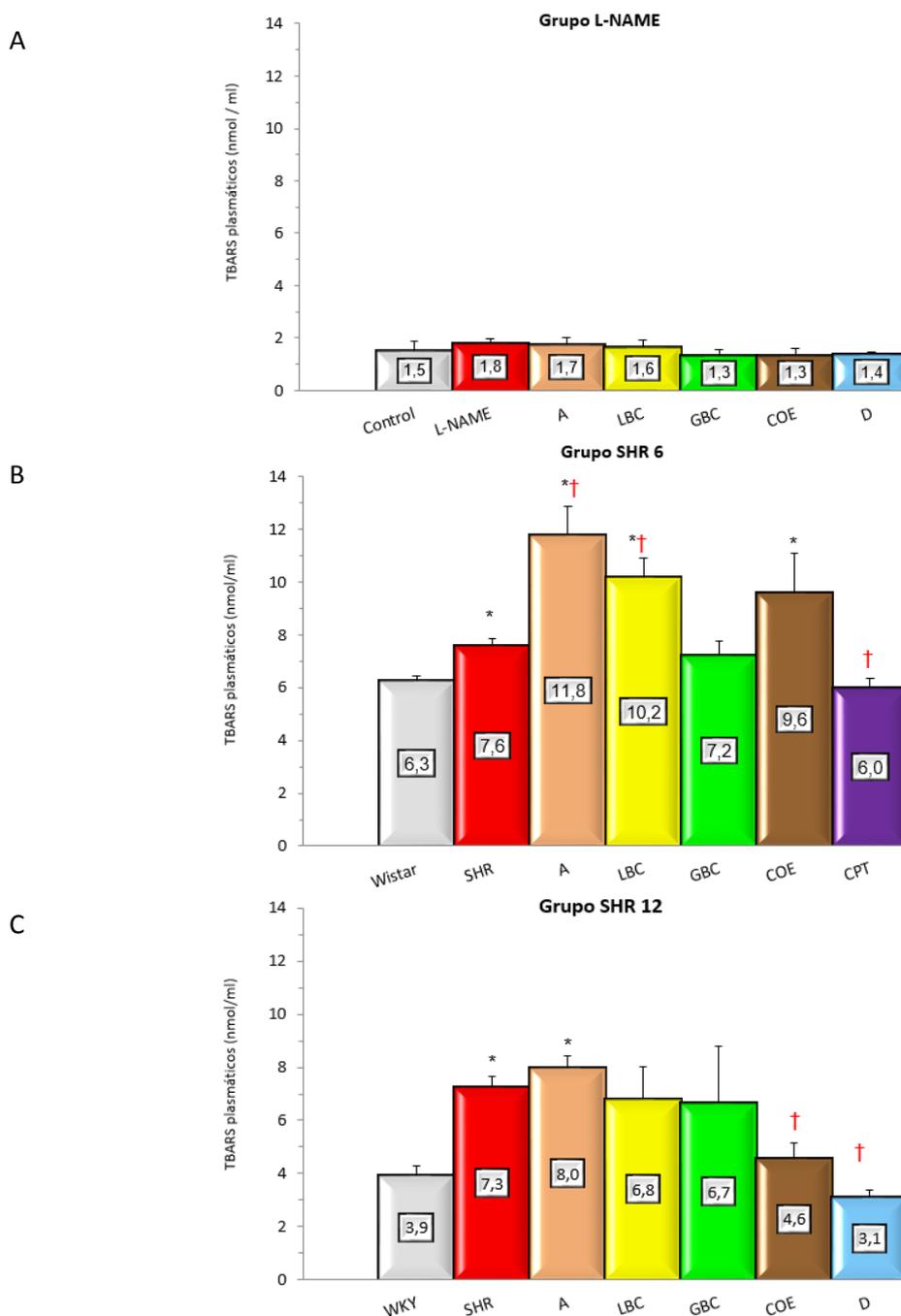


Figura 72. Niveles de TBARS plasmáticos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

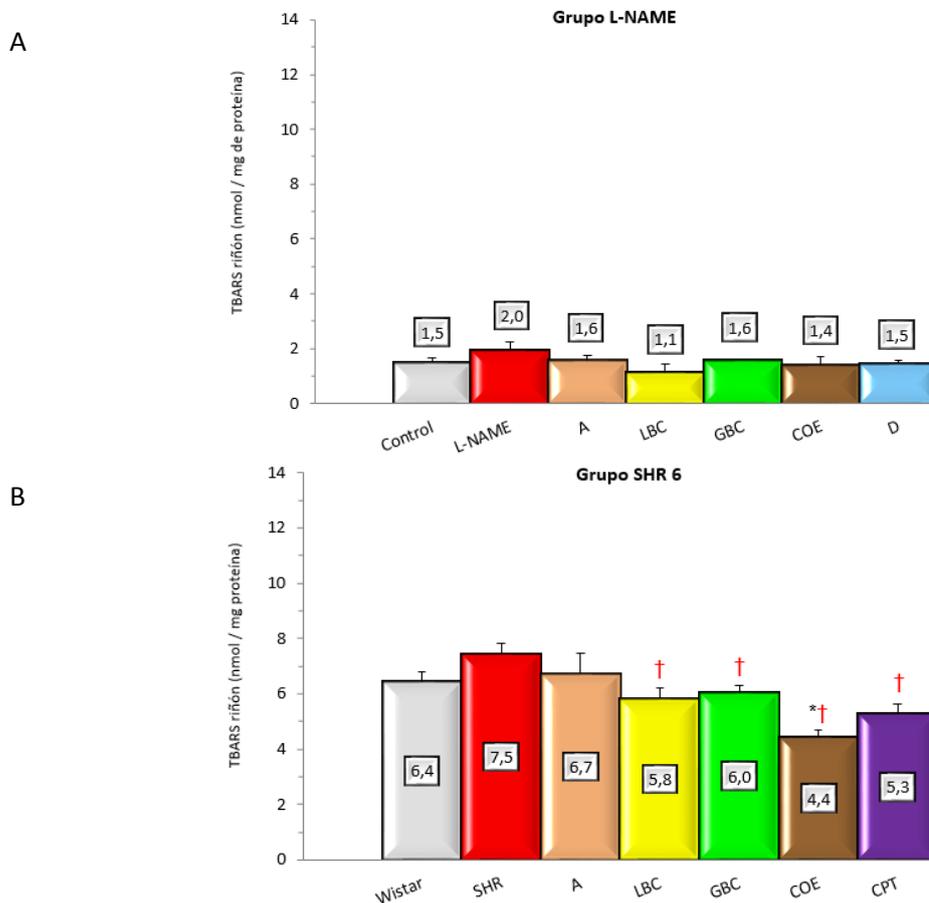
En el caso del grupo L-NAME (figura 72 A), no hay significación estadística entre grupos y muestra unos resultados de TBARS que prácticamente no se modifican con los tratamientos.

En el modelo de hipertensión SHR, los TBARS plasmáticos están elevados en los dos grupos con HTA no tratados.

En el grupo SHR de seis semanas (figura 72 B), los tratamientos no muestran ningún efecto en cuanto a la reducción del nivel de MDA, únicamente el CPT.

En las SHR de doce semanas (figura 72 C), aunque algunos tratamientos, al igual que en SHR de seis semanas, no muestran recuperación, COE y D, sí reducen los niveles de TBARS de forma significativa respecto a los valores del grupo hipertenso no tratado.

TBARS en tejido renal



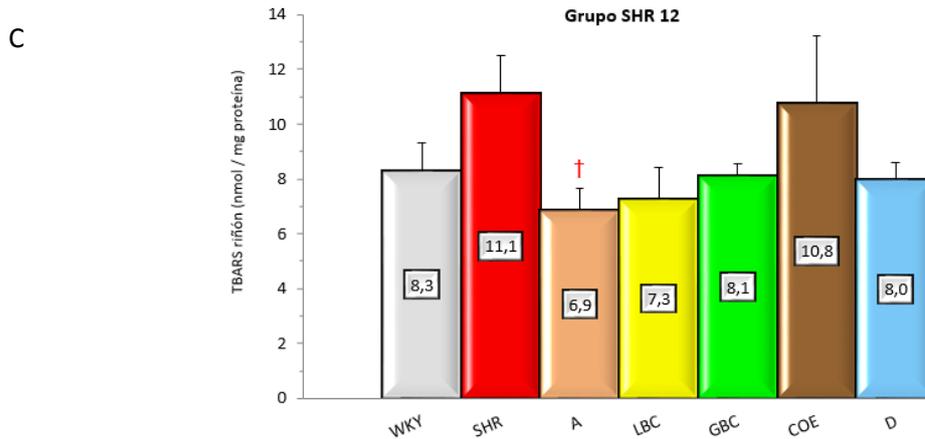


Figura 73. Niveles de TBARS en tejido renal de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

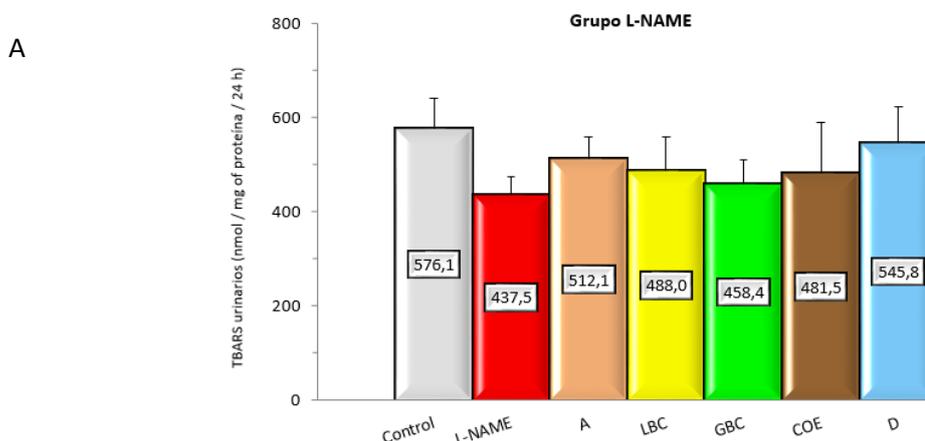
A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

En el tejido renal, los TBARS tienden a ser mayores en las ratas hipertensas SHR de seis y doce semanas y en las L-NAME sin tratar (figura 73 A), y la mayoría de los tratamientos, en general, tienden a disminuirlos. En particular, el grupo L-NAME no presenta diferencias significativas entre grupos.

En el caso de SHR de seis semanas (figura 73 B), todos los tratamientos excepto A, mostraron una disminución significativa de los niveles de MDA, incluso por debajo del existente en el grupo control sano, en el grupo tratado con COE.

Respecto a las SHR de doce semanas (figura 73 C), el comportamiento es similar al anterior aunque sólo el grupo de la A mostró significación estadística.

TBARS en orina



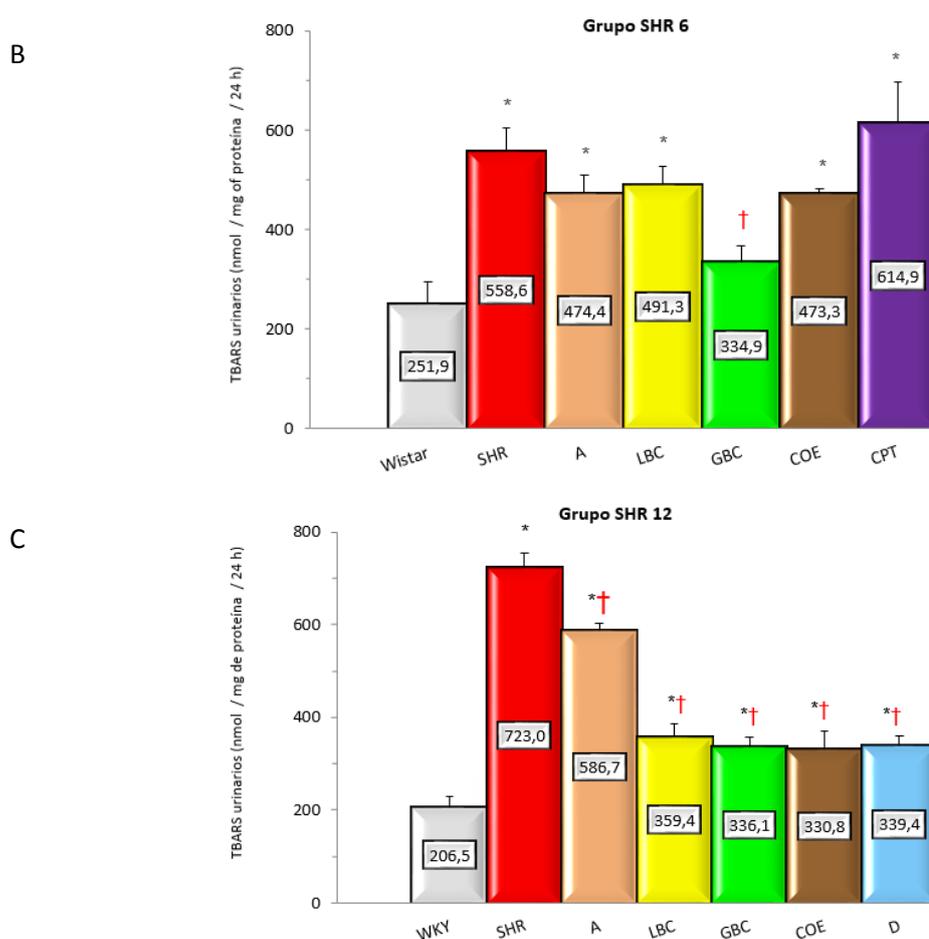


Figura 74. Niveles de TBARS urinarios en todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

Los TBARS urinarios, no se modificaron en los grupos de HTA L-NAME (figura 74 A). En cambio, aumentan considerablemente en los dos grupos de ratas SHR con HTA y sin tratamiento.

Para el grupo de seis semanas (figura 74 B), todos los tratamientos tendieron a disminuir la concentración de MDA, sobre todo el GBC. Cabe destacar que en este caso, CPT no mostró ningún efecto.

En el grupo de doce semanas (figura 74 C), todos los tratamientos disminuyeron la concentración de MDA de forma estadísticamente significativa y aunque no alcanzan el valor del grupo control sano, sí que se aproximan todos ellos de una forma similar, a excepción de la apigenina.

En la tabla siguiente se muestran los valores de TBARS plasmáticos, renales y urinarios de todos los grupos experimentales:

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Tabla 20. Valores de TBARS plasmáticos, renales y urinarios de todos los grupos experimentales.

TBARS (mmol/mg proteína)	Plasmáticos	Renales	Urinarios
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)			
Control	1,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1	576 ± 65
L-NAME	1,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3	437 ± 37
A	1,7 ± 0,3	1,6 ± 0,2	512 ± 46
LBC	1,6 ± 0,3	1,1 ± 0,3	488 ± 69
GBC	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,0	458 ± 51
COE	1,3 ± 0,2	1,4 ± 0,3	482 ± 108
D	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	546 ± 78
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)			
Wistar	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,4	252 ± 42
SHR	7,6 ± 0,3*	7,5 ± 0,4	559 ± 45 *
A	11,8 ± 1,1 *†	6,7 ± 0,8	474 ± 35 *
LBC	10,2 ± 0,7 *†	5,8 ± 0,4 †	491 ± 37 *
GBC	7,2 ± 0,5 ^{Φα}	6,0 ± 0,3 †	335 ± 34 ^{†Φα}
COE	9,6 ± 1,5 *	4,4 ± 0,3 ^{†Φαψ}	473 ± 9* ^ψ
CPT	6,0 ± 0,4 ^{†Φα‡}	5,3 ± 0,4 †	615 ± 81* ^ψ
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)			
WKY	3,9 ± 0,4	8,3 ± 1,0	207 ± 22
SHR	7,3 ± 0,4 *	11,1 ± 1,4	723 ± 32 *
A	8,0 ± 0,4*	6,9 ± 0,8 †	587 ± 17 *†
LBC	6,8 ± 1,2	7,3 ± 1,2	359 ± 27 *†Φ
GBC	6,7 ± 2,1	8,1 ± 0,4	336 ± 21 *†Φ
COE	4,6 ± 0,6 ^{†Φ}	10,8 ± 2,5	331 ± 41 *†Φ
D	3,1 ± 0,2 ^{†Φα}	8,0 ± 0,6	339 ± 20 *†Φ

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Control, Wistar, WKY; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (α) P<0.05 vs LBC; (ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE.

4.6 Nitritos y proteínas

Nitritos plasmáticos

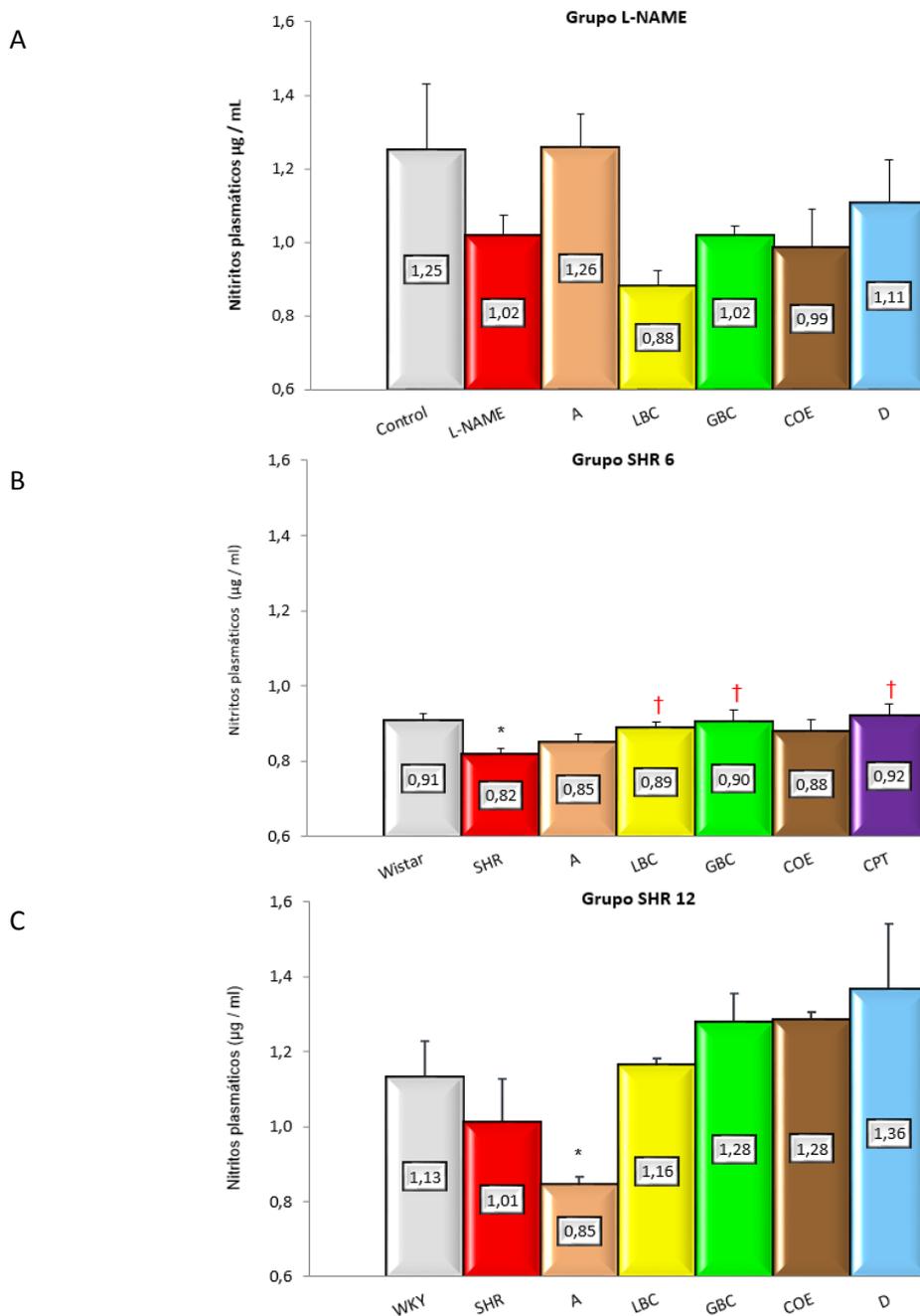


Figura 75. Niveles de nitritos plasmáticos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

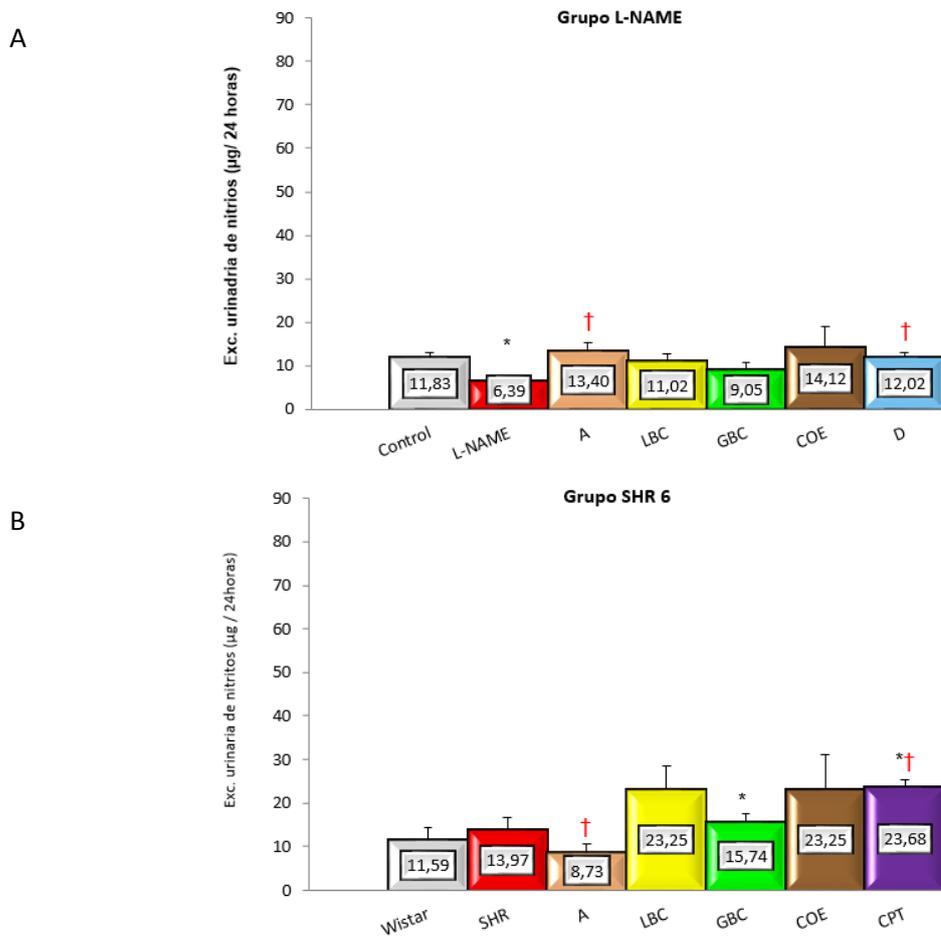
A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Los nitritos plasmáticos en las ratas con HTA sin tratamientos de los tres protocolos experimentales, en general, tendieron a ser inferiores a los controles. Este descenso sólo fue significativo para las ratas hipertensas del grupo SHR de 6 semanas.

La tendencia de los diferentes tratamientos es a aumentarlos en los tres grupos de HTA aunque, en general, dicha tendencia muestra un comportamiento muy variable, y el aumento resultó significativo únicamente en los grupos LBC, GBC y CPT del grupo SHR de 6 semanas.

Excreción Urinaria de Nitritos



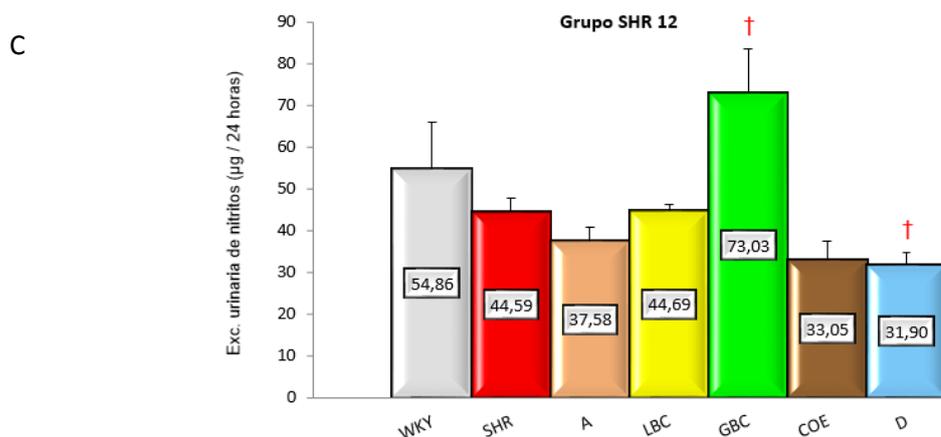


Figura 76. Excreción urinaria de nitritos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

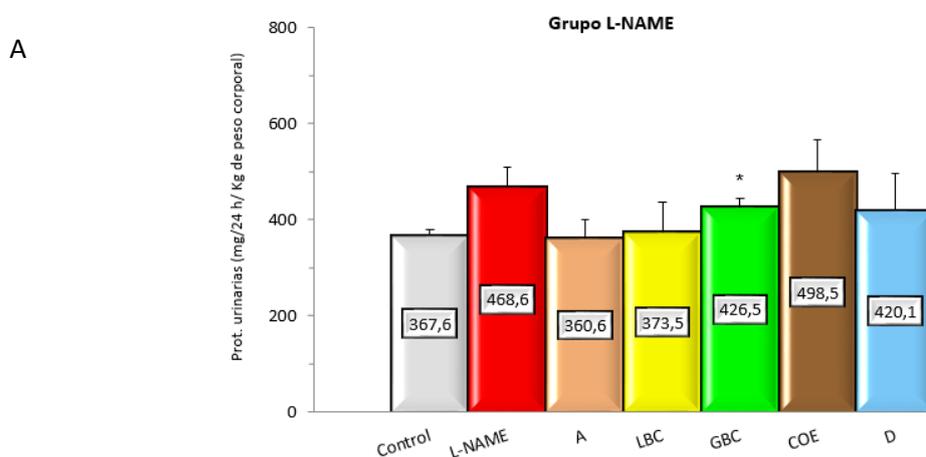
A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

Los nitritos urinarios fueron inferiores en las ratas con HTA L-NAME y similares en las SHR de seis y doce semanas sin tratamiento, respecto a sus controles. Todos los grupos L-NAME tratados (figura 76 A) tienen valores superiores al grupo hipertenso sin tratar, aunque sólo fueron significativos los de A y D.

En el grupo SHR de 6 semanas (figura 76 B), los grupos tratados excepto el tratamiento con A, tienen niveles de nitritos urinarios mayores con respecto al grupo sin tratar mostrando únicamente el fármaco control CPT significación estadística.

En cambio, en el grupo SHR de doce semanas (figura 76 C), la mayoría de los valores de los grupos tratados, son menores que el grupo SHR, incluso hubo un descenso significativo en el grupo tratado con la flavona D. Únicamente el grupo GBC, presentó un aumento significativo de la excreción urinaria de nitritos, respecto al grupo hipertenso sin tratar.

Proteínas urinarias



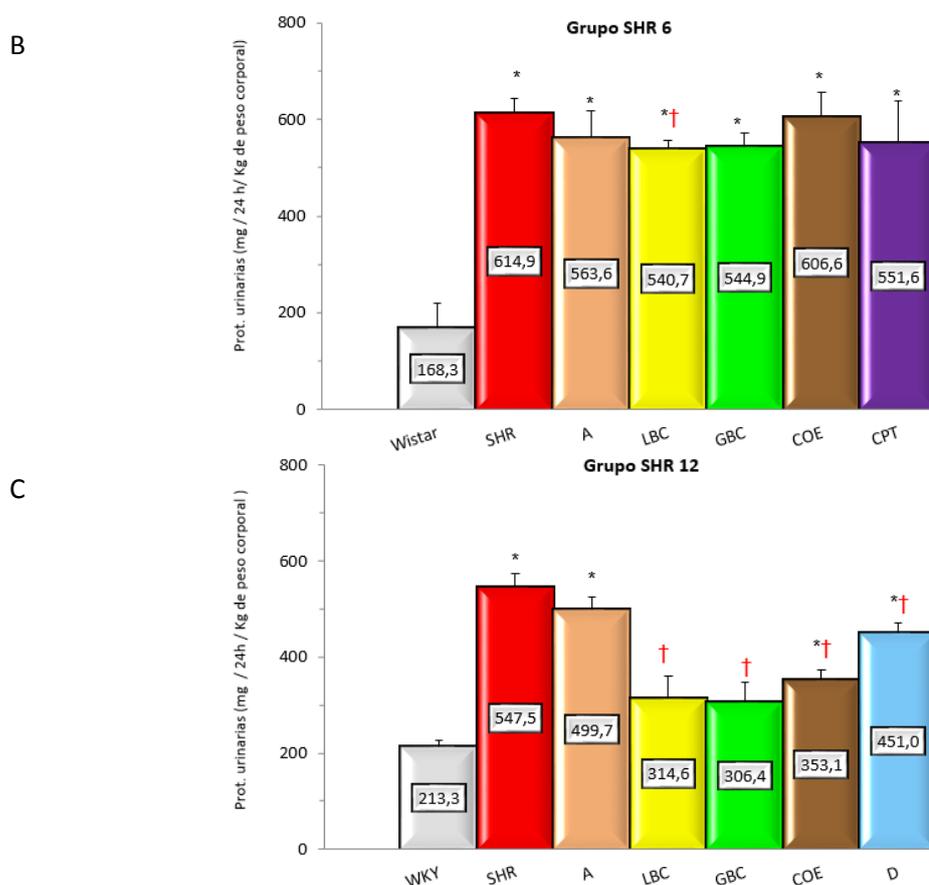


Figura 77. Niveles de proteínas urinarias de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

Las proteínas urinarias del grupo hipertenso L-NAME y SHR de seis y doce semanas no tratados, muestran valores superiores con respecto al grupo control, siendo significativos en los dos protocolos SHR.

Los grupos tratados para los dos modelos de hipertensión SHR, muestran en su mayoría valores inferiores al grupo hipertenso sin tratar, siendo en el grupo SHR de doce semanas, donde algunos tratamientos muestran los mayores descensos (recuperación de la normalidad).

Así, presentaron un descenso significativo en la excreción de proteínas urinarias los grupos tratados con LBC, seis y doce semanas, y los tratados con GCB, COE y D durante doce semanas.

En la siguiente tabla se muestran los valores de nitritos plasmáticos, excreción urinaria de nitritos y proteínas urinarias:

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Tabla 21. Valores de nitritos plasmáticos, excreción urinaria de nitritos y de proteínas urinarias de todos los grupos experimentales.

Tratamiento	Nitritos plasmáticos (µg/ml)	Excreción urinaria de nitritos (µg/ 24 h)	Proteínas urinarias (mg/24 h/ Kg de peso corporal)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)			
Control	1,25 ± 0,18	11,83 ± 1,31	367,58 ± 11,19
L-NAME	1,02 ± 0,05	6,39 ± 0,46 *	468,60 ± 39,52
A	1,26 ± 0,09	13,40 ± 1,82 †	360,64 ± 40,15
LBC	0,88 ± 0,04 Φ	11,02 ± 1,63	373,50 ± 61,90
GBC	1,02 ± 0,02 \boxtimes	9,05 ± 1,64	426,51 ± 18,81*
COE	0,99 ± 0,11	14,12 ± 4,97	498,51 ± 67,17
D	1,11 ± 0,12	12,02 ± 1,03 †	420,13 ± 75,24
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)			
Wistar	0,91 ± 0,02	11,59 ± 2,69	168,32 ± 50,37
SHR	0,82 ± 0,02 *	13,97 ± 2,76	614,88 ± 28,80 *
A	0,85 ± 0,02	8,73 ± 1,78 †	563,62 ± 53,66 *
LBC	0,89 ± 0,01 †	23,25 ± 5,34 Φ	540,72 ± 16,48 *†
GBC	0,90 ± 0,03 †	15,74 ± 1,77 * Φ	544,91 ± 26,16 *
COE	0,88 ± 0,03	23,25 ± 7,83	606,61 ± 50,70 *
CPT	0,92 ± 0,03 †	23,68 ± 1,67 *† Φ Ψ	551,57 ± 86,25 *
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)			
WKY	1,13 ± 0,09	54,86 ± 11,15	213,27 ± 13,65
SHR	1,01 ± 0,12	44,59 ± 3,27	547,52 ± 27,04 *
A	0,85 ± 0,02*	37,58 ± 3,24	499,68 ± 25,21*
LBC	1,16 ± 0,02 Φ	44,69 ± 1,65	314,64 ± 47,10 † Φ
GBC	1,28 ± 0,07 Φ	73,03 ± 10,59 † Φ	306,42 ± 40,65 † Φ
COE	1,28 ± 0,02 Φ \boxtimes	33,05 ± 4,29 Ψ	353,08 ± 20,19 *† Φ
D	1,36 ± 0,17 Φ	31,90 ± 2,82 † \boxtimes Ψ	451,01 ± 20,34 *† Φ \boxtimes Ψ ‡

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (\boxtimes) P<0.05 vs LBC; (Ψ) P<0.05 vs GBC (\ddagger) P<0.05 vs COE.

4.7 Histología

Las diferentes secciones tisulares fueron observadas al microscopio por un histopatólogo experto que realizó a ciegas la valoración semicuantitativa y cuantitativa de los diferentes parámetros:

- Corazón y grandes arterias:
 - Infartos cardiacos (0: ausencia; 1: presencia) y número de infartos cardiacos medidos en todos los cortes.
 - Arteriopatía hialina (tanto en corazón como en riñón) y necrosis fibrinoide cardiaca (0: ausencia; 1: presencia).
 - Relación luz/pared de las arterias del corazón.
 - Espesor del tabique interventricular.
 - Espesor de la aorta torácica y abdominal.
- Riñón:
 - Arteriopatía hialina renal (0: ausencia; 1: presencia).
 - Relación luz/pared de las arterias renales.
 - Presencia de cilindros tubulares (0: ausencia; 1: presencia).
- Daño vascular conjunto cardiaco y renal (0: ausencia; 1: presencia).
 - Se puntuó 1 sólo en el caso de daño en ambos, corazón y riñón. Se puntuó 0 si el daño se restringía a riñón o corazón.

A continuación se muestran algunas imágenes representativas de las alteraciones descritas previamente.

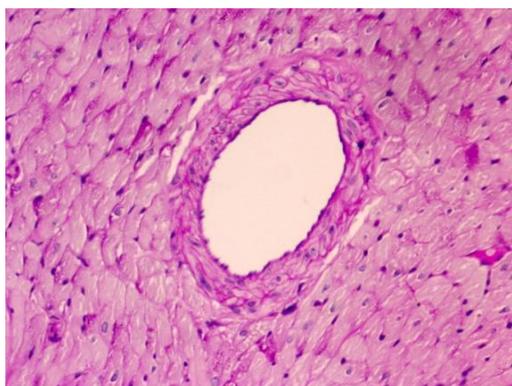


Figura 78. Arteria intramiocárdica sin alteraciones morfológicas (PAS, magnificación original 10x)

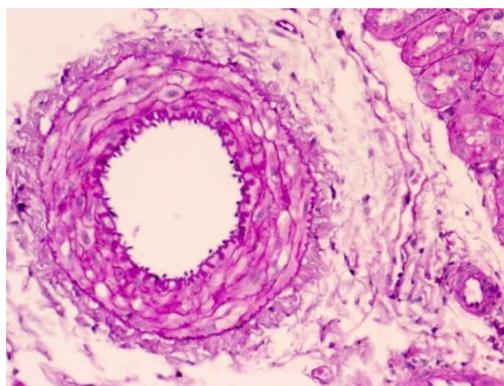


Figura 79. Arteria segmentaria del hilio renal sin alteraciones morfológicas (PAS, magnificación original x10)

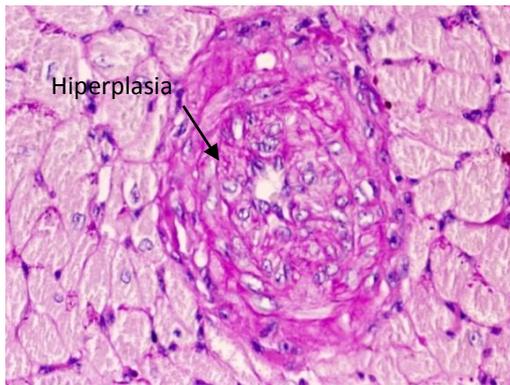


Figura 80. Hiperplasia severa de la capa media en arteria intramiocárdica de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x)



Figura 81. Arteria interlobular con hiperplasia de la capa muscular y reducción de la luz en rata DS tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x)



Figura 82. Arteriopatía hialina en vaso miocárdico de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 10x)

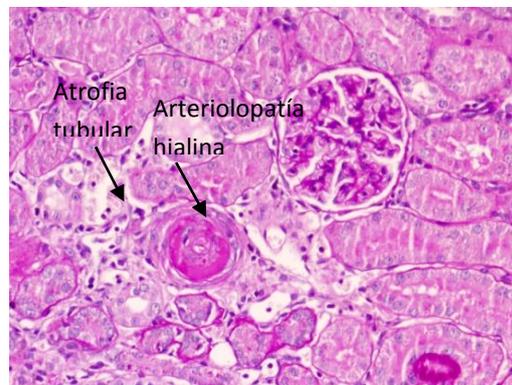


Figura 83. Arteriopatía hialina concéntrica en arteria interlobular con reducción de la luz vascular y atrofia tubular leve en rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original, 10x)

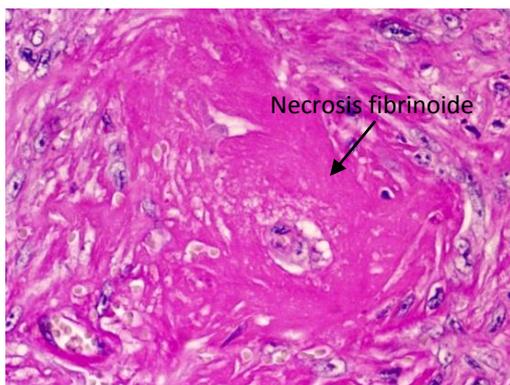


Figura 84. Intensa necrosis fibrinoide en vaso miocárdico de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x)

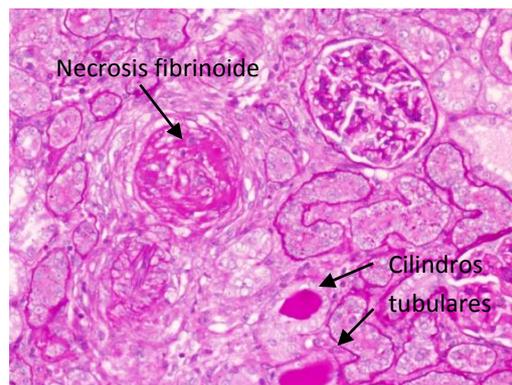


Figura 85. Necrosis fibrinoide y estenosis de la luz en arteria intertubular y cilindros tubulares de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 10x)

En la siguiente figura se muestran imágenes en las que se aprecia un daño vascular intenso con presencia de infiltrado inflamatorio y lesión en miocardiocitos en ratas SD tratadas con L-NAME (PAS a diferentes aumentos).

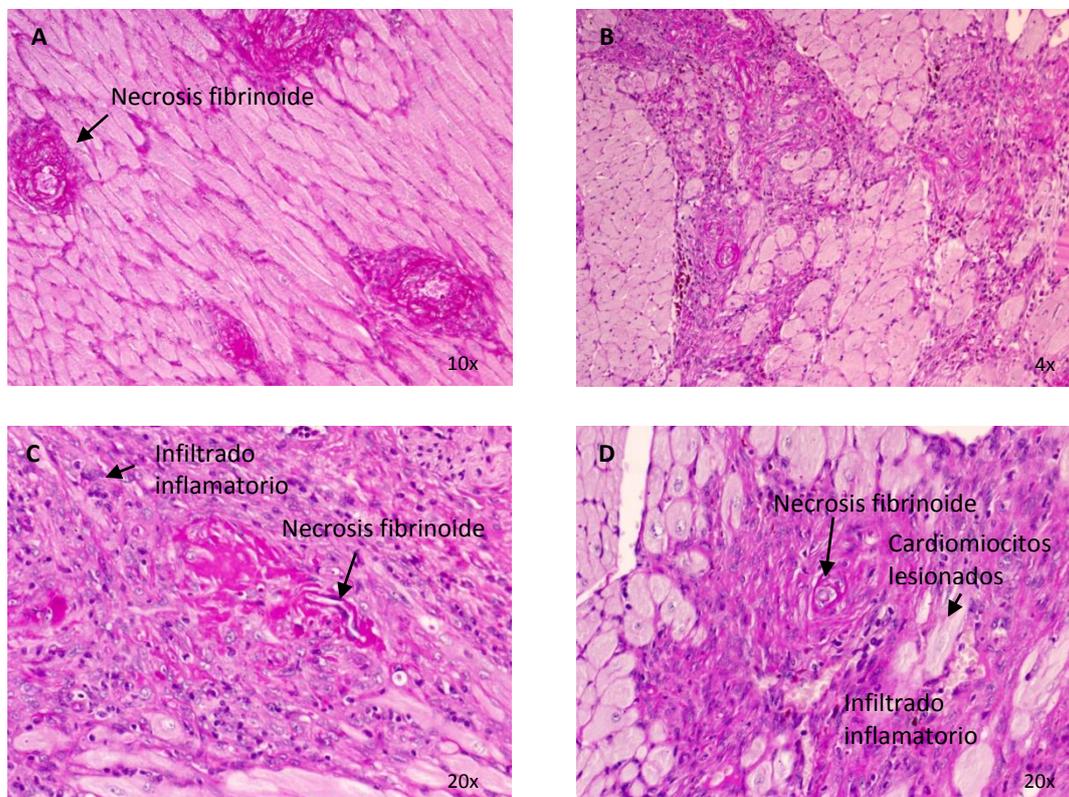


Figura 86. (A) Necrosis fibrinoide en los cuatro vasos pero sin áreas de infarto. (B), (C) y (D) Intensa necrosis fibrinoide de los diferentes vasos de las tres imágenes que producen necrosis incipiente de miocardiocitos y suscitan respuesta inflamatoria, éstas son áreas de infarto miocárdico recientes (PAS a diferentes aumentos)

4.7.1 Resultados del análisis histológico del grupo L-NAME

Según se muestra en la tabla 22, los animales con hipertensión L-NAME tendieron a presentar más infartos cardiacos y una mayor presencia de arteriopatía hialina y necrosis fibrinoide que los controles. Los diferentes tratamientos, tendieron a reducir el número de infartos, la arteriopatía hialina y la necrosis fibrinoide. Dada la gran variabilidad de la muestra, no encontramos diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a la relación luz/pared de las arterias coronarias, ocurre lo mismo que en los parámetros anteriormente descritos. Así, apreciamos un valor inferior en los animales sin tratar respecto a los controles y que la mayoría de los tratamientos mostraron una tendencia a aumentar los valores sin llegar a ser estadísticamente significativos.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Tabla 22. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón del grupo L-NAME.

Histología Cardiovascular L-NAME					
Tratamientos	Infartos	Nº de infartos	Arteriopatía Hialina	Necrosis Fibrinoide	Relación luz/pared
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Control	0,0	0,0	0,0	0,0	3,01 ± 0,58
L-NAME	0,67± 0,33	4,33± 3,84	0,67±0,33	0,67±0,33	2,22 ± 0,95
A	0,33± 0,33	0,67± 0,67	0,33±0,33	0,0	2,39 ± 0,44
LBC	0,33± 0,33	3,33±3,33	0,0	0,0	2,97 ± 0,10
GBC	0,67± 0,33	3,67±1,86	0,33±0,33	0,33±0,33	1,99 ± 0,40
COE	0,67± 0,33	2,67±1,45	0,0	0,0	2,49 ± 0,06 ‡
D	0,33± 0,33	4,00±4,00	0,33±0,33	0,33±0,33	2,74 ± 0,94

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (‡) P<0.05 vs LBC.

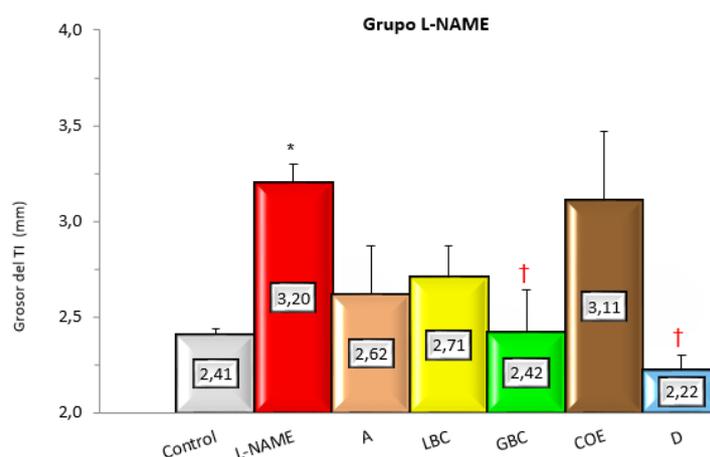


Figura 87. Grosor del tabique interventricular (TI) de los grupos experimentales con HTA-L-NAME y efecto de los distintos tratamientos.

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), D (Diosmina) y CPT (captopril). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR

El grosor del tabique interventricular, fue significativamente mayor en el grupo L-NAME sin tratar y todos los tratamientos mostraron valores inferiores, observándose únicamente un descenso estadísticamente significativo en los grupos tratados con GBC y D.

En cuanto al espesor de la pared media de la aorta torácica y abdominal, fue bastante mayor en los animales con HTA y la mayoría de los grupos tratados, excepto la A, mostraron valores inferiores con respecto al grupo sin tratar, siendo los tratamientos que contienen un grupo catecol (LBC, COE), los que presentan la mayor reducción significativa de la respuesta en el caso de la aorta torácica.

En la aorta abdominal, la mayoría de los tratamientos disminuyeron el espesor de su pared media con respecto al grupo no tratado con una reducción significativa de la respuesta excepto para el tratamiento GBC, siendo las flavonas (A, D) las que consiguen recuperar los valores normotensos.

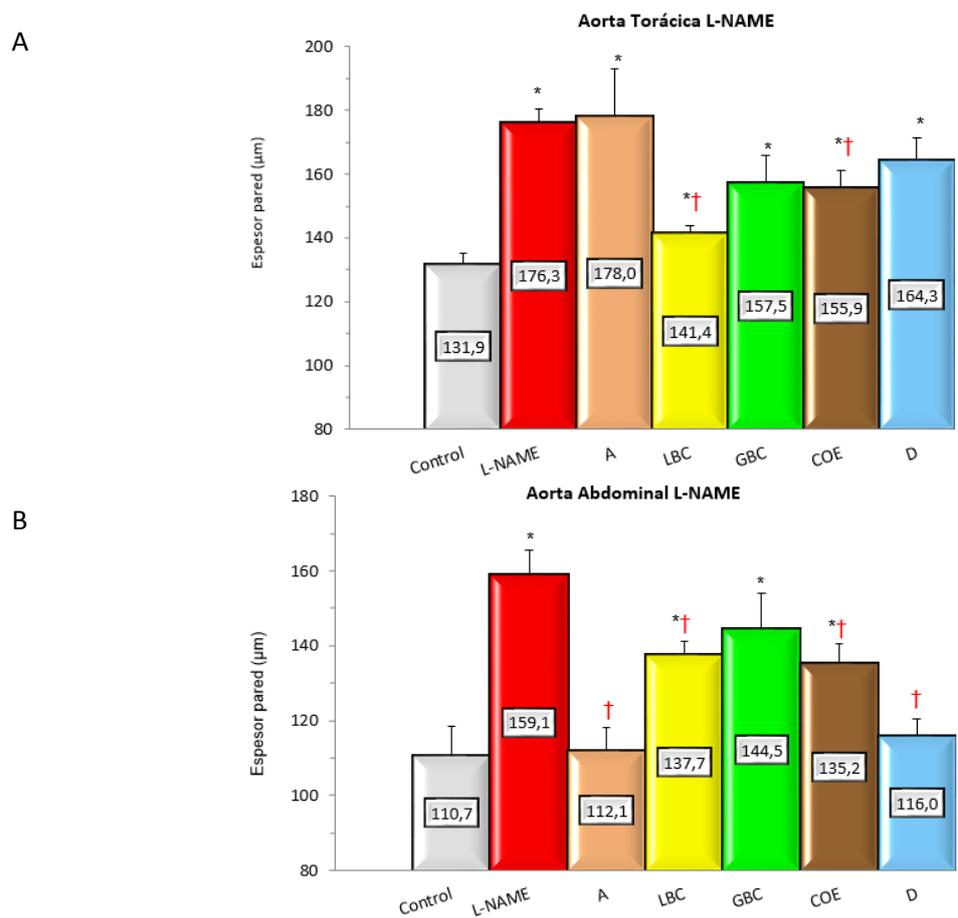


Figura 88. Espesor de la pared de la Aorta Torácica y la Abdominal de los grupos experimentales con HTA-L-NAME

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR

En la tabla siguiente se muestran los valores obtenidos de los parámetros anteriores del grupo L-NAME:

Tabla 23. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón del grupo L-NAME

Histología Cardiovascular L-NAME			
Tratamientos	Grosor del tabique interventricular (mm)	Esesor de la aorta torácica (mm)	Esesor de la aorta abdominal (mm)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)			
Control	2,41 ± 0,03	131,9 ± 3,1	110,7 ± 7,9

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Histología Cardiovascular L-NAME			
Tratamientos	Grosor del tabique interventricular (mm)	Espesor de la aorta torácica (mm)	Espesor de la aorta abdominal (mm)
L-NAME	3,20 ± 0,10*	176,3 ± 4,2*	159,1 ± 6,5*
A	2,62 ± 0,25	178,0 ± 14,8*	112,1 ± 5,9†
LBC	2,71 ± 0,16	141,4 ± 2,4*†Φ	137,7 ± 3,7 *†Φ
GBC	2,42 ± 0,22†	157,5 ± 8,5*Φ	144,5 ± 9,6 *Φ
COE	3,11 ± 0,36	155,9 ± 5,4*†	135,2 ± 5,4*†Φ
D	2,22 ± 0,08†‡	164,3 ± 7,2*	116 ± 4,4†‡Ψ‡

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (Ψ) P<0.05 vs GBC; (‡) P<0.05 vs COE

Respecto al riñón, se observa un comportamiento variable de la respuesta en la que no hallamos diferencias significativas entre grupos en ninguno de los parámetros medidos. Sólo resaltar, referente a la arteriopatía hialina, que todos los grupos tratados mostraron valores inferiores al grupo hipertenso sin tratar, observándose en el caso de la flavona A una ausencia total. Sin embargo, la presencia de cilindros tubulares fue superior en la mayoría de los grupos tratados con respecto al grupo hipertenso sin tratar.

Finalmente, si valoramos el daño vascular conjunto Cardíaco y Renal, observamos que tendió a ser mayor en el grupo hipertenso sin tratar y la mayoría de los tratamientos lo redujeron, siendo los tratamientos con A y los que contienen un grupo catecol (LBC, COE), los que mostraron un daño vascular restringido a riñón o corazón.

Tabla 24. Valores de los distintos parámetros histológicos renales del grupo L-NAME.

Histología renal y daño conjunto cardio-renal				
Tratamientos	Relación luz/pared	Arteriopatía hialina	Cilindros tabulares	Daño vascular (conjunto cardíaco y renal)
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)				
Control	1,80 ± 0,05	0,00	0,00	0,00
L-NAME	1,72 ± 0,32	0,67 ± 0,33	0,33±0,33	0,67±0,33
A	1,85 ± 0,27	0,00	0,33±0,33	0,00
LBC	1,07 ± 0,19	0,17 ± 0,17	0,50±0,29	0,00
GBC	2,97 ± 1,07	0,33 ± 0,33	0,67±0,33	0,33±0,33
COE	1,63 ± 0,45	0,33 ± 0,33	1,00±0,00	0,00
D	1,53 ± 0,09	0,33 ± 0,33	0,67±0,33	0,33±0,33

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina)

4.7.2 Resultados del análisis histológico de los grupos SHR de seis y doce semanas

En los animales con HTA (SHR), se observa, tanto para el tratamiento de seis como doce semanas, una ausencia de infartos cardiacos, arteriopatía hialina y necrosis fibrinoide tanto en el grupo sin tratar como en los tratados (ver tabla 25).

En cuando a la relación luz/pared de las arterias coronarias, se observó un descenso significativo en el grupo hipertenso de 6 semanas sin tratamiento respecto al control y que la mayoría de los tratamientos (excepto el GBC) aumentaron la relación luz/pared, siendo significativo el aumento en los grupos A y COE. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados del protocolo SHR de 12 semanas con respecto al grupo control o al grupo SHR sin tratamiento.

Tabla 25. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón de los grupos SHR de 6 y 12 semanas.

Histología Cardiovascular					
Tratamientos	Infartos	Nº de infartos	Arteriopatía Hialina	Necrosis Fibrinoide	Relación luz/pared
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Wistar	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27 ± 0,21
SHR	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59 ± 0,03*
A	0,00	0,00	0,00	0,00	2,84 ± 0,22†
LBC	0,00	0,00	0,00	0,00	1,80 ± 0,21⊕
GBC	0,00	0,00	0,00	0,00	1,48 ± 0,13*⊕
COE	0,00	0,00	0,00	0,00	2,80 ± 0,58†ψ
CPT	0,00	0,00	0,00	0,00	1,78 ± 0,19⊕
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)					
WKY	0,00	0,00	0,00	0,00	3,08 ± 0,13
SHR	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00 ± 0,80
A	0,00	0,00	0,00	0,00	1,97 ± 0,41
LBC	0,00	0,00	0,00	0,00	3,43 ± 0,28 ⊕
GBC	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20 ± 0,44
COE	0,00	0,00	0,00	0,00	3,06 ± 0,40
D	0,00	0,00	0,00	0,00	3,15 ± 0,79

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (Captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR; (⊕) P<0.05 vs A; (⊗) P<0.05 vs LBC; (ψ) P<0.05 vs GBC (‡) P<0.05 vs COE.

Por otra parte, el grosor del tabique interventricular aumentó para el grupo SHR de seis semanas, y todos los grupos tratados presentaron una tendencia a mostrar valores inferiores al grupo sin tratar, observándose un descenso significativo en el grupo tratado con CPT. En cambio, en el grupo SHR de doce semanas, los valores prácticamente no se modifican.

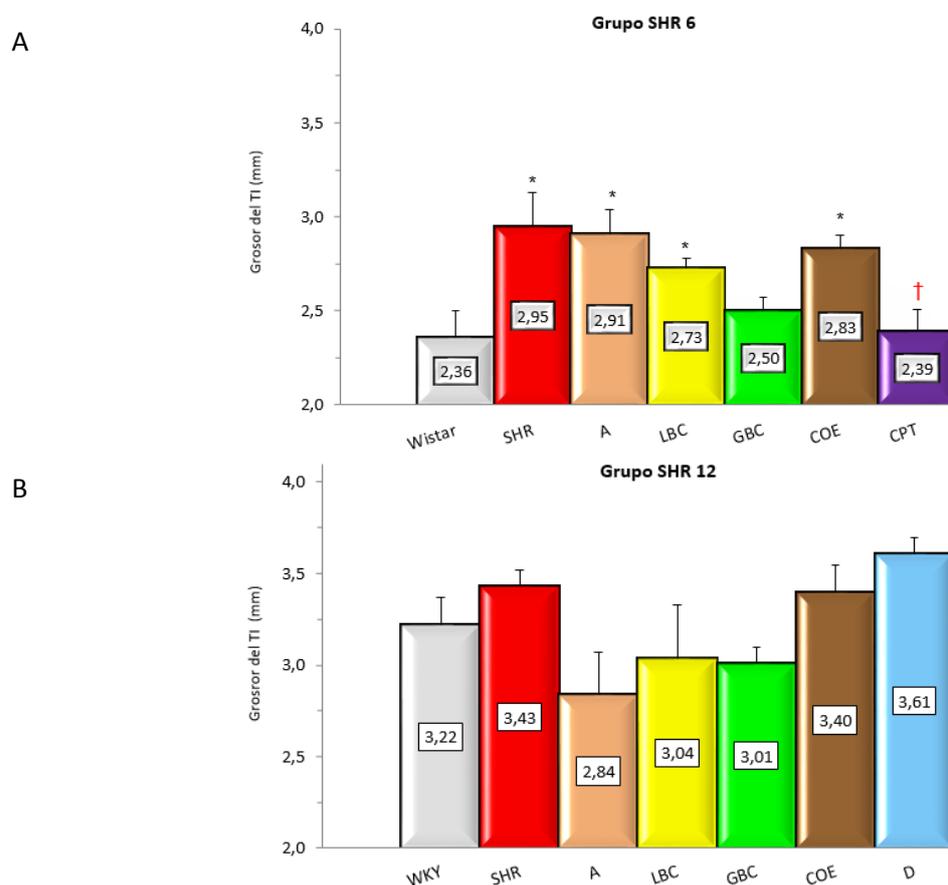


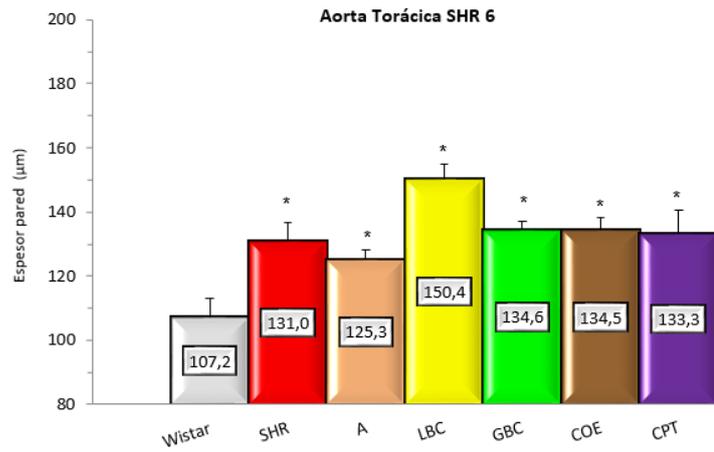
Figura 89. Grosor del tabique interventricular (TI) de los grupos experimentales con HTA (SHR). A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) $P < 0,05$ vs Wistar; (†) $P < 0,05$ vs SHR.

El espesor de la pared media de la aorta torácica y la abdominal, aumentó significativamente en el grupo SHR de seis semanas sin tratar. En el caso de la Aorta torácica, los diferentes tratamientos no lo mejoraron y los valores permanecieron significativamente elevados respecto al control. Por el contrario, todos los tratamientos mejoraron el incremento del espesor de la Aorta Abdominal en diferente proporción.

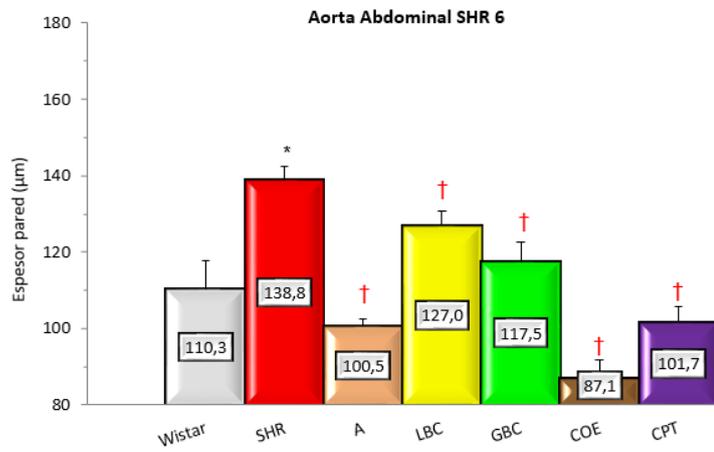
El comportamiento de este parámetro fue muy diferente en el grupo SHR de doce semanas, en el que no se observó un aumento significativo del espesor de la pared media de estas dos arterias en el grupo hipertenso sin tratar, pero sí en todos los grupos sometidos a los diferentes tratamientos, excepto la A que no afectó el espesor de la Aorta Abdominal.

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

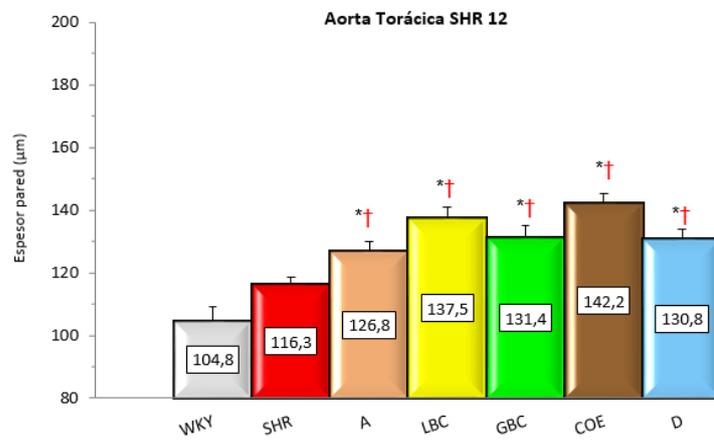
A



B



C



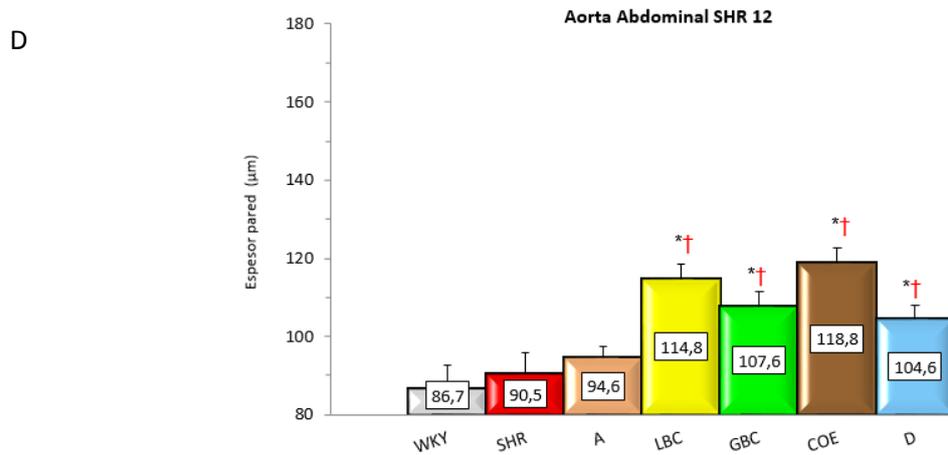


Figura 90. Espesor de la pared de la Aorta Torácica y Abdominal de los grupos experimentales con HTA (SHR).

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (*) $P < 0.05$ vs Wistar; (†) $P < 0.05$ vs SHR.

En la siguiente tabla, se muestran los valores obtenidos de los parámetros anteriores de los grupos SHR de 6 y 12 semanas:

Tabla 26. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón de los grupos SHR de 6 y 12 semanas.

Histología Cardiovascular			
Tratamientos	Grosor del tabique interventricular (mm)	Espesor de la aorta torácica (mm)	Espesor de la aorta abdominal (mm)
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)			
Wistar	2,36 ± 0,14	107,2 ± 5,9	110,3 ± 7,5
SHR	2,95 ± 0,18*	131,0 ± 5,6*	138,8 ± 3,4*
A	2,91 ± 0,13*	125,3 ± 2,9*	100,5 ± 2,1†
LBC	2,73 ± 0,05*	150,4 ± 4,5*⊕	127,0 ± 3,6†⊕
GBC	2,50 ± 0,07⊕‡	134,6 ± 2,3*⊕‡	117,5 ± 5,2†⊕
COE	2,83 ± 0,07*ψ	134,5 ± 3,8*‡	87,1 ± 4,6†⊕‡ψ
CPT	2,39 ± 0,12 †⊕‡‡	133,3 ± 7,3*	101,7 ± 4,0†‡ψ‡
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)			
WKY	3,22 ± 0,15	104,8 ± 4,4	86,7 ± 5,8
SHR	3,43 ± 0,09	116,3 ± 2,2	90,5 ± 5,3
A	2,84 ± 0,23	126,8 ± 3,2*†	94,6 ± 2,7
LBC	3,04 ± 0,29	137,5 ± 3,5*†⊕	114,8 ± 3,7*†⊕
GBC	3,01 ± 0,09	131,4 ± 3,6*†	107,6 ± 4,0*†⊕
COE	3,40 ± 0,15	142,2 ± 3,0*†⊕ψ	118,8 ± 3,7*†⊕
D	3,61 ± 0,09ψ	130,8 ± 2,9*†‡	104,6 ± 3,3*†⊕‡

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao), CPT (captopril) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR; (⊕) P<0.05 vs A; (‡) P<0.05 vs LBC; (ψ) P<0.05 vs GBC (‡) P<0.05 vs COE.

Respecto al riñón, en la relación luz/pared renal para el tratamiento de seis semanas, la mayoría de los grupos presentaron valores superiores al grupo sin tratar, siendo este aumento significativo en el caso de los tratamientos con LBC y GBC. Por otro lado, se observa una ausencia de arteriopatía hialina y cilindros tubulares en todos los grupos experimentales excepto en la A.

Para el tratamiento de doce semanas, no se observaron diferencias significativas en la relación luz/pared entre los diferentes grupos tratados y el grupo control o el SHR sin tratamiento. A pesar de esto, observamos que todos los grupos tratados mejoraron esta relación ya que presentaron valores superiores al grupo hipertenso sin tratar. Por otro lado, y de forma similar al grupo SHR de 6 semanas, apenas se percibió daño estructural renal, en el que la presencia de arteriopatía hialina y cilindros tubulares fueron escasos, limitándose a los grupos SHR, A y COE.

Finalmente, observamos, que según nuestra valoración, las ratas SHR a las edades estudiadas, no presentaron un daño vascular conjunto Cardíaco y Renal que sí estuvo presente en los grupos tratados con L-NAME.

Tabla 27. Valores de los distintos parámetros histológicos renales del grupo SHR.

Histología renal y daño conjunto cardio-renal				
Tratamientos	Relación luz/pared	Arteriopatía hialina	Cilindros tabulares	Daño vascular (conjunto cardíaco y renal)
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)				
Wistar	1,69 ± 0,10	0,00	0,00	0,00
SHR	1,18 ± 0,08*	0,00	0,00	0,00
A	1,32 ± 0,31	0,00	0,25	0,00
LBC	1,51 ± 0,04†	0,00	0,00	0,00
GBC	1,69 ± 0,10†	0,00	0,00	0,00
COE	1,10 ± 0,24 Ψ	0,00	0,00	0,00
CPT	1,26 ± 0,10*Ψ	0,00	0,00	0,00
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)				
WKY	1,76 ± 0,19	0,00	0,00	0,00
SHR	1,27 ± 0,26	0,25±0,25	0,25±0,25	0,00
A	1,61 ± 0,30	0,00	0,75±0,25	0,00
LBC	1,67 ± 0,44	0,00	0,00	0,00
GBC	1,79 ± 0,32	0,00	0,00	0,00
COE	1,39 ± 0,11	0,00	0,25±0,25	0,00
D	1,43 ± 0,20	0,00	0,00	0,00

A (Apigenina), LCB (extracto de limón), GBC (extracto de pomelo + naranja amarga), COE (extracto de cacao) y D (Diosmina). (*) P<0.05 vs Wistar; (†) P<0.05 vs SHR; (Φ) P<0.05 vs A; (⊖) P<0.05 vs LBC; (Ψ) P<0.05 vs GBC (‡) P<0.05 vs COE.

4.8 Cálculo de los factores empleados

Para hacernos una idea del grado de mejoría que produce la aplicación de los tratamientos de los extractos de flavonoides utilizados, se han hecho unas tablas que contienen dos factores o índices.

El cálculo de estos factores, se realizó de la siguiente manera:

- % Recuperación =

$$\frac{[\text{Grupo hipertenso no tratado} - (\text{Grupo hipertenso} + \text{Tratamiento})]}{[\text{Grupo hipertenso no tratado} - \text{Grupo control}]}$$
- % Recuperación / mg activo =

$$[\% \text{ Recuperación} / (\text{mg/activo/día})]$$

El **% recuperación** que hace referencia al efecto que tiene el flavonoide en la dosis empleada para mitigar o reducir los efectos negativos en los animales enfermos.

Debido a que este valor, netamente experimental, no recoge el efecto comparativo entre los flavonoides a una misma dosis teórica, incluimos un segundo índice expresado como: **% de recuperación/ mg activo**.

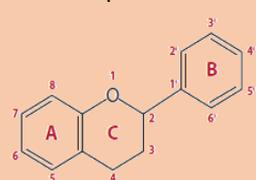
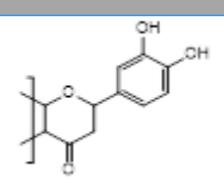
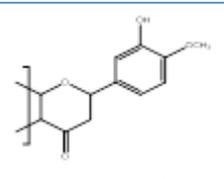
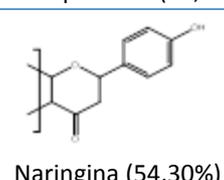
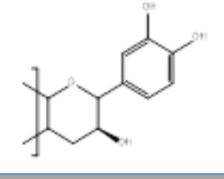
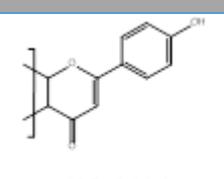
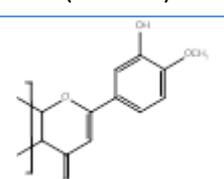
Para efectuar una comparación de la relación estructura-actividad, nos centraremos en la evaluación del segundo de los índices (% de recuperación/ mg activo) que es el que nos permite una correcta comparativa equimolecular, sin el sesgo cuantitativo que supone, obviamente, las diferentes dosis empleadas.

Por último, se va a calcular el únicamente el % de recuperación para el compuesto de referencia Captopril para poder comparar la recuperación de los flavonoides respecto de un fármaco usado habitualmente. No usaremos el segundo de los índices (% de recuperación/ mg activo) debido a que su dosis (100 mg/activo/ día) no es estructuralmente comparable con las del resto.

Teniendo en cuenta el cálculo de estos índices, podemos resumir que cuanto más positivo es el valor, la recuperación o el efecto beneficioso es mayor y viceversa, cuanto menor o más negativo es el valor, menor es la recuperación.

Las dosis teóricas (expresadas en mg /activo/ día) así como las principales características estructurales de los distintos extractos de flavonoides usados, se muestran a continuación en la siguiente tabla:

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Dosis teóricas y características estructurales de los flavonoides utilizados			
Flavonoides/ (mg/activos/día)	Estructura química y componentes	Tipo de estructura glicosídica	Principales características estructurales
			
Extractos vegetales ricos en flavonoides			
LBC / (1,00)	 Eriocitrina (35%)	Flavanona glicosilada	Anillo B con grupo catecol (3', 4'-dihidroxi)
GBC / (6,00)	 Neohesperidina (10,90%)	Flavona glicosilada	-Neohesperidina: Anillo B 3'-OH-4'-OMe
	 Naringina (54,30%)		-Naringina: Anillo B-4'-OH
COE / (0,75)		Flavan-3-ol aglicón	-Anillo B con grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) -Grupo OH en C3
Flavonoides de alta pureza			
A / (1,40)	 (92-94%)	Flavona aglicón	-Anillo B-4'-OH-Doble enlace entre los carbonos C2 y C3
D / (6,80)		Flavona glicosilada	-Anillo B 3'-OH-4'-OMe -Doble enlace entre los carbonos C2 y C3

PAM

Cálculo de índices para la PAM					
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	46,3	67,8	81,3	38,4	54
% Recuperación/mg activo	33	67,8	13,5	51,2	7,9
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	CPT
% Recuperación	22,4	19	50,8	17,8	74,1
% Recuperación/mg activo	16	19	8,4	23,7	----

Conclusión estructural para PAM a igualdad de activos	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
LBC (Flavanona) >> COE (Flavan-3-ol) > A (Flavona) >> GBC (Flavanona) >> D	
3',4'-dihidroxi >> 3'-4'-dihidroxi-3-OH > 4'-OH y C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.) y 4'-OH (Naring.) >> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
COE (Flavan-3-ol) > LBC (Flavanona) > A (Flavona) >> GBC (Flavanona)	
3', 4'-dihidroxi; 3-OH > 3',4'-dihidroxi > 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	

PAS

El estudio de este parámetro sólo se realiza para el modelo de hipertensión SHR.

Cálculo de índices para la PAS					
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	CPT
% Recuperación	25,1	23,8	22,8	-12,5	95,0
% Recuperación/mg activo	17,9	23,8	3,8	-16,6	----
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	23,6	11,1	31,7	27,8	22

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Cálculo de índices para la PAS					
% Recuperación/mg activo	16,8	11,1	5,28	37	3,2

Conclusión estructural para PAS a igualdad de activos	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
LBC (Flavanona) > A (Flavona) > GBC (Flavanona) >> COE (Flavan-3-ol)	
3',4'-dihidroxi > 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) >> 3'-4'-dihidroxi-3-OH	
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
COE (Flavan-3-ol) >> A (Flavona) > LBC (Flavanona) > GBC (Flavanona) > D	
3', 4'-dihidroxi; 3-OH >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3',4'-dihidroxi > 3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃	

Máxima contracción a FE

Cálculo de índices para la máxima contracción a FE					
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	-129,4	223,5	211,7	264,7	311,7
% Recuperación/mg activo	-92,4	223,5	35,2	352,9	45,8

Conclusión estructural para la máxima contracción a FE a igualdad de activos	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
Compuestos	COE (Flavan-3-ol) > LBC (Flavanona)
Elementos estructurales	3', 4'-dihidroxi-3-OH > 3', 4'-dihidroxi-4 C=O

Máxima relajación a acetilcolina endotelio-dependiente

Cálculo de índices para la máxima relajación a ACh					
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	CPT
% Recuperación	46,3	23,2	35	7,6	126
% Recuperación/mg activo	33,1	23,2	5,8	10,1	----
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)					

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Cálculo de índices para la máxima relajación a ACh					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	43	5,6	24,7	19,6	-5,9
% Recuperación/mg activo	30,7	5,6	4,11	26,1	-0,8

Conclusión estructural para la máxima relajación a ACh	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
A (Flavona) >> LBC (Flavanona) >> COE (Flavan-3-ol) > GBC (Flavanona)	
4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3', 4'-dihidroxi >> 3',4'-dihidroxi-3-OH > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
A (Flavona) > COE (Flavan-3-ol) >> LBC (Flavanona) > GBC (Flavanona) > D	
4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3', 4'-dihidroxi-3-OH >> 3', 4'-dihidroxi > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃	

Vasodilatación inhibida por L-NAME

Cálculo de índices para la máxima relajación inhibida por L-NAME					
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	61	5,2	13,6	39,8	3,0
% Recuperación/mg activo	43,5	5,2	2,26	53	0,4

Conclusión estructural para la vasodilatación inhibida por L-NAME a igualdad de activos	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
COE (Flavan-3-ol) > A (Flavona) >> LBC (Flavanona) > GBC (Flavanona) >> D	
3'-4'-dihidroxi-3-OH > 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3',4'-dihidroxi > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) >> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃	

Relajación independiente de endotelio inducida por nitroprusiato de sodio

Cálculo de índices para la máxima relajación a NPS					
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	66,4	20	-51,3	8,1	19,4
% Recuperación/mg activo	47,5	20	-8,5	10,9	2,8
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	CPT
% Recuperación	50,1	50,6	57,5	61,9	110,3
% Recuperación/mg activo	35,8	50,6	9,6	82,5	----
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)					
Tratamientos	A	LBC	GBC	COE	D
% Recuperación	53,3	20,4	54,5	44,5	50,4
% Recuperación/mg activo	38,1	20,4	9,1	59,3	7,4

Conclusión estructural para la máxima relajación a nitroprusiato a igualdad de activos	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
A (Flavona) >> LBC (Flavanona) > COE (Flavan-3-ol) > D (Flavona) >> GBC (Flavanona)	
4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3',4'-dihidroxi > 3'-4'-dihidroxi-3-OH > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
COE (Flavan-3-ol) >> LBC (Flavanona) >> A (Flavona) >> GBC (Flavanona)	
3',4'-dihidroxi-3-OH >> 3',4'-dihidroxi >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
COE (Flavan-3-ol) >> A (Flavona) > LBC (Flavanona) > GBC (Flavanona) ≥ D (Flavona)	
3'-4'-dihidroxi-3-OH >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3',4'-dihidroxi > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) ≥ 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃	

TBARS plasmáticos, renales y urinarios

Cálculo de índices para los TBARS						
Tratamientos	A (1,4)	LBC (1,00)	GBC (6,00)	COE (0,75)	D (6,80)	CPT
TBARS plasmáticos						
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	-323,0	-200	30,7	-153,8	---	123,07
% Recuperación/mg activo	-230,7	-200	5,12	-205,1	---	---
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)						
% Recuperación	-20,5	14,7	17,6	79,4	123,5	---
% Recuperación/mg activo	-14,7	14,7	2,9	105,8	18,1	---
TBARS renales						
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	72,7	154,5	136,3	281,8	---	200
% Recuperación/mg activo	51,9	154,5	22,7	375,7	---	---
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)						
% Recuperación	150	135,7	107,1	10,7	110,7	---
% Recuperación/mg activo	107,1	135,7	17,8	14,2	16,2	---
TBARS urinarios						
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	27,6	22,1	72,9	28,0	---	-18,2
% Recuperación/mg activo	19,7	22,1	12,1	37,3	---	---
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)						
% Recuperación	26,3	70,5	75,0	75,9	74,4	---
% Recuperación/mg activo	18,8	70,5	12,5	101,3	10,9	---

Conclusión estructural para los TBARS a igualdad de activos	
TBARS plasmáticos	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
GBC (Flavanona, 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.))	
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
COE (Flavan-3-ol) >> D (Flavona) > LBC (Flavanona) >> GBC (Flavanona) >> A (Flavona)	

Conclusión estructural para los TBARS a igualdad de activos	
	3'-4'-dihidroxi-3-OH >> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ > 3',4'-dihidroxi >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) >> 4'-OH; C ₂ =C ₃
TBARS renales	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
	COE (Flavan-3-ol) >> LBC (Flavanona) >> A (Flavona) > GBC (Flavanona)
	3',4'-dihidroxi-3-OH >> 3', 4'-dihidroxi >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
	LBC (Flavanona) >> A (Flavona) >> GBC (Flavanona) ≥ D (Flavona) > COE (Flavan-3-ol)
	3',4'-dihidroxi >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) ≥ 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ > 3',4'-dihidroxi-3-OH
TBARS urinarios	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
	COE (Flavan-3-ol) > LBC (Flavanona) > A (Flavona) > GBC (Flavanona)
	3',4'-dihidroxi-3-OH > 3', 4'-dihidroxi > 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)	
	COE (Flavan-3-ol) >> LBC (Flavanona) >> A (Flavona) > GBC (Flavanona) > D (Flavona)
	3'-4'-dihidroxi-3-OH > 3',4'-dihidroxi >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃

Nitritos plasmáticos y urinarios

Cálculo de índices para los Nitritos						
Tratamientos	A (1,4)	LBC (1,00)	GBC (6,00)	COE (0,75)	D (6,80)	CPT
Nitritos plasmáticos						
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	33,3	77,7	88,8	66,6	----	111,1
% Recuperación/mg activo	23,8	77,7	14,8	88,8	----	---
Nitritos urinarios						
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)						
% Recuperación	128,8	85,1	48,8	142,1	103,5	---
% Recuperación/mg activo	92,0	85,1	8,14	189,4	15,2	---
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)						
% Recuperación	-68,2	0,97	276,9	-112,3	-123,5	---
% Recuperación/mg activo	-48,7	0,97	46,1	-149,7	-18,1	---

Conclusión estructural para los nitritos
Nitritos plasmáticos
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)
COE (Flavan-3-ol) > LBC (Flavanona) >> A (Flavona) > GBC (Flavanona)
3', 4'-dihidroxi; 3-OH > 3',4'-dihidroxi >> 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)
Nitritos urinarios
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)
COE (Flavan-3-ol) >>> A (Flavona) > LBC (Flavanona) >>> D (Flavona) > GBC (Flavanona)
3', 4'-dihidroxi-3-OH >>> 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3',4'-dihidroxi >>> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ > 3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)
GBC (Flavanona) >>>> LBC >>> D (Flavona) >>> A (Flavona) >>>> COE (Flavan-3-ol)
3'-OH- 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) >>>> 3',4'-dihidroxi >>> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ >>> 4'-OH; C ₂ =C ₃ >>>> 3', 4'-dihidroxi-3-OH

Proteínas

Cálculo de índices para las proteínas urinarias						
Tratamientos	A (1,4)	LBC (1,00)	GBC (6,00)	COE (0,75)	D (6,80)	CPT
Proteínas urinarias						
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	11,4	16,6	15,6	1,8	---	14,1
% Recuperación/mg activo	8,2	16,6	2,6	2,4	---	---
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)						
% Recuperación	14,3	69,6	72,1	58,1	28,8	---
% Recuperación/mg activo	10,2	69,6	12,0	77,5	4,2	---

Conclusión estructural para los nitritos
Proteínas urinarias
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)
LBC (Flavanona) > A (Flavona) > GBC (Flavanona) ≈ COE (Flavan-3-ol)
3',4'-dihidroxi > 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) ≈ 3', 4'-dihidroxi-3-OH
Grupo SHR de doce semanas de tratamiento (n=44)
COE (Flavan-3-ol) > LBC (flavanona) >> GBC (Flavanona) ≥ A (Flavona) > D (Flavona)
3', 4'-dihidroxi; 3-OH > 3',4'-dihidroxi >> 3'-OH- 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) ≥ 4'-OH; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃

Grosor del tabique interventricular, aortas torácica y abdominal

Cálculo de índices para los parámetros histológicos						
Tratamientos	A (1,4)	LBC (1,00)	GBC (6,00)	COE (0,75)	D (6,80)	CPT
Grosor del tabique interventricular						
Grupo L-NAME de tratamiento (n=38)						
% Recuperación	73,4	62,0	98,7	11,4	124,0	---
% Recuperación/mg activo	52,4	62,0	16,4	15,1	18,2	---
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	6,7	37,2	76,2	20,3	---	94,9
% Recuperación/mg activo	4,8	37,2	12,7	27,1	---	---
Espesor de la pared media de la aorta torácica						
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)						

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Cálculo de índices para los parámetros histológicos						
% Recuperación	-3,8	78,6	42,3	45,9	27,0	---
% Recuperación/mg activo	-2,73	78,6	7,0	61,2	3,9	---
Espesor de la pared media de la aorta abdominal						
Grupo L-NAME de tratamiento (n=38)						
% Recuperación	97,1	44,2	30,1	49,3	89,0	---
% Recuperación/mg activo	69,3	44,2	5,0	65,8	13,0	---
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)						
% Recuperación	134,3	41,4	74,7	181,4	---	130,1
% Recuperación/mg activo	95,9	41,4	12,4	241,8	---	---

Conclusión estructural para los parámetros histológicos	
Grosor del tabique interventricular	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
LBC (Flavanona) > A (Flavona) >> D (Flavona) > GBC (Flavanona) > COE (Flavan-3-ol)	
3',4'-dihidroxi > 4'-OH y C ₂ =C ₃ >> 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ > 3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 3', 4'-dihidroxi-3-OH	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
LBC (Flavanona) > COE (Flavan-3-ol) > GBC (Flavanona) > A (Flavona)	
3',4'-dihidroxi > 3', 4'-dihidroxi-3-OH > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 4'-OH; C ₂ =C ₃	
Espesor de la pared media de la aorta torácica	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
LBC (Flavanona) >> COE (Flavan-3-ol) >> GBC (Flavanona) > D (Flavona) >> A (Flavona)	
3',4'-dihidroxi >> 3', 4'-dihidroxi-3-OH >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ >> 4'-OH; C ₂ =C ₃	
Espesor de la pared media de la aorta abdominal	
Grupo L-NAME de seis semanas de tratamiento (n=38)	
A (Flavona) ≥ COE (Flavan-3-ol) > LBC (Flavanona) >> D (Flavona) > GBC (Flavanona)	
4'-OH; C ₂ =C ₃ ≥ 3', 4'-dihidroxi-3-OH > 3',4'-dihidroxi > 3'-OH-4'-OMe; C ₂ =C ₃ > 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	
Grupo SHR de seis semanas de tratamiento (n=62)	
COE (Flavan-3-ol) >>> A (Flavona) >> LBC (Flavanona) >> GBC (Flavanona)	
3', 4'-dihidroxi-3-OH >>> 4'-OH; C ₂ =C ₃ >> 3',4'-dihidroxi >> 3'-OH-4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.)	

4.9 Eficacia global de los parámetros estudiados

Se realizan los cálculos globales de cada uno de los parámetros asignando el 100% a la mayor eficacia obtenida de un determinado tratamiento en el estudio de cada uno de ellos y calculando el resto de tratamientos en base a este 100%. Los resultados se muestran en la siguiente tabla en base a los dos índices calculados:

Eficacia grupo L-NAME según % de recuperación

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo L-NAME					
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación				
PAM	GBC (100%)	LBC (83,4%)	D (66,4%)	A (56,9%)	COE (47,2%)
Contracción FE	D (100%)*	COE (84,9%)	LBC (71,7%)	---	GBC (67,9%)
Relajación L-NAME	A (100%)	COE (65,2%)	GBC (22,3%)	LBC (8,5%)	D (4,9%)
Relajación NPS	A (100%)	LBC (30,1%)	D (29,2%)	COE (12,2%)	----
Nitritos urinarios	COE (100%)*	A (90,6%)	D (72,8%)	LBC (59,8%)	GBC (34,3%)
Grosor tabique interventricular	D (100%)	GBC (79,6%)	A (59,2%)	LBC (50%)	COE (9,1%)
Espesor de la aorta torácica	LBC (100%)	COE (58,3%)	GBC (53,8%)	D (34,3%)	----
Espesor de la aorta abdominal	A (100%)	D (91,6%)	COE (50,7%)	LBC (45,5%)	GBC (31,0%)

* Valores estadísticamente no significativos

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

Eficacia grupo L-NAME según % de recuperación/ mg activo

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo L-NAME					
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación/mg activo				
PAM	LBC (100%)	COE (75,5%)	A (48,6%)	GBC (19,9%)	D (11,6%)
Contracción FE	COE (100%)	LBC (63,3%)	D (12,9%)	GBC (9,9%)	---
Relajación L-NAME	COE (100%)	A (82,0 %)	LBC (9,8%)	GBC (4,2%)	D (0,7%)
Relajación NPS	A (100%)	LBC (42,1%)	COE (22,9%)	D (5,8%)	---
Nitritos urinarios	COE (100%)*	A (48,5%)	LBC (44,9%)	D (8,0%)	GBC (4,2%)
Grosor tabique interventricular	LBC (100%)*	A (84,5%)	D (29,3%)	GBC (26,4%)	COE (24,3%)
Espesor de la aorta torácica	LBC (100%)	COE (77,8%)	GBC (8,9%)	D (4,9%)	---
Espesor de la aorta abdominal	A (100%)	COE (94,9%)	LBC (63,7%)	D (18,7%)	GBC (7,2%)

* Valores estadísticamente no significativos

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

Eficacia grupo SHR de seis semanas según % de recuperación

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo SHR de 6 semanas					
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación				
PAM	CPT (100%)	GBC (68,5%)	A (30,2%)	LBC (25,6%)	COE (24,0%)
PAS	CPT (100%)	A (26,4%)	LBC (25,0%)	GBC (24,0%)	----
Relajación a ACh	CPT (100%)	A (36,7%)	GBC (27,7%)	LBC (18,4%)	COE (6,0%)
Relajación NPS	CPT (100%)	COE (56,1%)	GBC (52,1%)	LBC (45,8%)	A (45,4%)
TBARS plasmáticos	CPT (100%)	GBC (24,9%)	----	-----	----
TBARS renales	COE (100%)	CPT (70,9%)	LBC (54,8%)	GBC (48,3%)	A (25,8%)
TBARS urinarios	GBC (100%)	COE (38,4%)	A (37,8%)	LBC (30,3%)	---
Nitritos plasmáticos	CPT (100%)	GBC (79,9%)	LBC (69,9%)	COE (59,9%)	A (29,9%)
Proteínas urinarias	LBC (100%)	GBC (93,9%)	CPT (84,9%)	A (68,6%)	COE (10,8%)
Grosor del tabique interventricular	CPT (100%)	GBC (80,3%)	LBC (39,2%)	COE (21,4%)	A (7,0%)
Espesor de la aorta abdominal	COE (100%)	A (74,0%)	CPT (71,7%)	GBC (41,1%)	LBC (22,8%)

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

Eficacia grupo SHR de seis semanas según % de recuperación/ mg activo

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo SHR de 6 semanas				
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación/mg activo			
PAS	LBC (100%)	A (75,2%)	GBC (15,9%)	---
PAM	COE (100%)*	LBC (80,1%)	A (67,5%)	GBC (35,4%)
Relajación a ACh	A (100%)	LBC (70,9%)	COE (30,5%)	GBC (17,5%)
Máxima relajación a NPS	COE (100%)	LBC (61,3%)	A (43,4%)	GBC (11,6%)
TBARS plasmáticos	GBC (100%)*	----	----	----
TBARS renales	COE (100%)	LBC (41,1%)	A (13,8%)	GBC (6,0%)
TBARS urinarios	COE (100%)*	LBC (59,2%)	A (52,8%)	GBC (32,4%)
Nitritos plasmáticos	COE (100%)*	LBC (87,5%)	A (26,0%)	GBC (16,6%)
Proteínas urinarias	LBC (100%)	A (49,4%)	GBC (15,6%)	COE (14,4%)
Grosor del tabique interventricular	LBC (100%)	COE (72,8%)	GBC (34,1%)	A (12,9%)
Espesor de la aorta abdominal	COE (100%)	A (39,6%)	LBC (17,1%)	GBC (5,1%)

* Valores estadísticamente no significativos

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

Eficacia grupo SHR de doce semanas según % de recuperación

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo SHR de 12 semanas					
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación				
PAS	GBC (100%)	COE (87,6%)	A (74,4%)	D (69,4%)	LBC (35,0%)
Relajación a ACh	A (100%)	GBC (57,4%)	COE (45,5%)	LBC (13,0%)	----
Relajación a NPS	GBC (100%)	A (97,7%)	D (92,4%)	COE (81,6%)	LBC (37,4%)
TBARS plasmáticos	D (100%)	COE (64,3%)	GBC (14,2%)	LBC (11,9%)	----
TBARS renales	A (100%)	LBC (90,4%)	D (73,8%)	GBC (71,4%)	COE (7,1%)
TBARS urinarios	COE (100%)	GBC (98,8%)	D (98,0%)	LBC (92,8%)	A (34,6%)
Nitritos urinarios	GBC (100%)	LBC (0,3%)	---	----	----
Proteínas urinarias	GBC (100%)	LBC (96,5%)	COE (80,5%)	D (39,9%)	A (19,8%)

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Eficacia grupo SHR de doce semanas según % de recuperación/ mg activo

Resumen de la eficacia de los resultados obtenidos para el grupo SHR de 12 semanas					
Parámetro	% de eficacia según % de recuperación /mg activo				
PAS	COE (100%)	A (45,4%)	LBC (30,0%)	GBC (14,2%)	D (8,6%)
Relajación a ACh	A (100%)	COE (85,0%)	LBC (18,2%)	GBC (13,3%)	---
Relajación a NPS	COE (100%)	A (64,2%)	LBC (34,4%)	GBC (15,3%)	D (12,4%)
TBARS plasmáticos	COE (100%)	D (17,1%)	LBC (13,9%)	GBC (2,7%)	----
TBARS renales	LBC (100%)*	A (78,9%)	GBC (13,1%)	D (11,9%)	COE (10,4%)
TBARS urinarios	COE (100%)	LBC (69,5%)	A (18,5%)	GBC (12,3%)	D (10,7%)
Nitritos urinarios	GBC (100%)	LBC (2,1%)	---	---	---
Proteínas urinarias	COE (100%)	LBC (89,8%)	GBC (15,4%)	A (13,1%)	D (5,4%)

* Valores estadísticamente no significativos

---- Valores que no causan un efecto positivo o beneficioso

Tabla resumen de elementos estructurales preferentes según % de recuperación

(Coincidentes en su gran mayoría con los descritos en resultados y analizados en la discusión)

Elementos estructurales preferentes por grupo y parámetro			
Presión arterial	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
PAM	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>	CPT (fármaco control)	----
PAS	----	CPT (fármaco control)	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>
Reactividad vascular	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Máxima contracción a fenilefrina	3'-OH, 4'-OMe; C₂=C₃ <i>Flavona (D)</i>	----	----
Máxima relajación a acetilcolina	----	CPT (fármaco control)	4'-OH; C₂=C₃ <i>Flavona (A)</i>
Máxima relajación inhibida por L-NAME	4'-OH; C₂=C₃ <i>Flavona (A)</i>	----	----
Máxima relajación a nitroprusiato	4'-OH; C₂=C₃ <i>Flavona (A)</i>	CPT (fármaco control)	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>
Estrés oxidativo	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
TBARS plasmáticos	----	CPT (fármaco control)	3'-OH, 4'-OMe; C₂=C₃ <i>Flavona (D)</i>

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Elementos estructurales preferentes por grupo y parámetro			
TBARS renales	----	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	4'-OH; C₂=C₃ <i>Flavona (A)</i>
TBARS urinarios	----	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
Nitritos y proteínas	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Nitritos plasmáticos	----	CPT (fármaco control)	---
Nitritos urinarios	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	----	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>
Proteínas urinarias	----	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>
Histología	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Tabique interventricular	3'OH-4'-OMe; C₂=C₃ ≥ <i>Flavona (D)</i>	CPT (fármaco control)	---
Espesor aorta torácica	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	---	---
Espesor aorta abdominal	4'-OH; C₂=C₃ <i>Flavona (A)</i>		---

Tabla resumen de elementos estructurales preferentes según % de recuperación/mg activo:

Elementos estructurales preferentes por grupo y parámetro			
Presión arterial	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
PAM	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---
PAS	---	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
Reactividad vascular	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Máxima contracción a fenilefrina	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---	---

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Elementos estructurales preferentes por grupo y parámetro			
Máxima relajación a acetilcolina	----	4'-OH; C ₂ =C ₃ <i>Flavona (A)</i>	4'-OH; C ₂ =C ₃ <i>Flavona (A)</i>
Máxima relajación inhibida por L-NAME	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---	---
Máxima relajación a nitroprusiato	4'-OH; C ₂ =C ₃ <i>Flavona (A)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
Estrés oxidativo	Grupo L-NAM	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
TBARS plasmáticos	---	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
TBARS renales	---	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>
TBARS urinarios	---	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
Nitritos y proteínas	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Nitritos plasmáticos	---	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---
Nitritos urinarios	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---	3'-OH 4'-OMe (Neoh.); 4'-OH (Naring.) <i>Flavanona (GBC)</i>
Proteínas urinarias	---	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>
Histología	Grupo L-NAME	Grupo SHR 6 Semanas	Grupo SHR 12 Semanas
Grosor tabique interventricular	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	---
Espesor aorta torácica	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi) <i>Flavanona (LBC)</i>	---	---
Espesor aorta abdominal	4'-OH; C ₂ =C ₃ ≥ <i>Flavona (A)</i>	Grupo catecol en anillo B (3',4'-dihidroxi); 3-OH <i>Flavan-3-ol (COE)</i>	---

A la vista de estas dos tablas resumen de grupos y elementos estructurales se puede concluir que atendiendo al **% Recuperación** para la HTA L-NAME son las flavonas, especialmente la apigenina en los parámetros de reactividad vascular, las que muestran los mayores efectos beneficiosos. Por tanto, un grupo hidroxilo en la posición 4', el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y el grupo carbonilo en posición 4 (tratamiento A), siendo esta última característica un requisito fundamental para la acción vasodilatadora (Mladenka et al., 2010) son requisitos importantes en la reactividad vascular de este grupo.

Para el grupo de SHR de seis semanas, los mejores efectos los produce el fármaco control captopril (CPT) y de los flavonoides son las flavanonas (LBC, GBC) al igual que para el grupo de doce semanas, las más beneficiosas globalmente.

Los elementos estructurales implicados en esta familia de flavonoides son un grupo catecol (3',4'-dihidroxi) en el anillo B para la eriocitrina (componente mayoritario del tratamiento LBC) y un grupo 4'-OH para la naringina (componente mayoritario del tratamiento GBC).

En cambio, si comparamos el **%Recuperación/mg activo**, para el modelo de HTA L-NAME, son las flavanonas y flavanoles o flavan-3-oles, estos últimos fundamentalmente en los parámetros de reactividad vascular, las familias de flavonoides que muestran los efectos más beneficiosos.

En el modelo de HTA SHR, de nuevo vuelven a ser los flavanoles, especialmente en el estudio de los TBARS, los que producen efectos más beneficiosos y se caracterizan por tener un grupo hidroxilo en la posición 3' y un grupo catecol (3',4'-dihidroxi) en el anillo B. En general, los resultados de estos tratamientos son superiores a aquellos que contienen restos glicosídicos (Flavanonas GBC y LBC).

Aunque el propósito de este estudio fue evaluar los efectos de los flavonoides sobre la función endotelial en ratas hipertensas usando las dosis recomendadas para los humanos, estas diferencias usando uno u otro índice de recuperación sugieren que la potencia de los flavonoides puede ser diferente. Esto nos ha llevado a plantearnos si el efecto beneficioso sería mayor si hubiésemos administrado dosis mayores o bien estudiar los efectos de estos flavonoides usando la misma cantidad de mg de activos, lo que resulta interesante para un próximo estudio.

5.1 Justificación de los modelos utilizados

Debido a que la etiología de la hipertensión esencial no es conocida y puede ser multifactorial (Dornas and Silva, 2011), el uso de modelos experimentales ha proporcionado información valiosa sobre muchos aspectos de la misma, incluyendo etiología, fisiopatología, complicaciones y tratamiento. La elección del modelo animal viene determinada por el requisito de la investigación, las limitaciones monetarias y la experiencia técnica (Sarikonda et al., 2009). En el caso de la investigación de la HTA, el modelo animal elegido, debe tener una anatomía cardiovascular, hemodinámica y fisiología, lo más similar posible a la humana (Sharma et al., 2010) a fin de facilitar la extrapolación de conocimientos de una especie a otra (Bähr and Wolf, 2012).

En el pasado, la mayoría de estudios sobre HTA experimental eran llevados a cabo en perros, pero actualmente la rata es la especie animal preferida para, entre otros, la evaluación de fármacos antihipertensivos. Por otro lado, los cambios fisiopatológicos más comunes en el sistema cardiovascular humano (hipertensión, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca) se han reproducido satisfactoriamente en modelos de rata (Doggrell and Brown, 1998) que exhiben además, un fenotipo deseado (Lerman et al., 2005).

Otra ventaja es que este animal tiene un tamaño muy adecuado que facilita su manejo, su coste es relativamente bajo, tienen una corta vida media (aproximadamente dos años, T. Sugimoto, 2003) y tienen un corto periodo de gestación (entre 59-72 días) disponiendo así, de muestras de gran tamaño en un breve espacio de tiempo ((Badyal, D K et al., 2003); (Grossman, 2010)). Además, la localización anatómica de las diferentes arterias en la rata hace que este animal sea el más idóneo para la obtención de muestras; también, se pueden llevar a cabo medidas de presión arterial de la rata, en estado libre de anestesia, con relativa facilidad gracias a un sistema parecido al empleado en humanos (esfigmomanómetro en la arteria caudal del rabo). Se han desarrollado, por eso, diferentes modelos experimentales de hipertensión en ratas siendo los de origen genético los más utilizados actualmente.

En esta tesis doctoral, nos hemos propuesto abordar el estudio de la actividad antihipertensiva de distintos extractos de flavonoides mediante el uso de ratas como modelo animal que nos permita el estudio de esta enfermedad cardiovascular así como su patogénesis y los efectos de los fármacos administrados.

Debido a que la participación y el papel de los factores derivados del endotelio en el desarrollo de la disfunción endotelial puede variar en los modelos experimentales individuales de

hipertensión, dependiendo de la activación del estímulo, cepa y lecho vascular (Bernatova, 2014) y como es conveniente, además, que un determinado agente antihipertensivo se evalúe en distintos modelos experimentales de estudio, ya que puede actuar por distintos mecanismos, hemos utilizado dos modelos animales de HTA en el presente trabajo que son los siguientes:

- a) Ratas con hipertensión arterial por déficit de óxido nítrico (L-NAME)
- b) Ratas con hipertensión arterial espontánea (SHR)

La administración de L-NAME enfocada a la baja producción de NO es ampliamente usada ya que es un modelo técnicamente fácil con un procedimiento que tiene baja mortalidad. La HTA inducida por L-NAME es de particular interés debido a que permite estudiar “in vivo” los efectos de una prolongada deficiencia de NO (Küng et al., 1995) aunque hay que decir que el papel de la disminución de NO en la HTA humana no ha sido aclarado completamente ((Doggrell and Brown, 1998); (Chatterjee and Catravas, 2008)). En este caso, debido a la baja dosis de inhibidor usada, podríamos considerar a este modelo como uno de disfunción endotelial.

Los investigadores de la hipertensión, por lo general, han recurrido al uso de SHR debido a que tienen, dentro de cada colonia, una disposición poligénica uniforme y factores de excitación que producen cambios uniformes en los efectos directos e indirectos en el sistema cardiovascular. Esta falta de variación interindividual es una de las principales ventajas de la SHR. Otra ventaja de la SHR es que la hipertensión sigue la misma progresión que la hipertensión humana, con una fase de pre-hipertensión, seguida por una fase de desarrollo y la fase de establecimiento de la enfermedad. Estas fases tienen una duración de varias semanas lo que facilita su estudio. Sin embargo, difieren en la edad de desarrollo de la enfermedad, ya que mientras en SHR ocurre al principio de la edad adulta, en humanos se desarrolla en un período intermedio de su edad adulta (Doggrell and Brown, 1998).

En general, la rata SHR está considerada como el mejor modelo animal para llevar a cabo estudios de hipertensión esencial en humanos (Rocha 2010) (Rocha et al., 2010), ya que el desarrollo de hipertensión en este modelo de HTA, presenta muchas similitudes con el desarrollo de la hipertensión esencial en humanos y son también, uno de los mejores modelos experimentales para la evaluación de fármacos antihipertensivos (M. Quiñones, 2010), (Bourassa et al., 2010).

En referencia a la elección de la duración de los tratamientos aplicados (6 y 12 semanas), hay que decir que la hipertensión arterial es una patología crónica que requiere tratamiento continuado y la posibilidad de administrar estos compuestos a largo plazo sin efectos adversos, sería una buena terapia para poder controlar y prevenir esta enfermedad (M. Quiñones, 2010). Por esta razón, y en base a investigaciones previas, creímos conveniente realizar un estudio, sólo en las SHR, en el que se administraran estos compuestos durante un período prolongado de tiempo (doce semanas de duración), evaluando posteriormente la efectividad antihipertensiva de los mismos (Miguel et al., 2005). Puesto que también se ha observado en estudios

posteriores, que estos compuestos pueden controlar la hipertensión a corto plazo, decidimos aplicar un tratamiento de seis semanas de duración.

Aunque se han demostrado las propiedades antihipertensivas de los flavonoides (M. Quiñones, 2010), serán necesarias más investigaciones para aclarar los mecanismos responsables de los efectos antihipertensivos de estos compuestos y también para saber si es posible utilizarlos como ingredientes de alimentos funcionales útiles para el tratamiento de la HTA. Por otro lado, es evidente, que antes de su uso clínico rutinario, será indispensable llevar a cabo estudios clínicos para demostrar su seguridad y eficacia antihipertensiva en pacientes hipertensos (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009), ya que bien es sabido que el uso de fármacos a largo plazo como terapia para controlar la HTA, tiene muchos efectos secundarios que pueden complicar la condición médica del paciente (Quiñones et al., 2011).

5.2 Justificación de los parámetros fisiológicos estudiados en estos modelos

En primer lugar, seguimos la evolución de la presión arterial sistólica que se midió por pletismografía utilizando un manguito en la cola y posteriormente, también se midió la presión arterial media de forma directa por canulación de la arteria femoral.

También es sabido que el riñón juega un papel fundamental en el control de la presión arterial mediante la regulación del balance de Na y volumen del fluido extracelular (Guyton, 1991) de tal manera, que el control alterado de la excreción de Na por el riñón, conlleva la desregulación de los volúmenes de fluido corporal, pudiendo contribuir a la HTA (Crowley et al., 2006). Se ha podido comprobar además, que la retención de Na participa en el desarrollo de la HTA (Alcasena, M S et al., 1998). Por otro lado, una variedad de lesiones características de daño renal se encuentran alteradas después de un incremento de la presión arterial asociándose todos estos tipos de daño renal con una progresiva proteinuria (García-Estañ et al., 2006). Teniendo en cuenta todo esto, hemos llevado a cabo la medida de variables urinarias tales como la diuresis, la natriuresis, balance de sodio y proteinuria.

La disfunción endotelial caracterizada por un balance alterado de factores de contracción y relajación puede justificar, al menos en parte, el incremento de la PA que conduce a una menor biodisponibilidad de NO empeorando la vasodilatación dependiente de endotelio (Puddu et al., 2000) y es uno de los mecanismos principales de la fisiopatología de la HTA (Oscar Rosas-Carrasco, 2003). Por esta razón, analizamos el grado de disfunción endotelial, llevando a cabo ensayos *in vitro* para estudiar la reactividad vascular de anillos aórticos con endotelio funcional en un baño de órganos.

Entre otros factores, la hipertensión se asocia a la producción de radicales libres, la peroxidación lipídica, y el estrés oxidativo. Dado que el estudio de la concentración de MDA refleja todas las

alteraciones anteriores (Sánchez et al., 2010), evaluamos los niveles de MDA mediante el ensayo de TBARS en muestras de tejido, plasma y orina. También se han determinado los niveles de NO por medida de los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, los cuales son los metabolitos estables finales de la degradación del NO y que pueden ser fácilmente detectados por el método de la reacción de Griess (Chung et al., 2012), para investigar la participación del mismo en la patogénesis del NO.

La HTA causa modificaciones de la pared vascular afectando los cambios en las propiedades mecánicas de las arterias a la resistencia vascular al alterar la relación diámetro presión-luz de las pequeñas arterias (Andriantsitohaina et al., 2012). En la mayoría de los modelos de hipertensión estudiados, el diámetro interno se reduce y la relación pared/luz se incrementa en las pequeñas arterias (Briones et al., 2003). El incremento en el espesor de la media es un marcador de modificaciones estructurales caracterizado por una hipertrofia y fibrosis de las células musculares lisas lo cual está directamente relacionado con altos niveles de presión y estrés (Boon et al., 2013) y debido a que los flavonoides pueden inhibir la proliferación de las células del músculo liso (característica constante de la placa aterosclerótica), mejorando la función de los vasos (Gross, 2004), decidimos hacer un estudio histológico en muestras de tejido cardiaco, riñón y aorta.

5.3 Evaluación de los efectos obtenidos sobre los distintos parámetros fisiológicos por el uso de los extractos de flavonoides estudiados

Los animales con HTA presentaron valores elevados de PA respecto a sus controles y similares a los obtenidos por otros estudios con un tiempo y dosis de tratamiento (en el caso de la HTA-L-NAME) y edades similares (Hlavačková et al., 2011); (Bartunek et al., 2000)).

Igualmente, la evolución de la PAS en nuestros grupos SHR (figura 59) es parecida a la que muestran otros estudios ((Boon et al., 2013), (Knight et al., 2008)) y los laboratorios dedicados a la cría comercial de estos animales (como Harlan y Charles River) en los que se observan valores de unos 160-170 mmHg a las 10 semanas de vida y alcanzan una meseta en valores próximos a los 200 mmHg a partir de la semana 14-15.

De todas formas, existe gran variabilidad en los diferentes estudios y esto puede deberse a múltiples factores, desde la diferente procedencia de los animales ((Zhang-James et al., 2013); (Henry et al., 1990)) hasta la diferente sensibilidad de los animales en respuesta a una situación “estresante” como es el calentamiento o estrés térmico causado por el incremento de la temperatura corporal requerido para dilatar la arteria caudal y también la sujeción producida durante la realización de las medidas de PAS que puede producir incrementos sustanciales de la

temperatura corporal incluso sin calentamiento del animal (Kurtz et al., 2005). Todos estos factores, pueden afectar a los principales mecanismos homeostáticos de la regulación de la PAS como son el SNS y el SRAA, que también afectan a la FC.

Otros factores importantes que pueden causar diferentes efectos sobre la presión arterial, FC y otras variables cardiovasculares son los ambientales como la temperatura ambiente de la habitación, la luz del ciclo, los niveles de ruido, la duración con el contacto humano, etc. (Kurtz et al., 2005).

5.3.1 Presión arterial y frecuencia cardíaca

En los dos modelos de animales estudiados, los animales hipertensos no tratados, presentaron un significativo incremento de la PAM, sobre todo en el modelo SHR, siendo este incremento más notable en el grupo de doce semanas. Todos estos incrementos permiten, por consiguiente, un margen de recuperación suficiente para apreciar y evaluar si los tratamientos estudiados muestran o no una reducción de la PAM en los animales hipertensos.

En el caso del modelo de HTA L-NAME, similares resultados a los nuestros han sido publicados por otros autores, que atribuyen el aumento de la presión arterial al elevado tono vascular debido a la inhibición de la relajación del músculo liso inducida por NO (Sekiguchi et al., 2001). La escasez de NO deja a los sistemas vasoconstrictores (SNS, SRAA, endotelina, tromboxanos, etc.) sin uno de los principales contrareguladores dando lugar a un predominio vasoconstrictor, aumento de las resistencias vasculares sistémicas (RVS) y de la PAM ((Pechánová et al., 2004); (Bernatova, 2014)).

En la HTA del modelo SHR hay una predisposición genética (poligénica), aunque los genes responsables aún no han sido del todo identificados pero se sabe que al menos tres genes importantes están involucrados en el desarrollo inicial de la HTA, mientras que un gen adicional identificado en el cromosoma 10, contribuye al desarrollo y mantenimiento de la HTA durante la etapa de envejecimiento de la SHR (Lerman et al., 2005). También hay factores excitadores que producen cambios uniformes directos e indirectos sobre el sistema cardiovascular (Doggrell and Brown, 1998). Entre estos factores, se encuentran sistemas que participan en la regulación del tono vascular, la fisiología renal, y/o electrolitos y la homeostasis de fluidos. Así, por ejemplo:

- 1) **RAAS**: en el sistema RAAS hay una asociación del polimorfismo del receptor AT1, angiotensinógeno, o ECA con HTA
- 2) **Péptidos natriuréticos**: las variantes alélicas de genes del receptor del péptido natriurético, se asocian con hipertensión
- 3) **ET**: la transferencia del gen de la endotelina 1 (ET-1), incrementa la PA
- 4) **NO**: existe una relación entre alteraciones genéticas en el gen de la eNOS y la hipertensión. Los polimorfismos de los genes de la eNOS, se han asociado al riesgo de padecer hipertensión (Lerman et al., 2005)

Por otro lado, en este modelo de HTA se observan alteraciones de la síntesis de NO, como así lo demuestra el hecho de que la respuesta vasodilatadora a ACh está deteriorada en comparación con la del control WKY, presumiblemente debido a una disminución en la síntesis y/o liberación de este factor de relajación derivado del endotelio. En el desarrollo de la HTA, la rata SHR presenta una disminución en la actividad y expresión de la proteína eNOS en la aorta con una elevación de la actividad y expresión de la proteína iNOS (Chou et al., 1998). (Vaziri et al., 1998), han demostrado que el desarrollo de la HTA no se debe a una deficiencia primaria en la producción de NO en SHR porque se produce un aumento de la producción de NO en ratas jóvenes, lo cual excluye al deterioro de la vía L-arginina/NO como causa principal de HTA en SHR. Por otro lado, (Nava et al., 1998), han observado que la vía del NO es regulada en los vasos de resistencia y corazón de las SHR, por un mecanismo que implica la inducción de la cNOS, dando lugar a una sobreproducción de NO. A pesar de este hecho, el NO producido endógenamente no es suficiente para estimular la formación de cGMP y mantener un adecuado tono vasodilatador dependiente de NO. Esta discrepancia entre alta producción de NO y baja biodisponibilidad del mismo es probablemente debida al incremento en la producción de EROs tanto en SHR jóvenes como adultas o a una barrera física como es la capa íntima fibrótica de los vasos hipertensos (Pechánová et al., 2006).

En los tres protocolos de hipertensión, los tratamientos consiguieron disminuir, aunque no en todos de forma significativa, las cifras de PAM, sin llegar en ningún caso a alcanzar los valores de los controles normotensos. Estas reducciones son realmente llamativas en el modelo L-NAME, grupo en el que tres de los tratamientos lograron una recuperación significativa de la PAM (A, LBC y GBC). Es de destacar que los resultados del extracto de limón (LBC) junto con el extracto de pomelo y naranja amarga (GBC), presentan una mayor eficacia que la flavona diosmina (D), principio activo de algunos bien conocidos vasoprotectores periféricos, habituales del ámbito farmacéutico. Por tanto, hay que destacar la importancia del grupo catecol (3', 4'-dihidroxi) en el anillo B del esqueleto flavonoide en el efecto sobre este parámetro. Recordemos que la reducción de la PA de varios extractos polifenólicos, principalmente los flavanoles, en varios modelos experimentales de hipertensión en rata, se debe a la combinación de acciones vasodilatadoras y antioxidantes (Jiménez et al., 2012). La presencia del grupo catecol o anillo B-dihidroxilado permite una rápida donación de hidrógeno (electrón) y así estabilizar especies radicalarias (Engler and Engler, 2004). La presencia del grupo carbonilo (C=O) en la posición 4 del anillo C especialmente en asociación con el doble enlace en las posiciones C2 y C3, aumenta la actividad captadora por deslocalización de electrones en el anillo B (Jain et al., 2010).

La disminución de la PAM fue significativamente menor en los grupos SHR, sobre todo en el grupo SHR de doce semanas, donde los grupos tratados carecieron de significación estadística respecto al grupo de animales sin tratamiento. En cambio, sí redujeron significativamente la PAM en las SHR de 6 semanas, los tratamientos con GBC y el fármaco control captopril.

La similitud de los cambios observados en la PAM y la PAS, nos sugiere que ambos métodos, la cateterización directa de la arteria femoral y la medida de presión en el rabo, son válidos para determinar la PA. Pero también se pone de manifiesto la variabilidad de los valores de la PA cuando su medida se realiza en el animal anestesiado respecto a cuándo se realiza "in vivo". Esto explicaría, que aquellos grupos con diferencias grandes entre sus valores (como los grupos normotensos respecto a los hipertensos, o hipertensos respecto a CPT) mantengan la significación estadística independientemente de la forma que se realizó la medida de la PA. En cambio, cuando las diferencias entre los grupos son menores (como los grupos hipertensos tratados respecto al no tratado) esa variabilidad haría que la significación estadística aparezca o desaparezca dependiendo del método utilizado.

La variabilidad en la medida de la PA según el método empleado puede ser debida a que la técnica utilizada en la PAS (tail-cuff), conlleva una hipertermia que es un potente estimulante del sistema nervioso simpático y aumenta la actividad en los nervios simpáticos (renal, esplácnico y lumbar) que inervan diferentes lechos arteriales (Kenney et al., 1998). Por otro lado, la inmovilización requerida, produce un aumento de catecolaminas (norepinefrina, epinefrina) y corticosterona en las SHR. Por tanto, la adaptación a la situación de estrés, podría ser una fuente de variabilidad en la PAS respecto de la PAM, que produce una activación significativa del sistema simpático medular adrenal y un aumento de la presión arterial (McCarty et al., 1988) con respecto a la PAM.

En la medida de la PAM, con el animal anestesiado, se evita la situación de estrés en los animales y se facilitan las medidas pero el anestésico siempre modifica ligeramente la medida de la PA. En concreto, el anestésico utilizado en nuestro caso, pentobarbital, reduce la PA en ratas normotensas e hipertensas debido a la atenuación de la contribución del SNS al mantenimiento de la PA. De todos modos, el pentobarbital parece ser el anestésico que causa menores cambios hemodinámicos que otros anestésicos, ya que las respuestas de PA basales así como las respuestas de la PA al bloqueo del SNS y RAAS, no se alteran cuando se comparan con las de los animales conscientes. Además, las interferencias de este anestésico en experimentos cardiovasculares son pequeñas, en comparación con la de otros anestésicos utilizados (Bencze et al., 2013).

La administración de los extractos de flavonoides en la dieta y en las dosis usadas fue capaz de disminuir los valores de PAS o quizás de ralentizar el incremento de ésta en este modelo de hipertensión estudiado, excepto el COE a las seis y el LBC a las doce semanas de tratamiento, produciéndose el mayor descenso en los tratamientos de seis semanas de duración, pudiendo ser debido este comportamiento, a la edad y al estado de la progresión de la enfermedad entre otros factores. Estos resultados sugieren que en detenciones patológicas avanzadas, estos compuestos tendrían menos efecto y serían más útiles en estados iniciales.

Para el grupo SHR, estos resultados muestran desde un punto de vista estructural que también es el tratamiento con LBC (seis semanas) junto con el GBC, COE (doce semanas) los que tienen una mayor eficacia seguidos de la flavona A.

Estas consideraciones, parecen sugerir, que tanto en la recuperación de la PAS como de la PAM, hay elementos estructurales en el esqueleto flavonoide claves para conseguir dicho efecto. Los resultados obtenidos indican que el orden de preferencia estructural en la reducción de la PA en ambos modelos de hipertensión, e independientemente de la metodología usada para su medida, fueron similares cuando se compara la eficacia de los activos flavonoides con un predominio en la estructura molecular de un grupo catecol en el anillo B (3', 4'-dihidroxi) presente principalmente en los tratamientos LBC y COE, seguidos de la flavona A que se caracteriza por un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 además de un grupo hidroxilo en el carbono 4'. Ahora bien, es más difícil poder extraer una conclusión sobre qué flavonoide es el que tiene el mayor efecto, al mostrar todos los tratamientos comportamientos relativamente similares.

En resumen, la posible interpretación estructural que se da de los resultados obtenidos para la PA, es que los flavonoides que presentan en su estructura un grupo catecol en el anillo B (LBC, COE), un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 en el anillo C (A) en combinación con el grupo 4-oxo parecen ser importantes para la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), enzima clave en el control de la PA (Guerrero et al., 2012), con adicionales efectos positivos sobre la disfunción renal y la insuficiencia cardíaca congestiva ya que la inhibición de la ECA, reduce los niveles de angiotensina II, con la consecuente menor activación de la NAD(P)H oxidasa y la formación de anión superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa. La inhibición de la ECA también se ha asociado *in vivo* con un incremento de los niveles de NO y un descenso del EO (Fraga, 2007).

Nuestros resultados de los niveles de NO y TBARS, demuestran que prácticamente coinciden con los obtenidos para la PA, ya que los tratamientos A, LBC y GBC presentan los mayores niveles plasmáticos y urinarios de NO con valores estadísticamente significativos mientras que el estudio del ensayo de TBARS en muestras de tejido plasma y orina, para el modelo HTA SHR (HTA L-NAME carece de significación estadística), fueron los tratamientos A, LBC, y COE los de mayor reducción significativa de la concentración de los niveles de MDA. Por otro lado, además de la inhibición de la ECA, los flavonoides tienen otras propiedades antioxidantes como la disminución de la formación de las EROs (superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso (Curin and Andriantsitohaina, 2005), protegen contra la toxicidad del peroxinitrito (Heijnen et al., 2001), actúan también mediante la regulación o protección de las defensas antioxidantes, inhiben enzimas responsables de la producción del anión superóxido (Pietta, 2000), y, por último, pueden interactuar con los sistemas de detoxificación celular como la SOD, la catalasa o la glutatión peroxidasa (Curin and Andriantsitohaina, 2005), etc.

En el caso del COE, el efecto inhibitor sobre la actividad de la ECA es dependiente del número de unidades de epicatequina que forman la procianidina. Las procianidinas inhiben la actividad de la enzima al competir con el sustrato por los centros activos, así las moléculas más largas pueden inhibir los C- y N- centros activos en un grado similar, mientras que los monómeros y los dímeros, lo hacen preferentemente en el sitio N-activo.

Además, como la ECA es una proteína de membrana, las procianidinas (especialmente las moléculas más grandes), pueden ser absorbidas a interfases lípido-agua, siendo factible un enriquecimiento local de estos compuestos sobre la superficie de la membrana que podría conducir a una mayor interacción con la enzima. Esta acumulación podría tener lugar en las membranas de las células endoteliales vasculares, las cuales se cree que son las responsables de regular la presión arterial. Dicha interacción podría estar relacionada con el número de grupos hidroxilo de las procianidinas, los cuales determinan su capacidad para ser absorbidos sobre la superficie de membrana (Actis-Goretta et al., 2003).

Otro mecanismo propuesto para el efecto antihipertensivo de los flavanoles ricos en cacao, incluye la capacidad de reducir la actividad de la arginasa-2, enzima que se encuentra principalmente en el riñón y que compite con la eNOS por la L-arginina, empeorando así la producción de NO (Schnorr et al., 2008). Además, según estudios realizados por (Fraga et al., 2011), su principal componente que es la (-)-epicatequina, parece tener una singular relevancia en la disminución de la PA. Esto podría ser debido a que el tratamiento con epicatequina activa la eNOS mediante la fosforilación de la serina 633 y serina 1177 y desfosforilación de la treonina 495 induciendo la disociación de eNOS de la proteína inhibitoria caveolina-1. Se ha sugerido que los efectos de epicatequina son dependientes de calcio y están relacionados con acciones ejercidas a nivel de la membrana celular (Fraga et al., 2011).

El otro tratamiento en importancia, correspondía a la flavona A. El mecanismo por el cual la apigenina reduce la presión arterial, estaría relacionado con la regulación del incremento de la expresión de la ECA2 en el riñón (Sui et al., 2010) (Sui et al., 2010). La enzima convertidora de angiotensina 2, ha sido recientemente identificada como una monocarboxipeptidasa multifuncional responsable de la conversión de angiotensina (Ang) II a Ang-(1-7). Se ha demostrado que la señalización de ECA2/Ang (1-7), impide la proliferación celular, la hipertrofia patológica, el estrés oxidativo y la fibrosis vascular, y, por tanto, es beneficiosa para el sistema cardiovascular como un regulador negativo del sistema renina angiotensina (Zhang et al., 2014).

En resumen, el efecto de reducción de la presión arterial de estos extractos estaría relacionado con una combinación de acciones vasodilatadoras y antioxidantes, derivadas, sobre todo, del bloqueo de la Ang II y de la mayor disponibilidad de NO.

En relación a la respuesta vasodilatadora, nosotros hemos encontrado una mayor respuesta dependiente de NO en los grupos tratados con la flavona A, LBC, y GBC para el modelo de HTA SHR, que es donde únicamente se encuentran valores de relajación estadísticamente significativos, cuyas características estructurales coinciden prácticamente con las de los tratamientos más eficaces para la PA.

Además, una relación inapropiada de vasoconstrictores/vasodilatadores en el riñón da lugar a una diuresis (y natriuresis) de presión alterada. La respuesta renal normal a un aumento de la PA es una vasodilatación medular, mediada de forma muy importante por el NO, que da lugar a un aumento en la diuresis (y natriuresis) que hace perder volumen (sodio y agua) y devolver la PA a sus valores normales. En los animales hipertensos el predominio de vasoconstrictores

respecto a vasodilatadores da lugar a un desplazamiento de la diuresis y natriuresis de presión hacia presiones más altas, es decir, un animal hipertenso “necesitaría” de presiones más elevadas que uno sano para mantener los mismos valores de diuresis y natriuresis.

Los tratamientos parecen mejorar la diuresis siendo en el modelo de HTA L-NAME los tratamientos COE y la flavona D, los que tienden a recuperar la capacidad de diuresis mientras que en el modelo de HTA SHR, los tratamientos no afectaron significativamente a la diuresis, excepto el fármaco control CPT que la aumentó considerablemente, y, como consecuencia, la ingesta de bebida. Esto no nos debe sorprender ya que está demostrado que los inhibidores de la ECA inducen sed y aumentan la producción de orina (M. Quiñones, 2010). Los tratamientos también mejoran la natriuresis de presión, sobre todo en el grupo de L-NAME donde las ratas no tratadas tienen un balance de sodio superior con respecto al grupo control, y todos muestran valores próximos a los del grupo control aunque sin significación estadística. La natriuresis de presión para el modelo de HTA SHR de seis semanas aumenta de forma significativa, en el caso de los tratamientos LBC y CPT, como indica el descenso significativo en el balance de sodio de estos dos grupos.

Es evidente que en esta mejoría funcional, influyen los cambios estructurales, y en este sentido nuestros resultados muestran, de forma global, que es el grupo catecol en el anillo B (3', 4'-dihidroxi), presente principalmente en los tratamientos LBC y COE, la característica estructural que presenta una mayor eficacia en las variables urinarias de diuresis y natriuresis de presión. Por otra parte, la tercera variable urinaria medida, proteínas urinarias, coincide al igual que en las dos variables anteriores, en la importancia de este elemento estructural.

Consideramos importante puntualizar que en este estudio no hemos considerado las potenciales implicaciones del metabolismo y biodisponibilidad de cada uno de estos compuestos, ya que específicamente quedan fuera del ámbito de esta tesis pero es un tema a considerar para estudios posteriores.

Frecuencia cardíaca

El aumento de FC que aparece en la HTA es debido a la activación del SN simpático ((Grassi, 2010); (Judy and Farrell, 1979)), que es potenciado por el efecto sensibilizador simpaticomimético de la angiotensina II ((Maeso et al., 1996); (Qiu et al., 1994)). Nosotros observamos un aumento de la FC en los animales SHR de 6 y 12 semanas, significativo y de mayor magnitud en los SHR de 12 semanas. De todas formas, hay que tener en cuenta que la FC es un parámetro de gran variabilidad en estos animales.

Estudios in vivo han demostrado que en las primeras etapas de la hipertensión, la rata SHR muestra un aumento del gasto cardiaco (que depende de la frecuencia cardiaca y del volumen sistólico) con una con una resistencia periférica normal. Conforme la enfermedad avanza hasta el estado de hipertensión establecida, el gasto cardiaco vuelve a valores normales (probablemente debido al descenso del volumen sistólico) y los vasos sanguíneos

hipertrofiados producen un aumento de la resistencia periférica normal (Dornas and Silva, 2011).

En el grupo SHR de seis semanas, el CPT es el único tratamiento que logra reducir significativamente la frecuencia cardíaca y, además, de manera importante. Para el de doce semanas, todos a excepción de la apigenina, reducen la frecuencia cardíaca aunque de forma más modesta.

El CPT, un inhibidor de la ECA, es muy eficaz en la prevención del desarrollo de la HTA genética en ratas (Giudicelli et al., 1981). La inhibición de la ECA, impide la conversión de AI a All y aumenta los efectos de la bradicinina.

Por otro lado, el tratamiento con CPT, administrado oralmente a ratas SHR, inhibe fuertemente a la ECA y reduce significativamente la PA, las resistencias periféricas y la frecuencia cardíaca sin afectar al gasto cardiaco (Richer et al., 1983). Los flavonoides poseen la capacidad de dilatar los vasos sanguíneos (Akhlaghi and Bandy, 2009) mejorando la función endotelial liberando NO ((Grassi et al., 2008); (Schmitt and Dirsch, 2009)), lo que estaría relacionado la inhibición de la ECA (Mar Quiñones, 2011). Por tanto, al igual que el CPT, los flavonoides poseen propiedades vasodilatadoras e inhiben la ECA, pudiendo disminuir la FC por mecanismos similares al del compuesto de referencia, si bien es posible que el ligero efecto reductor de la presión arterial en estos modelos pueda influir también en su menor efecto cardiaco.

5.3.2 Parámetros metabólicos

Peso corporal

Sólo en el modelo de HTA L-NAME, el grupo con HTA no tratado mostró pesos inferiores al grupo control ((Bartunek et al., 2000); (Bryant et al., 1995); (Trippodo and Frohlich, 1981)). En el modelo de HTA SHR, apenas se apreciaron diferencias.

Este descenso para el grupo con HTA L-NAME, no fue debido a una disminución de la ingesta de comida o bebida, que fue similar a los controles, ni a un aumento en la diuresis que fue inferior al grupo control, aunque no de forma significativa. Una posible explicación a esta pérdida de peso es que los animales están “enfermos” ya que el déficit crónico de NO produce alteraciones vasculares que comprometen el aporte de sangre a diferentes órganos, alterando su función de forma progresiva ((Pinto et al., 1998); (Qiu et al., 1998); (Vaziri et al., 1998)). Nosotros hemos encontrado un aumento significativo en el espesor del tabique interventricular, la aorta torácica y abdominal y una mayor tendencia al daño vascular conjunto cardiaco y renal en el grupo hipertenso L-NAME respecto al grupo control. Entre las alteraciones que hemos encontrado están: una hiperplasia severa de la capa media de arterias intramiocárdicas y renales, arteriopatía hialina y necrosis fibrinoide en miocardio y riñón. Estas lesiones van disminuyendo la luz vascular y reduciendo el aporte sanguíneo a los

tejidos, dando lugar a zonas con atrofia, necrosis e infartos. Dado que la inhibición de la NOS es sistémica, hay potencialmente una afectación de todo el organismo repercutiendo en parámetros como el peso, indicativo del estado general del animal. En un estudio realizado en ratas WKY, se administró L-NAME (10 mg/Kg/día) durante ocho semanas (dosis análoga a la nuestra y dos semanas más de tratamiento), comprobándose que las ratas no perdían peso. Sin embargo, a una dosis superior (100 mg/Kg/día) y con la misma duración del tratamiento, se producía una pérdida de peso, sugiriendo la posibilidad de una mala absorción y/o toxicidad inducida por la administración de L-NAME (Numaguchi et al., 1995). Por otro lado, la administración de L-NAME tiene un importante efecto en áreas del cerebro implicadas en la regulación del apetito (Vozzo et al., 1999). Según estudios llevados a cabo en ratones y ratas en los que se produce una pérdida de peso respecto al grupo control control, se cree que podría ser debida principalmente al propio tratamiento con L-NAME ya que el NO parece estar implicado en la regulación del apetito ((Peotta et al., 2001); (Rossi and Colombini-Netto, 2001)).

Por otro lado, en el caso de la HTA SHR, el peso corporal es moderadamente dependiente de los factores ambientales que ocurren en la colonia en diferentes momentos, decreciendo esta dependencia con la edad (Dickhout and Lee, 1998). El hecho de que no observemos esta afectación en los grupos SHR pone de manifiesto algunas diferencias entre estos dos modelos de hipertensión, por ejemplo la vida media de las ratas, mucho menor en el modelo HTA L-NAME que en el SHR, ya que las ratas con hipertensión inducida por L-NAME, generalmente mueren entre las 8 y 11 semanas, posiblemente por infartos medulares, insuficiencia renal y otras formas de daño a órganos diana. Sin embargo, las ratas con hipertensión espontánea son capaces de vivir hasta una edad de 70 semanas a pesar de que el aumento de presión arterial sea similar (Küng et al., 1995), lo que explicaría que hubiera una menor afectación general de las SHR en el tiempo en el que se realizó el estudio.

Respecto al efecto de los tratamientos sobre el peso corporal, no se observan cambios con significación estadística, pero resulta muy llamativo que todos los tratamientos mejoren el peso final de los animales con HTA L-NAME, sobre todo, A, LBC y COE. Esta mejoría también es independiente de la ingesta de comida, bebida o la diuresis ya que todos los grupos tratados tuvieron una ingesta de agua y comida similar o inferior y una diuresis similar o superior al grupo L-NAME y, sin embargo, tienen un peso mayor. Esto sugiere que los animales hipertensos tratados están “más sanos” o “menos enfermos” que los del grupo con HTA L-NAME sin tratamiento. De hecho, observamos que, en conjunto, el daño vascular cardíaco y renal es menor (aunque no significativo) en todos los grupos con hipertensión tratados, y lo mismo sucede si valoramos en conjunto el grosor del tabique interventricular y de la aorta torácica y la abdominal. Estos datos insinúan a priori que la administración de flavonoides a ratas con HTA L-NAME, tiene un efecto beneficioso ya que mejora su estado general.

Por otro lado, los tratamientos, en general, no ejercen ningún efecto llamativo sobre el peso de las ratas SHR, si bien es cierto que el grupo tratado con GBC del protocolo SHR de 12 semanas, presenta valores inferiores al grupo hipertenso no tratado, aunque parecidos a los del grupo control. Si analizamos más a fondo estos valores veremos que sólo hay 17 gramos de diferencia entre el SHR y el GBC, una diferencia menor que la de otros tratamientos, como el COE que fue de 39 gramos pero con una mayor variabilidad intragrupo. Según nuestros resultados, este descenso de peso del grupo GBC no es debido a una menor ingesta de bebida (ya que el GBC tiene un sabor amargo) ni de comida, ni a una diuresis mayor que los animales SHR sin tratar. Tampoco tienen una afectación vascular diferente a la de otros tratamientos que justifique una mayor afectación sistémica en los animales de este grupo y que indique que están más enfermos.

Diuresis

Tanto en L-NAME como en los dos de SHR, no hay cambios significativos de la diuresis con respecto a los controles normotensos, lo que sugiere el ajuste del balance hídrico en los distintos grupos experimentales a las cifras de presión arterial. Dado que el principal mecanismo de eliminación de agua corporal es el renal, mediante la formación de orina, y que la PA de los animales hipertensos es muy superior a la de los controles, parece lógico pensar en la existencia de una alteración de su función renal, y en concreto del mecanismo de diuresis de presión, que explique esa inadecuada diuresis, como ya comentamos en el apartado de la PA. De esta manera, los animales mantendrían una diuresis similar pero a expensas de una mayor presión arterial. Es decir, la relación de diuresis de presión estaría desplazada hacia la derecha, esto es, hacia una mayor presión de perfusión renal.

Aunque proporcionalmente tendrían menos importancia, no podemos descartar que otras vías de eliminación de agua corporal, mediante la respiración, la transpiración y con las heces, puedan contribuir a este desequilibrio hídrico de los animales hipertensos, si bien las condiciones ambientales de todos los animales fueron las mismas y no apreciamos una diferencia en la consistencia de las heces entre los diferentes grupos, aunque no se realizó un análisis detallado de las mismas. Por otro lado, es posible que una mayor actividad o sensibilidad al SNS de los animales hipertensos pueda afectar a la frecuencia respiratoria y en consecuencia aumentar las pérdidas por respiración, pero no disponemos de este parámetro para confirmarlo.

Balance de sodio

El balance de sodio es la diferencia entre la ingesta de Na y su excreción urinaria en 24 h, expresado por 100 g de peso. Y el cálculo de la excreción urinaria de Na, o natriuresis, tiene en cuenta la diuresis o volumen de orina en 24 horas y la concentración urinaria de Na. Por tanto, este parámetro integra de forma más global el manejo del sodio del organismo y aporta más información que la excreción urinaria de Na.

Aunque podemos observar una mayor retención de sodio en los animales L-NAME no tratados con respecto al grupo control, esta variación no alcanza a ser estadísticamente significativa. Sin embargo, para los animales SHR tanto en el tratamiento de seis como de doce semanas, los valores del grupo no tratado apenas se modifican con respecto a los de los controles normotensos, lo que es coherente con los cambios observados en la diuresis. Por tanto, podemos decir que en los animales con HTA sin tratar la relación de natriuresis de presión también estaría desplazada hacia la derecha, esto es, hacia una mayor presión de perfusión renal.

Como comentábamos en la discusión de la PA, bien sea por el déficit de NO o por causas multifactoriales, en los dos modelos de HTA hay un predominio de sustancias vasoconstrictoras que tienen potentes efectos antidiuréticos y antinatriuréticos. Por otra parte, se ha descrito una disminución de la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa que establece y mantiene una alta concentración de K^+ y una baja concentración de Na^+ intracelulares, tanto en el riñón como en el músculo cardíaco y liso en ambos modelos de HTA, que parece estar relacionada con un descenso de los niveles de NO ((Vrbjar et al., 2002); (Vlkovicová et al., 2008); (Javorková et al., 2003)). La afectación de la isoforma presente en esos músculos altera el gradiente local transmembrana de Na^+ que participa en la regulación intracelular de Ca^{2+} mediante el transportador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1), conduciendo a una elevación intracelular de Ca^{2+} y, como consecuencia, a cambios funcionales (aumento de la reactividad vascular y de la PA) y estructurales mediados por la señalización del Ca^{2+} (Blaustein et al., 2009). Las consecuencias fisiológicas de la afectación de la isoforma predominante en el riñón (principal responsable de la regulación global del Na^+ citosólico y de la reabsorción renal de Na^+) no son tan claras ya que estos estudios no proporcionan datos de la función renal. Además, los inhibidores de la Na^+ , K^+ -ATPasa (ouabaina exógena o endógena) afectan más a la isoforma muscular que a la renal. Actualmente, inhibidores de la ouabaina endógena, están siendo investigados como nuevos agentes antihipertensivos (Ferrari, 2010).

En las SHR, la deficiencia vascular de NO es menos llamativa que en la HTA L-NAME, como sugieren los valores más altos de relajación máxima a ACh y por tanto, la respuesta de diuresis y natriuresis de presión está menos afectada, lo que unido a unos niveles mayores de presión, da lugar a que las ratas SHR retengan menos sodio que las L-NAME o incluso que sus valores sean algo inferiores a los controles.

De manera interesante, la mayoría de los tratamientos empleados en los animales L-NAME, disminuyen notoriamente la retención de sodio, especialmente la A y LBC. En cambio, en las SHR de seis semanas sólo el LBC y CPT presentan una mayor eliminación de sodio. Para las SHR de doce semanas, no hay efectos significativos positivos que comentar. Estos resultados presentan, en general, una gran consonancia con los datos de diuresis obtenidos y con la diuresis de presión. Los efectos beneficiosos de los tratamientos podrían ser como consecuencia de la mejoría de la relación entre vasoconstrictores y vasodilatadores. Además, la administración de polifenoles aunque diferentes a nuestros flavonoides, mejoran la

actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa mediante un mecanismo independiente de NO (Javorková et al., 2003).

Hematocrito

En el modelo de HTA L-NAME, los valores obtenidos de hematocrito para los animales sanos y enfermos, son prácticamente análogos en todos los grupos experimentales, mientras que para el modelo SHR, son mayores en los grupos hipertensos sin tratamiento. Las ratas SHR desarrollan eritrocitosis en comparación con las ratas normotensas. Además, el contenido de eritropoyetina también es más alto en las SHR e indetectable en las ratas normotensas, lo que sugiere una relación directa entre hipertensión y la eritrocitosis. Este incremento en el número de glóbulos rojos, va paralelo a los aumentos de peso corporal, presión arterial (Sen et al., 1972) y aumento de resistencia vascular periférica (Milanovic S, 2012).

También se ha demostrado que el incremento de la viscosidad sanguínea está en relación directa con la hipertensión esencial. La reducida vasodilatación observada en la rata SHR debida a la alteración de los mecanismos de vasoconstricción/vasodilatación y daños vasculares, conducen a una mayor sensibilidad para el cambio de la viscosidad sanguínea (Milanovic S, 2012).

Además de los efectos sobre la viscosidad sanguínea, los cambios en los valores del hematocrito pueden influir en la PA mediante de la inactivación de NO a través de un mecanismo de unión irreversible del NO vasodilatador al grupo hemo de la hemoglobina. Los valores altos de hematocrito, atenúan significativamente la vasodilatación inducida por ACh (Milanovic S, 2012).

La HTA está asociada con un aumento del hematocrito siendo la vasoconstricción mediada simpáticamente, la responsable de dicho aumento. La elevación del hematocrito, refleja una disminución en el volumen plasmático en la HTA, y se asocia con una hipertrofia cardíaca y enfermedad cardíaca coronaria, probablemente por el aumento de la viscosidad de la sangre (Amerena and Julius, 1995).

Los tratamientos no modifican estos valores excepto el COE y CPT en las SHR de 6 semanas. Estos dos grupos son los que muestran la mayor mejoría en la diuresis de presión y el descenso del hematocrito con estos tratamientos quizás esté reflejando una mejor regulación de la homeostasis de los líquidos corporales.

Hay evidencias que sugieren que los flavonoides ejercen una acción reguladora sobre la agregación eritrocitaria mediante un mecanismo en el cual la concentración eritrocitaria es reducida debido a que las células agrupadas son secuestradas y eliminadas de la circulación, pudiendo así, actuar contra el incremento de la permeabilidad capilar y la fragilidad. Se ha demostrado que los flavonoides que contienen grupos metoxilo muestran una alta actividad contra la agregación (más que los compuestos no metoxilados) e inhiben la tasa de sedimentación de eritrocitos (ESR) mientras que los glicósidos hidroxilados como la naringina (componente de GBC) aceleran la agregación y tienen una ESR mayor que los controles,

también se ha observado que algunos compuestos no sustituidos o hidroxilados como la apigenina (3-hidroxi-flavona) no mostraban actividad. Por otro lado, el efecto de la hesperidina (componente de LBC) sobre la ESR puede ser beneficioso, malo o carecer de efectos (Robbins, 1971), lo que es coincidente con nuestros resultados. En nuestro estudio, aunque hemos trabajado con flavonoides metoxilados, el porcentaje del compuesto mayoritario era muy superior.

5.3.3 Reactividad vascular

Máxima contracción a FE y máxima relajación a ACh

En cada uno de los modelos animales empleados, en lo referente a los efectos vasoconstrictores de la fenilefrina, hemos observado un patrón diferente. Los animales con HTA L-NAME sin tratamiento tienen una mayor respuesta que los controles a la misma dosis de FE, es decir, hay un desplazamiento de la curva de FE hacia la izquierda.

En cambio, el modelo SHR presenta un comportamiento totalmente opuesto al anterior. En este caso, los valores de la máxima contracción a FE en los grupos hipertensos son significativamente inferiores a los del grupo control normotenso. Por otro lado, se observa que la progresión de la enfermedad no potencia la respuesta al agonista α_1 -adrenérgico.

En la HTA L-NAME, el déficit de síntesis de NO endotelial junto a los cambios estructurales de la aorta torácica, inducidos por el tratamiento, podrían explicar la mayor respuesta vasoconstrictora a FE en los animales enfermos sin tratar. La escasez del NO se demuestra por la escasa respuesta vasorelajante a ACh de los animales hipertensos sin tratar, si bien, la abolición de la síntesis de NO no fue completa ya que la administración aguda de L-NAME disminuyó adicionalmente la respuesta a ACh. La menor relajación a ACh, parece exclusivamente debida al déficit de síntesis de NO y no a un defecto intrínseco del músculo liso, ya que la administración de nitroprusiato sódico (un dador de NO) produjo una relajación similar en todos los grupos experimentales. Dada la gran supresión de NO endotelial, quizás se esperaría una vasoconstricción a FE algo mayor a la observada. Pero es posible que otras sustancias de acción vasodilatadora (no inhibidas por L-NAME) intenten compensar el déficit de NO para preservar el tono vasomotor. Entre estas sustancias se encontrarían PGI₂, ETEs, EDHF, etc. ((Stankevicius et al., 2003); (Triggle et al., 2012); (Vapaatalo et al., 2000)). O bien, que el mecanismo de vasoconstricción sea modulado por citoquinas locales inducidas por los cambios inflamatorios que se producen en la pared de los vasos ((P O Iversen, 2000); (Vila and Salaices, 2005)) aumentando la producción de NO basal como consecuencia de la expresión incrementada de la iNOS en las células endoteliales, lo que da lugar a la disminución en la respuesta de la aorta a agentes contráctiles (Aires et al., 2013). Por otro lado, otras sustancias vasoactivas producidas por el endotelio, como por ejemplo la bradicinina, puede estimular la liberación de NO dando lugar a una menor respuesta a la FE (Cannon, 1998). Y también es posible que exista una adaptación en el número de receptores

alfa1-adrenérgicos “down-regulation” para modular la respuesta vasoconstrictora, dado el predominio de vasoconstrictores circulantes (SRAA, endotelina, SNS,...) existente en la HTA.

En los grupos **SHR** la liberación de NO endotelial mediada por ACh está menos afectada que en el grupo con HTA L-NAME, lo que refleja una mayor disponibilidad de NO para modular la respuesta a FE, lo que unido a las alteraciones de la vasoconstricción citadas antes puede explicar la menor contracción a FE in vitro de las SHR no tratadas. También es posible que en este modelo de HTA no estén alterados todos los mecanismos de liberación de NO. Así, además de la liberación por agonistas como ACh, hay una liberación basal de NO por el endotelio y además, durante la contracción, la FE puede inducir una liberación de NO endotelial a través de los receptores alfa1-adrenérgicos mediante un mecanismo dependiente de la fosforilación de la eNOS (Silva et al., 2014) y de los receptores de membrana endoteliales sensibles al estiramiento. En este sentido, la administración de L-NAME agudo revierte la menor respuesta a FE de los animales hipertensos SHR, lo que confirmaría este hecho. Por otro lado, la remodelación vascular que sufren las aortas de las SHR también podría explicar la menor respuesta a FE, conduciendo posiblemente a la rigidez del vaso in vivo y a una contractilidad reducida in vitro. Los factores implicados en esta menor respuesta a la contracción a FE en SHR respecto a la WKY parecen ser de origen genético ya que están presentes antes de la hipertensión y pueden contribuir a modificar la “compliance” aórtica y quizás la resistencia vascular en los animales hipertensos siendo la causa y no la consecuencia de la presión arterial (Gendron et al., 2004). Por tanto, aunque la liberación de NO por ACh sea defectuosa, más cuanto más severa sea la HTA de las SHR, los otros mecanismos de liberación de NO estarían menos afectados, al contrario que en la HTA L-NAME donde todos estarían afectados de forma similar, ya que la inhibición de NO es sistémica.

Por último, no debemos olvidar que los desajustes de los sistemas de regulación de la PA in vivo durante la HTA dan lugar a un predominio de los niveles circulantes y/o locales de vasoconstrictores que junto a los cambios estructurales de los vasos (disminución luz/pared) contribuyen al aumento de PA durante la HTA. Ni tampoco que la aorta es un vaso de conductancia y no de resistencia, y son, estos últimos, los principales responsables de la resistencia vascular del organismo y de la elevación de la PA. Por tanto, aunque estas alteraciones puedan ser similares, debemos interpretarlas con precaución.

Respecto al efecto de los diferentes tratamientos, en el modelo de HTA L-NAME, la respuesta vasoconstrictora a fenilefrina es similar en la mayoría de los grupos tratados y, excepto el tratamiento de la flavona A, presentan valores de contracción máxima inferiores al grupo hipertenso sin tratar (significativos para LBC y COE). Además, la A y el LBC presentan valores de ED50 similares a los de los animales controles. En resumen y dentro de las escasas diferencias, podemos resumir que en general los tratamientos tienden a acercar los valores al grupo control.

La menor respuesta a FE observada con los tratamientos podría explicarse por diversos mecanismos. En primer lugar, los flavonoides tienen efectos antioxidantes, que por un lado atenuarían los efectos vasoconstrictores de las EROs y sus productos (Quiñones et al., 2011) y por otro lado, podrían aumentar la vida media del NO. Nuestros resultados muestran que los tratamientos tienden a mejorar la respuesta a la ACh pero sin diferencias significativas. Esta ligera mejoría parece debida, en su mayor parte, al NO ya que la administración de L-NAME agudo bloqueó casi por completo la respuesta a ACh en los grupos hipertensos tratados, excepto en el caso de COE y A, que probablemente tienen mecanismos de modulación de la vasorelajación independientes de NO. Se ha demostrado que después de la inhibición con L-NAME, el tratamiento con apigenina no altera los niveles de la proteína eNOS y además induce una activación de la fosforilación de la eNOS en el residuo de serina 1179 con el consecuente incremento en la producción de NO, lo que es acorde con lo observado en nuestros resultados (Chen et al., 2010). En el caso del COE, se ha descrito que su componente (-)-epicatequina, reduce la vasoconstricción inducida por ACh en presencia de L-NAME e impide el aumento de la COX-2 (Gómez-Guzmán et al., 2011), sobreexpresada en la HTA L-NAME, por lo que inhibe la liberación de los metabolitos derivados de la COX (prostanoides vasoconstrictores tales como PGH₂ o TXA₂), aumentando así la vasorelajación.

Por tanto, la contribución de otras sustancias vasodilatadoras endoteliales liberadas por ACh (o agonistas similares) diferentes de NO parece escasa. Tampoco parece que los tratamientos aumenten la disponibilidad del NO liberado por la FE, puesto que la administración de L-NAME agudo no aumentó la máxima respuesta a FE, sino más bien todo lo contrario. Pero sí es posible, dada la restricción de NO impuesta por el L-NAME, que sustancias con acción vasodilatadora procedentes de otras capas de la pared vascular puedan contribuir a la menor respuesta a FE, por ejemplo, los flavonoides pueden incrementar la vasodilatación por acción directa sobre el músculo liso vascular mediante la inhibición de la proteína cinasa C (PKC) (Álvarez and Orallo, 2003), la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) de nucleótidos cíclicos y/o disminución de la absorción de calcio ((Herrera et al., 1996); (Aggio et al., 2013); (Cazarolli et al., 2008)) o bien que sean los propios flavonoides los que interactúen con procesos de señalización intracelular de la célula muscular lisa y/o endotelial, dado que pueden acumularse en los espacios entre ambos tipos celulares ((Ajay et al., 2007); (Chantal G. M Heijnen, 2000)). Aun así, desconocemos el mecanismo por el que la adición de L-NAME agudo pueda disminuir más la contracción a FE en este modelo de HTA. Una posibilidad es que el exceso de este inhibidor produzca un ajuste en la modulación de la vasoconstricción del músculo liso (sustancias vasodilatadoras, receptores, señalización intracelular,...). Otra posibilidad es que se haya dañado la preparación, pero esto no parece posible porque la respuesta a NPS (que se administra justo antes de concluir el experimento y, por tanto, en presencia de L-NAME 10⁻⁴ M) está preservada en todos los grupos experimentales.

Por otro lado, está descrito que la Ang II aumenta la sensibilidad a los simpaticomiméticos (Maeso et al., 1996) mediante diversos mecanismos. Así, varios estudios, in vivo e in vitro,

han demostrado que los IECA reducen la vasoconstricción inducida por agonistas adrenérgicos como la FE (Qiu et al., 1994). Dado que algunos de los flavonoides (A, LBC y COE), tienen un efecto IECA, cuya contribución al descenso de la PA describimos previamente, podemos sugerir que este efecto también contribuiría a explicar la menor contracción a FE de los grupos tratados. Además, este efecto IECA puede reducir otros efectos perjudiciales de la Ang II, como estimular la formación de EROs y disminuir la disponibilidad del NO, inducir cambios estructurales de la pared vascular, etc. Asimismo, los IECA pueden aumentar la vida media de la bradiquinina, ya que la ECA es la principal enzima encargada de su degradación ((Sivieri et al., 2007); (Tipnis et al., 2000)), mejorando así la vasodilatación dependiente de NO endotelial (Enseleit et al., 2003).

Por último, los cambios en el grosor de la aorta torácica podrían influir en la diferente respuesta vasoconstrictora a FE y de hecho parece haber una coherencia entre el grosor de su capa media y el grado de contracción a FE, ya que los grupos LBC y COE que presentan un descenso significativo del espesor de la pared aórtica son los que tuvieron una menor respuesta a FE. También observamos coherencia en el grupo tratado con Apigenina, que no afectó al grosor de esta arteria y presentó la máxima contracción a FE, pero nos resulta sorprendente dado que es el flavonoide que tiene en teoría las mayores propiedades antiinflamatorias (el orden de prioridad anti-inflamatorio sería: A > COE (siendo la catequina más potente que la epicatequina ya que su conversión es cinco veces más rápida) > las flavanonas LBC y GBC).

En los grupos SHR de seis y doce semanas, no hay efectos evidentes de que ninguno de los tratamientos mejore la respuesta del grupo hipertenso sin tratar, es más, el captopril produjo un descenso muy significativo de la respuesta a FE. Dado que el captopril es un IECA, este efecto será debido, de forma directa o indirecta, a la inhibición de la producción de Angiotensina II, y por tanto, disminuirá la sensibilidad a simpaticomiméticos y la formación de EROs y aumentará la disponibilidad de NO. Acorde con esto, nuestros resultados muestran que la administración de captopril disminuye los TBARS plasmáticos y en el tejido renal y aumenta los niveles plasmáticos y urinarios de nitritos. Además, el captopril aumenta la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, que en su mayor parte se debe a NO como lo demuestra la escasa vasorelajación en presencia de L-NAME. Del mismo modo, la menor respuesta a FE aumenta considerablemente tras la administración de L-NAME agudo, indicando que el NO contribuye a ella. Y por último, el captopril también normaliza e incluso aumenta la menor respuesta de los anillos aórticos a NPS, lo que revela que el efecto del IECA afecta al mecanismo de acción del NO en el músculo liso, actuando sobre la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y en la producción y/o actividad del GMPc (Ajay et al., 2007).

Todos estos efectos del captopril, contribuyen de forma evidente al descenso de la PA producida por este conocido fármaco y, aunque de una forma no tan llamativa, son similares a los ejercidos por los distintos flavonoides. Así, observamos que en este modelo de hipertensión espontánea, en general, los flavonoides no modifican la menor respuesta a FE

del grupo hipertenso sin tratar, ni a las 6 ni a las 12 semanas. Esta menor respuesta a FE desaparece tras la administración de L-NAME, indicando que el NO participa en ella. En este sentido, los grupos tratados con flavonoides aumentan, en general, la máxima respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, que en su mayor parte se debe a NO, como demuestra la escasez de relajación en presencia de L-NAME. También aumentan la relajación a NPS, lo que sugiere una mejoría en el mecanismo de señalización intracelular del NO, respecto a los animales con HTA sin tratamiento. Como hemos indicado antes, los flavonoides pueden ejercer un efecto vasodilatador en el músculo liso vascular aislado relacionado con la inhibición de la proteína cinasa C (PKC) (Álvarez and Orallo, 2003), la inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) de nucleótidos cíclicos y/o disminución de la absorción de calcio (Herrera et al., 1996).

A pesar de esta mejoría funcional tras los tratamientos, no se observan cambios estructurales en la aorta torácica de los animales SHR que los justifiquen, a diferencia del protocolo de L-NAME, aunque esto no descarta que pueda existir un beneficio en otros vasos de menor calibre. Así, se describe un descenso en el grosor de la capa media de la aorta abdominal en todos los grupos tratados de las SHR de 6 semanas pero no en las de 12 semanas, quizás por estar en una fase más avanzada.

En el grupo HTA L-NAME, vimos que excepto el tratamiento de la flavona A, los grupos tratados presentan valores de contracción máxima a FE inferiores al grupo hipertenso sin tratar, que son significativos para COE y LBC.

Los efectos del COE y LBC pueden ser debidos a su estructura que está formada por un grupo catecol en el anillo B, que inhiben la actividad de la ECA, enzima clave en el control de la PA. Además, el COE disminuye la actividad de la arginasa y aumenta la fosforilación de la eNOS, lo que aumentaría la disponibilidad de NO, si bien este último efecto no parece ser el más importante. En cambio, estructuralmente, la flavona A es uno de los flavonoides con la mayor actividad antiinflamatoria (Gerritsen et al., 1995). A nivel inflamatorio, se ha demostrado que la apigenina exhibe un efecto reversible sobre la expresión de proteínas de adhesión así como una inhibición del aumento de dichas proteínas a nivel transcripcional. La flavona A también inhibe la síntesis de prostaglandinas inducida por IL-1 y la producción de IL-6 y IL-8 inducida por TNF- α , pudiendo actuar por tanto, como inhibidor de la expresión génica inducida por citoquinas (Gerritsen et al., 1995), lo que daría lugar a una menor producción de sustancias vasodilatadoras y, por tanto, una menor posibilidad de modular las respuestas de vasoconstricción. La actividad antiinflamatoria de la apigenina también se debe a la inhibición de la activación transcripcional del factor NF- κ B (Funakoshi-Tago et al., 2011) el cual juega un importante papel en la regulación inducible de genes celulares inflamatorios (Choi et al., 2004). Además, la apigenina exhibe una alta afinidad por el receptor de TXA₂ que es un potente vasoconstrictor, uniéndose fuertemente a él (Guerrero et al., 2005), lo que podría contribuir a la mayor contracción de FE. También se sabe que la apigenina puede inhibir

factores de transcripción inducidos por LPS y suprimir la transcripción de genes de COX-2 y de iNOS (Liang et al., 1999).

Contrariamente, otros estudios han demostrado que la apigenina puede modular la contractilidad vascular de una manera agonista dependiente y el mecanismo implicado, parece ser no sólo dependiente de endotelio sino que también implica una inhibición de la vía de la señalización de la MAPK y de la actividad de la Rho-cinasa atenuando las contracciones vasculares ((Je et al., 2014); (Baek et al., 2009)). De cualquier modo, la respuesta máxima a FE del grupo tratado con A, no muestra diferencias significativas ni respecto al grupo control ni al L-NAME, con lo que esta interpretación debe tomarse con precaución.

Como comentamos antes, en los grupos SHR de seis y doce semanas, no hay efectos evidentes de ninguno de los tratamientos que tienen un comportamiento similar al del grupo hipertenso sin tratar, excepto el captopril que produjo un descenso muy significativo de la respuesta a FE.

Por otra parte, decíamos que se considera un efecto beneficioso del tratamiento la recuperación de las respuestas de los animales controles. En cambio, según los efectos que hemos descrito de los flavonoides, no resulta extraño e incluso parece lógico que los diferentes flavonoides no aumenten la respuesta a FE, tal y como ocurre en prácticamente todos los grupos tratados con flavonoides.

Estructuralmente, en el modelo de HTA L-NAME, destaca la importancia del grupo catecol (3,4-dihidroxi) en el anillo B que corresponde a los tratamientos LBC y COE que son los que presentan mayor eficacia. La presencia del grupo catecol o anillo B-dihidroxilado permite una rápida donación de hidrógeno (electrón) y así estabiliza las especies radicalarias (Engler and Engler, 2004), pudiendo la contractilidad ser menor.

Máxima relajación a acetilcolina endotelio-dependiente

En todos los grupos de hipertensión, los animales experimentales muestran relajaciones inferiores a los controles normotensos produciéndose el mayor descenso absoluto y relativo en el grupo con HTA L-NAME, seguido del SHR de 12 semanas y, por último, el de 6 semanas.

Los animales hipertensos SHR, presentan una relajación defectuosa tanto a ACh como a NPS. La primera puede ser debida a alteraciones en la producción o en la disponibilidad del NO. En este sentido, elevados niveles de EO podrían alterar las caveolas o producir un desacoplamiento de la eNOS traduciéndose en una menor síntesis de NO y mayor generación de EO (Cai and Harrison, 2000). Además, los productos del EO pueden secuestrar al NO disminuyendo su disponibilidad. De hecho, nuestros resultados demuestran, en general, unos niveles elevados de TBARS en las ratas hipertensas SHR, indicando su posible participación en esta alteración.

La diferencia en la respuesta observada entre ambos grupos SHR, puede ser debida a la edad puesto que se ha observado que la edad disminuye la relajación dependiente de endotelio inducida por la ACh (Küing and Lüscher, 1995). Y también, podría ser debida al mayor nivel de EROs, ya que los valores de TBARS son mayores para el grupo de doce semanas.

La menor relajación a NPS de las SHR sugiere alguna alteración funcional en la respuesta del músculo liso al NO y/o una alteración estructural del músculo liso, ya que la biodisponibilidad del NO está asegurada por el NPS, un donador de NO. Dado que los cambios estructurales de la aorta de las hipertensas SHR son de magnitud similar o inferior a los del grupo L-NAME, no parece probable que éstos contribuyan a esta alteración. Se ha descrito que la defectuosa repuesta del músculo liso al NO es debida a una “down-regulation” de la guanilatociclasa soluble que alteraría la adecuada producción de GMPc, lo que contribuiría a la menor vasorrelajación de los animales hipertensos (Ajay et al., 2006). Pero en también es posible que los niveles elevados de EO contribuyan a esta alteración funcional. En este sentido, el ONOO⁻ formado endógenamente de la reacción entre el NO[•] y el O₂^{-•}, es vasodilatador (McIntyre et al., 1997) y produce rápidamente taquifilaxia alterando así las respuestas vasorrelajantes siguientes. Dada su elevada reactividad, el ONOO⁻ puede producir oxidación y/o nitración de diferentes proteínas y enzimas (guanilatociclasa,...) y alterar así los mecanismos intracelulares implicados en la relajación del músculo liso vascular ((Benkuský et al., 1998); (Lewis et al., 2005); (Kooy and Lewis, 1996)).

Esto sería diferente en el grupo L-NAME, donde la formación de ONOO⁻ sería menor dada la mayor deficiencia de NO. El ONOO⁻ atraviesa las membranas celulares mediante canales aniónicos, causando oxidación de lípidos (lipoperóxidos), y aunque en este estudio no hemos determinado los niveles de ONOO⁻, en la HTA L-NAME no se produce una elevación significativa de los TBARS, un indicador de los niveles lipoperóxidos. Esto podría explicar la diferente respuesta al NPS que presentan las ratas tratadas con L-NAME, pero no descarta que otras EROs, diferentes del ONOO⁻, participen en las alteraciones de la reactividad vascular de este modelo de HTA. De hecho, el NO puede considerarse un antioxidante al reaccionar e inactivar o disminuir la actividad de algunas EROs.

En los tres casos, la mayoría de los tratamientos mostraron una mejora de las relajaciones siendo significativos los efectos de los tratamientos A, LBC y GBC en las SHR 6 semanas y la A en las de doce semanas. En este modelo de HTA, es la flavona A la que muestra una mayor eficacia. En el grupo L-NAME, aunque los aumentos no son significativas, son los tratamientos A, seguido de LBC y COE, los más efectivos.

En el caso del grupo L-NAME, según los datos obtenidos para la máxima relajación a ACh, se demuestra que los elementos estructurales más importantes son un grupo OH en la posición 4', un doble enlace entre C2 y C3 y un grupo C=O en C4 (tratamiento A), siguiéndole en importancia el grupo catecol (3',4'-dihidroxi) correspondiente a los tratamientos LBC y COE que además era también el elemento estructural más eficaz para la máxima contracción a FE en este modelo de HTA. Recordemos que este elemento estructural, es el más antioxidante

y también es importante para la inhibición de la ECA. Para el grupo SHR de seis y doce semanas, en la máxima relajación, la mayor eficacia corresponde a un grupo hidroxilo en posición 4', doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y grupo carbonilo en C4 (flavona A).

Según otros estudios, uno de los componentes de COE ((-)-epicatequina), controla el tono vascular induciendo vasodilatación dependiente de endotelio mediada por NO (Gómez-Guzmán et al., 2011) a través de la activación de la eNOS (Ramírez-Sánchez et al., 2010). Este efecto se debe al aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular en el endotelio, el cual activa la eNOS mejorando así la producción de NO (Jiménez et al., 2012). La (-)-epicatequina *in vitro* induce la activación de la sintasa de NO endotelial (eNOS) a través de dos mecanismos: i) la fosforilación de la eNOS por participación de la vía de señalización de la fosfatidil-3-quinasa ii) activación de la vía quinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Además, la epicatequina eleva el NO en las células endoteliales mediante la inhibición del sistema NADPH oxidasa que es el principal generador de superóxido (Gómez-Guzmán et al., 2011).

Por otro lado, existen datos “*in vitro*” que confirman la capacidad que tienen la (-)-epicatequina y las procianidinas de actuar como agentes anti-inflamatorios (inhibición o expresión de la actividad de la isoforma iNOS) (Tuñón et al., 2009) pudiendo inhibir entre otros, el factor nuclear de transcripción kappa B (NF- κ B) con una alta especificidad (Fraga and Oteiza, 2011).

Por lo que se refiere a la catequina (que tiene la misma composición química que la epicatequina pero difiere en la orientación de uno de sus anillos), se ha observado que solamente es capaz de estimular parcialmente la producción de NO, por lo que se sugiere la presencia de un sistema receptor-efector de membrana celular en la epicatequina con una alta especificidad dado que la catequina sólo actúa como un agonista parcial débil (Ramírez-Sánchez et al., 2010).

Por otro lado, en ambos grupos SHR y L-NAME, la flavona A produce las mayores relajaciones siendo totalmente probable la participación de esta flavona en otros mecanismos adicionales de relajación que están directamente implicados en la regulación del NO endotelial. Parece ser que la A podría afectar a vías intracelulares de segundos mensajeros dando lugar a vasodilatación independiente y dependiente de endotelio (Zhang et al., 2000). Aunque el mecanismo vasodilatador de la apigenina no está claro, es probable que además del flujo y liberación de Ca^{2+} , el NO y GMPc participen en la relajación dependiente de endotelio (Zhang et al., 2000), mientras que la inhibición de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través tanto de los canales de calcio dependientes de voltaje como de los canales de calcio operados por receptor (Sui et al., 2011), y de la PKC (Calderone et al., 2004) en la célula muscular lisa, contribuirían a la relajación independiente de endotelio (Sui et al., 2011).

También se ha demostrado que los efectos vasorelajantes de esta flavona sobre los anillos de aorta torácica son debidos a la activación de canales de potasio de larga conductancia activados por calcio (canales BK). Este mecanismo de acción específica ha sido demostrado por estudios fisiológicos y funcionales (Testai et al., 2013) y se cree que contribuye en parte

a la acción vasodilatadora de la apigenina (Calderone et al., 2004) independiente de endotelio.

Otro de los posibles mecanismos vasorelajantes de las flavonas es aumentar la respuesta de relajación a ACh dependiente de endotelio por incremento de la expresión de la NOS (Machha and Mustafa, 2005). Además, se sabe que la activación de la eNOS dependiente de calcio inducida por la apigenina, está mediada principalmente vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K/Akt) y ocurre independientemente del contenido de la proteína eNOS, fosforilando a la misma en el residuo de serina 1179 con el consiguiente incremento de la producción de NO (Chen et al., 2010).

Como ya se ha comentado, el elemento estructural más importante de esta flavona, es la existencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 que otorga a la molécula una estructura molecular plana y posiblemente más activa en los mencionados mecanismos con una distribución molecular electrónica que permitiría el mantenimiento de una conjugación estructural del anillo B monohidroxilado con los anillos A y C. Recordemos que se trata de un elemento estructural clave en la inhibición de la ECA y los efectos indeseables inducidos por TXA₂.

Por tanto, en ambos modelos de HTA, la presencia del grupo carbonilo en conjugación con un doble enlace en posiciones 2 y 3 (flavona A), es muy importante para producir relajación vascular. En general, según estudios publicados en varios tipos de arterias (la mayoría de aorta torácica de rata), parece que el grupo 4-ceto podría ser suficiente para la acción vasodilatadora de los flavonoides (Mladenka et al., 2010)(152) junto con el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (Dong et al., 2009). De hecho, las flavonas son potentes vasodilatadores (Mladenka et al., 2010) en comparación por ejemplo, con los flavanoles (Duarte et al., 1993), lo cual es acorde con nuestros resultados. Otras características estructurales que podrían estar implicadas en la actividad vasodilatadora endotelio-dependiente son:

- 1) El patrón de hidroxilación en el anillo B;
- 2) La ausencia de un grupo de glicosilación aumenta enormemente el efecto de relajación (Dong et al., 2009).

Respecto a la modulación de la expresión de la eNOS, se ha demostrado que las principales características estructurales para la mejora de su actividad son:

- 1) La ausencia de la 3-O-glicosilación y 3-hidroxilación del anillo C;
- 2) Doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C;
- 3) Ausencia de 4'-O-metoxilación y presencia de 3'-hidroxilación en el anillo B;
- 4) Grupo carbonilo en el carbono 4 del anillo C; y

5) Ausencia de 7-O-glicosilación en el anillo A. Según estos criterios, la flavona A sería la que más se aproximaría (Martínez-Fernández et al., 2015).

Así, en un estudio realizado en células endoteliales de la vena umbilical humana en presencia de H₂O₂ (el cual se ha demostrado que altera la producción de la eNOS y la ET-1), se evaluaron flavonoides parecidos a los nuestros y con concentraciones fisiológicas de 1 μM, siendo la apigenina y los componentes del COE (catequina y epicatequina) los que mostraron los mayores incrementos en la expresión de la eNOS (Martínez-Fernández et al., 2015), lo cual es coincidente con nuestros resultados. Se demuestra así que las acciones vasorelajantes de los flavonoides son estructuralmente dependientes.

Por lo que se refiere a la relación entre reducción de la PA y mejora de la función endotelial, hay en la literatura opiniones diversas ya que la mejoría en las relajaciones dependientes de endotelio a ACh seguida de tratamientos antioxidantes puede estar asociada o bien con un cambio reducido en la PAM o bien con un cambio significativo en la PAM (Machha and Mustafa, 2005). En nuestro estudio, para el grupo de HTA L-NAME, la mejoría de la relajación va acompañada de un cambio significativo de la PAM mientras que para el modelo de hipertensión SHR, este cambio es más reducido.

Vasodilatación inhibida por L-NAME

La administración aguda de una dosis máxima de L-NAME a los anillos aórticos, antes de la realización de la curva de relajación a ACh, se realiza con la intención de averiguar qué parte de la relajación es debida a NO, ya que la ACh puede liberar otras sustancias vasodilatadoras endoteliales.

Nosotros observamos que el principal vasodilatador endotelial en los animales controles normotensos es el NO, ya que el L-NAME disminuye drásticamente la relajación inducida por ACh y lo hace en porcentajes similares en los tres grupos de HTA estudiados. Las ligeras diferencias, pueden ser debidas al tipo de rata que son distintas (SD, Wistar y WKY). En los grupos con HTA sin tratar, la dependencia del NO para esta relajación parece más llamativa, ya que el L-NAME prácticamente la suprime, sugiriendo que prácticamente ninguna sustancia diferente al NO participa de ella, a diferencia de los controles. De hecho, en los tres modelos de HTA, los animales hipertensos sin tratar siguen mostrando una disminución significativa de la relajación respecto a los controles normotensos tras la administración aguda de L-NAME. La pequeña capacidad de relajación vascular que todavía conservan, de acuerdo con la literatura (Vanheel and Van de Voorde, 2000), depende en gran medida de la capacidad de generar incluso, una determinada cantidad de NO endotelial (NO residual), aunque no podemos descartar completamente la participación de otras sustancias. En presencia de este inhibidor, la relajación residual dependiente de endotelio se atribuye a un tercer factor endotelial, el EDHF ((Seçilmiş et al., 2014); (Chauhan et al., 2003)).

Esta mayor dependencia al NO de la vasodilatación endotelio-dependiente de los grupos hipertensos sin tratar, tiene algunas consecuencias. Por una parte, la escasez de NO deja a

las sustancias vasoconstrictoras endoteliales (prostanoides derivados de la COX) ((Gómez-Guzmán et al., 2011); (Kalliovalkama et al., 1999) sin oposición y por otra, fisiológicamente, la unión de la ACh al músculo liso, produce vasoconstricción, lo que se ha demostrado en preparaciones vasculares in vitro en las que se ha eliminado el endotelio ((Furchgott, 1999); (Seçilmiş et al., 2014)) o en las que se inhibe la síntesis de NO con L-NAME ((Moncada, S et al., 1991); (Rees et al., 1990)). Según esto, tras la administración aguda de L-NAME, las sustancias endoteliales vasodilatadoras que queden, serían insuficientes para contrarrestar a las vasoconstrictoras, con lo que paradójicamente podremos ver una menor vasorelajación o incluso una vasoconstricción (en lugar de vasorelajación), a medida que se aumentan las dosis de ACh.

Este efecto paradójico de la ACh también lo observamos en los anillos de los grupos hipertensos no tratados con L-NAME agudo, aunque en este caso, como la presencia de NO es más elevada, la ACh produce una vasorelajación inicial mucho más evidente y las concentraciones de ACh que dejan de tener un efecto relajante son más elevadas.

Estos hallazgos ponen de manifiesto el ya conocido papel principal del NO en la regulación de la respuesta a vasoconstrictores, y deja entrever que aumentos, por pequeños que sean, en su disponibilidad, pueden tener repercusiones importantes en el tono vascular y, por tanto, en la PA.

En general, en la mayoría de los grupos tratados con flavonoides, el tratamiento de la aorta torácica con L-NAME, redujo considerablemente la relajación con ACh, lo que indicaría que el NO es el responsable de la mayor parte de los efectos de los flavonoides sobre la relajación dependiente de endotelio de estas arterias.

Cabe destacar los valores de los tratamientos A y COE, para el caso de la HTA L-NAME, en los que las respuestas vasodilatadoras a ACh son significativamente mayores que las del resto, en presencia de L-NAME agudo, sugiriendo que otros mecanismos independientes de NO endotelial, ya comentados previamente, contribuyen a ella, como la disminución de los metabolitos derivados de la COX (prostanoides vasoconstrictores tales como PGH₂ o TXA₂) (Gómez-Guzmán et al., 2011), o para el caso del tratamiento con la flavona A, la inhibición de los canales de Ca²⁺ tipo L y tipo T dependientes de voltaje en la aorta torácica (Jin et al., 2009) y la activación de los canales de potasio (Sui et al., 2011).

En los grupos SHR, la administración de L-NAME, anula cualquier relajación excepto la del grupo CPT. El captopril mejora la liberación de NO y de otras sustancias con acción vasodilatadora, aunque éstas en una proporción muy baja. Por tanto, parte de los efectos antihipertensivos de los tratamientos en el modelo de HTA SHR, son claramente endotelio dependientes mediados principalmente por una mejor disponibilidad de NO.

Relajación independiente de endotelio inducida por nitroprusiato de sodio

Los modelos de HTA SHR muestran un comportamiento similar que se caracteriza por una disminución de la relajación con NPS de los grupos no tratados vs los controles normotensos. Además se observa para el modelo SHR, que la respuesta vasodilatadora a NPS fue menor en el tratamiento de doce semanas, por lo que estos datos sugieren que la capacidad del músculo liso de responder a un dador exógeno de NO, empeora con la edad. En la HTA L-NAME, también se observa una menor relajación con NPS, aunque en una proporción mucho menor que las SHRs.

Como hemos comentado en apartados previos, la menor respuesta al dador de NO, NPS, de los grupos SHR con HTA puede ser debida a una “down-regulation” de la guanilato ciclasa soluble que alteraría la adecuada producción de GMPc (Ajay et al., 2006) y a los efectos derivados de la formación de peroxinitrito y otras especies reactivas de oxígeno ((Benkuský et al., 1998); (Lewis et al., 2005); (Kooy and Lewis, 1996)).

En la mayoría de los casos para los grupos SHR, los tratamientos consiguen mejorar las relajaciones a NPS de forma significativa, lo que podría tener relación con la mejora de la hipertensión provocada por estos tratamientos.

5.3.4 Estrés oxidativo

Recordemos que la técnica utilizada (TBARS) para el estudio del daño oxidativo, mide cuantitativamente la extensión de la peroxidación lipídica mediante la determinación de los niveles de malondialdehído (MDA) en materiales biológicos, el cual es la principal sustancia reactiva al TBA que era el (MDA) (Janero, 1990), generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos polinosaturados y también durante el metabolismo del ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandinas (Marnett, 1999). Aunque este ensayo tiene sus limitaciones, ya que no es específico un 100% (el TBA puede reaccionar con otros aldehídos) (Spickett et al., 2010) y no determina todos los productos derivados del estrés oxidativo, es una técnica ampliamente utilizada por numerosos estudios para estimar los niveles de estrés oxidativo en los diferentes fluidos biológicos.

TBARS plasmáticos, renales y urinarios

Para que resulte más sencilla la discusión de este parámetro, realizaremos una descripción conjunta de los TBARS de los diferentes tejidos, considerando los cambios como significativos si en al menos en dos de los tejidos se observan diferencias significativas.

En el grupo L-NAME no hay diferencias significativas de los valores de TBARS plasmáticos, renales y urinarios, entre los diferentes grupos experimentales.

En cambio, el modelo SHR, sí presenta un aumento del EO mostrando diferencias significativas los TBARS plasmáticos y urinarios de ambos grupos. Además, y al igual que ocurre con otros parámetros como la PA, el aumento es mayor en las SHR de mayor edad.

Aunque en el grupo L-NAME los TBARS no se modifican, no podemos descartar la participación del EO en las alteraciones observadas en este modelo experimental. Es posible que el déficit de NO dé lugar a la formación predominante de otros productos diferentes a los TBARS que no hemos podido determinar mediante nuestro método de medida. También es posible que la deficiencia de NO haga más susceptible a los diferentes tejidos al daño oxidativo, sin necesidad de que haya un aumento absoluto del estrés oxidativo. De hecho, el aumento de la peroxidación lipídica que conlleva el tratamiento con L-NAME parece ser la etapa inicial que se produce en el tejido haciéndolo más susceptible al daño oxidativo (Kumar S, 2010). O bien que la importancia del EO en la fisiopatología de la HTA sea distinta según el modelo de HTA, siendo mayor en el modelo de SHR.

Por el contrario, en otros estudios se observa un incremento en la producción de EROs en el modelo de HTA L-NAME, que está asociado a una sobreexpresión de la NADPH oxidasa y a la deficiencia en los niveles de enzimas antioxidantes como la SOD (Fu et al., 2011) el cual juega un papel importante como captador del anión superóxido. Las actividades de la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) también están reducidas en este modelo de HTA (Rajeshwari and Raja, 2015).

En las SHR de seis semanas los tratamientos, en general, no mostraron efectos muy llamativos a excepción del GBC y, sobre todo, el fármaco control CPT, cuyos efectos se pueden deber al actuar en una de las diversas etapas que condicionan la regulación del SRAA, como agente IECA que es.

Para el grupo de doce semanas, en cambio, los tratamientos producen descensos más acusados, siendo significativos en el caso de los tratamientos COE y D, seguidos de la flavona A.

La bibliografía nos indica que en la captación de ROO, el orden de eficacia (sin determinar el mecanismo de las familias de compuestos estudiados en esta memoria) sería teóricamente el siguiente: *Catequinas (flavan-3-ol)* > *Flavonas* > *Flavanonas*.

Estos resultados en el grupo SHR de doce semanas, confirman la mayor actividad de los compuestos flavan-3-ol al igual que ocurría en la PAS. En cuanto a la actividad antioxidante de flavonas y flavanonas, son más eficaces las estructuras con doble enlace entre los carbonos 2 y 3 (flavonas), sobre todo aquellas que muestran una disustitución en el anillo B (tratamiento D).

La mayor actividad de los flavan-3-ol (COE) es debida a las características estructurales que presenta: número de grupos hidroxilo (grupo catecol en el anillo B que estabiliza los radicales formados), también posee un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C que aumenta la capacidad antioxidante (Fraga, 2007). La estructura de 3',4'-catecol en el anillo B, es una de

las estructuras con mayor capacidad “antioxidante”, como tal, y aumenta considerablemente la inhibición de la peroxidación lipídica (Heim et al., 2002). Recordemos que este elemento estructural era en general, uno de los más importantes en la mayoría de los parámetros estudiados para este modelo de HTA.

Desde un punto de vista espacial, hay estudios que concuerdan con nuestros resultados, y que demuestran que la capacidad de captar radicales de los flavan-3-ol (tratamiento COE) está favorecida ya que estos compuestos con un grupo 3-hidroxilo son planares permitiendo así la conjugación, deslocalización electrónica y aumentando la estabilidad del radical flavonoide fenoxilo. Los grupos hidroxilo sobre el anillo B, forman enlaces por puentes de hidrógeno alineando el anillo B con el heterociclo y anillo A (Heim et al., 2002). Por otro lado, en el COE, la actividad antioxidante está incrementada por la polimerización de los monómeros de flavonoides como ocurre con las proantocianidinas, con una capacidad antioxidante más alta debido al mayor número de grupos OH ((J. Castillo, 2001); (Procházková et al., 2011)).

Las flavonas y flavononas que carecen de esta característica, muestran una conformación espacial angular entre los anillos A y B. Por tanto, la eliminación del grupo 3-OH anula la coplanaridad y conjugación comprometiendo así la capacidad captadora. Además la o-metilación puede provocar efectos estéricos que perturban la planaridad y la propia captación de radicales (Heim et al., 2002).

Fisiológicamente, (-)-epicatequina, (+)-catequina y procianidinas relacionadas, además de su conocida capacidad de unión a proteínas, podrían interaccionar con las membranas a través de enlaces de hidrógeno con el grupo polar de la cabeza de los fosfolípidos pudiéndose acumular en las superficies de la membrana tanto fuera como dentro de las células, creando así un entorno que limita el acceso de oxidantes a la bicapa y/o limita la propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres que se producen en la matriz hidrofóbica. Los grupos fenoles presentes en estos compuestos, también impiden la oxidación lipídica causada por iniciadores que actúan en la región hidrofóbica de la bicapa lipídica.

Estos flavanoles, por tanto, protegen la integridad de las membranas al impedir el acceso a moléculas perjudiciales para la región hidrofóbica de la bicapa, incluidas las que pueden afectar a la reología de la membrana y aquellas que inducen daño oxidativo a los componentes de la membrana (Verstraeten et al., 2003).

También se ha demostrado que (-)-epicatequina y el dímero B2, y en menor extensión el C1 impiden el incremento de la oxidación celular a través de la inhibición de procesos mediados por Ca^{2+} , cuyo exceso promueve la producción celular ROS principalmente a través de la activación de la NADPH oxidasa, en las células Jurkat T. Respecto al mecanismo de acción de la (-)-epicatequina, B2 y C1 por el cual impiden el incremento de $[Ca^{2+}]_i$, se especula que dada la capacidad que tienen estos compuestos de adherirse a membranas y proteínas, podrían interactuar principalmente con el espacio extracelular de la de la bicapa y regular los

componentes de la membrana que participan en la modulación del flujo de calcio, por ejemplo, los canales de calcio (Verstraeten et al., 2008).

Después, el siguiente tratamiento que presenta una mayor eficacia es el de la flavona apigenina. Hay evidencias que ponen de manifiesto que la regulación del consumo de oxígeno renal por NO está deteriorada en SHR y este deterioro es debido a una producción ineficaz de NO como resultado de la inactivación del mismo por superóxido (Adler and Huang, 2002). La xantina oxidada se considera una importante fuente biológica de radicales superóxido, especies que están implicadas en muchos procesos patológicos como por ejemplo inflamación y aterosclerosis. En la apigenina los grupos hidroxilo en C-5 y C-7 y doble enlace entre C-2 y C-3 son esenciales para una alta actividad inhibitoria de la xantina oxidasa ya que la estructura planar es importante para la inhibición de la xantina oxidasa. Al tener un doble enlace entre C-2 y C-3, el anillo B es coplanar con los anillos A y C debido a la conjugación. La saturación de este doble enlace, destruye la conjugación y coplanaridad. Por tanto, una estructura flavonoide planar es importante para la inhibición de la xantina oxidasa (Cos et al., 1998).

Por último, respecto al efecto del GBC observado en las SHR de seis semanas hay que decir que su componente mayoritario (naringina) es un fuerte antioxidante que capta y elimina radicales libres como por ejemplo el superóxido e hidroxilo e inhibe la actividad de la xantina oxidasa in vitro, previendo así la peroxidación lipídica (Alam et al., 2014).

En general, los flavonoides empleados en los diferentes tratamientos no son compuestos cuya estructura molecular les confiera grandes capacidades como captadores de radicales, ni siquiera "in vitro", tal vez, la única excepción sean las catequinas (COE) y en menor grado, la eriocitrina (LBC). El resto de flavonoides tienen otras potencialidades fisiológicas e incluso en el campo del EO cuya actividad se centraría más en las posibilidades como agentes epigenéticos (incremento de la expresión de enzimas de la fase II tales como SOD, GSH,...) o como inhibidores de enzimas prooxidantes de la ruta del ácido araquidónico.

5.3.5 Nitritos y proteínas

Nitritos

Al igual que hicimos para los TBARS, para que sea más sencilla la discusión, realizaremos una descripción conjunta de este parámetro en plasma y orina, considerando los cambios como significativos si en uno de los fluidos es significativo y en el otro, o es también significativo, o al menos va en la misma dirección.

En el modelo de HTA L-NAME, los niveles de nitritos de las ratas con HTA, fueron inferiores a los de los controles. En los grupos de tratamiento, sólo la A y la D consiguen producir una mayor producción de productos del metabolismo del NO.

El modelo de HTA SHR muestra un comportamiento análogo al del L-NAME aunque en este caso podemos hablar más de una tendencia que un descenso significativo. Por tanto, y acorde a la fisiopatología de ambos modelos de HTA, la reducción de la concentración de NO parece menor, para los grupos SHR que para el de L-NAME. Observamos que casi todos los tratamientos (a excepción de la flavona A en SHR de doce semanas) muestran una capacidad de normalización o aumento de los valores de nitritos siendo significativos los tratamientos con LBC, GBC y CPT del grupo SHR de seis semanas, mientras que para el grupo de doce semanas fue el tratamiento GBC.

Dado que en prácticamente todos los apartados de la discusión se ha hecho referencia a los niveles y/o disponibilidad del NO, sería redundante repetirlo todo de nuevo. Solamente añadiremos que al comparar los valores obtenidos para los nitritos urinarios con parámetros anteriores, se observa que la presencia del grupo catecol en el anillo B, es el elemento estructural más importante en el estudio de la mayoría de ellos.

Proteínas

En los dos modelos de HTA, los valores obtenidos de proteínas urinarias de los animales no tratados fueron superiores a los de los controles normotensos siendo significativo sólo en los grupos SHR.

Es sabido que el déficit crónico de NO suele producir una elevación de la presión arterial sistémica, un incremento de la presión capilar glomerular y una reducción del coeficiente de ultrafiltración. Estos cambios están asociados con la presencia de proteinuria y el desarrollo de glomeruloesclerosis (Klahr, 2001). Así, según nuestros resultados, el modelo de HTA L-NAME es el que presenta mayor deficiencia de NO y también el mayor daño estructural renal, seguido del grupo SHR de 12 semanas que presenta muy pocas alteraciones y del SHR de 6 semanas que no presenta ninguna. Este daño estructural consiste en la presencia de arteriopatía hialina y de cilindros tubulares. La lesión endotelial provocada por la hipertensión lleva al escape de componentes que circulan en el plasma y a la producción de matriz extracelular por las fibras musculares, dando lugar al depósito de una sustancia hialina. Esta acumulación de material en las paredes de las pequeñas arterias y arteriolas, hace que las paredes vasculares se vuelvan más gruesas y la luz disminuya (arteriopatía o arterioesclerosis hialina), causando trastornos isquémicos en órganos como el riñón y el corazón. Al final las células musculares lisas se necrosan, ocasionando una necrosis fibrinoide de la arteriola y del tejido parenquimatoso subsidiario. Los cilindros tubulares son debidos a la presencia de proteínas en los túbulos, lo que refleja una alterada permeabilidad de los glomérulos, o a restos celulares como consecuencia de la atrofia tubular (Fortepiani et al., 2003). En cualquier caso, las alteraciones estructurales renales que encontramos en nuestros animales con HTA L-NAME, son eminentemente vasculares. No se observó esclerosis o atrofia glomerular ni otra afectación glomerular relevante y en los túbulos sólo se apreció una atrofia tubular incipiente y focal con cilindros tubulares hialinos. Esto es diferente a un estudio previo en este mismo modelo de HTA (Fortepiani et al., 2003), en el que se halló una

proteinuria más elevada y significativa, pero las dosis empleadas de L-NAME también fueron mayores (40 mg/Kg/día) aunque durante menos tiempo (3 semanas).

En las SHR, la proteinuria no puede explicarse por las alteraciones estructurales renales valoradas en este estudio, ya que son prácticamente inexistentes. Pero es posible que sea una consecuencia de la elevada presión hidrostática glomerular junto a alteraciones funcionales intraglomerulares mediadas por sustancias paracrinas o sistémicas (angiotensina II, NO, endotelina, productos del EO, TXA2, PGs,...). Estas sustancias pueden afectar la permeabilidad de las células endoteliales y al estado de las células mesangiales intraglomerulares que tienen propiedades contráctiles, lo que alteraría la filtración glomerular afectando al coeficiente de filtración (Ardaillou et al., 1999).

De cualquier modo, otros autores sí han descrito un acúmulo tubulo-intersticial de linfocitos, macrófagos, células reactivas a angiotensina II, células que expresan la subunidad p65 del NFK-B y la activación renal del NFK-B (un factor de transcripción proinflamatorio) (Rodríguez-Iturbe et al., 2004). Estos cambios fueron progresivos y significativos desde el grupo SHR prehipertensivo de 3 semanas, grupo hipertenso SHR de 11 semanas y grupo de 24 semanas que obtuvo los valores más altos.

Como se ha visto, los tratamientos para los dos modelos de HTA, muestran en su mayoría valores inferiores al grupo hipertenso sin tratar, siendo el grupo SHR de doce semanas el que muestra los mayores descensos, con una tendencia de los tratamientos LBC y GBC a recuperar la normalidad. Por tanto, se trata de un efecto positivo ya que la menor excreción de proteínas a través de la orina, indicaría una reducción de daño renal.

En el grupo L-NAME, el comportamiento de A y LBC es destacable ya que muestran unos valores similares a los del grupo control. Por tanto, en este modelo de HTA es el grupo catecol en el anillo B el que presenta una mayor eficacia. Para el grupo SHR de seis semanas, al comparar con parámetros anteriores, la presencia del grupo catecol en el anillo B, es el elemento estructural más importante en el estudio de ambas presiones arteriales y en los TBARS, nitritos y proteínas urinarias mientras que para el grupo SHR de doce semanas, al igual que ocurría en la PAS, máxima relajación a NPS y TBARS, la presencia del grupo catecol en el anillo B es el elemento estructural más importante.

5.3.6 Histología

El aumento de la resistencia vascular periférica que es característico de la HTA en animales y humanos, es debido en gran parte a alteraciones estructurales y funcionales de los vasos de resistencia. Un engrosamiento de la pared, junto con una reducción de la luz del vaso con la consecuente menor relación luz/pared, pueden jugar un papel importante en la vasoconstricción periférica y también puede ser una respuesta adaptativa al aumento de la carga hemodinámica (Rizzoni et al., 2003) que además produce cambios estructurales en corazón. Por esta razón, nos propusimos evaluar el daño del tejido cardiovascular y renal.

El grosor del tabique interventricular y los espesores de las paredes medias de las aortas torácica y abdominal fueron significativamente mayores en los grupos L-NAME y SHR de seis semanas sin tratar con respecto a los controles normotensos, lo que es característico de la hipertensión arterial, produciéndose una hipertrofia mayor en la HTA L-NAME. En el grupo SHR de doce semanas no se observó un aumento significativo de estos parámetros, lo que puede ser debido a la mayor edad de los animales. Parece que con la edad hay un aumento de la rigidez de la pared aórtica en las SHR que no puede ser explicado por un aumento adicional de la presión arterial o un engrosamiento de la pared aórtica, fibrosis o elastocalcinosis. Esto sugiere que otros mecanismos de desorganización estructurales de la media que ocurren antes en las ratas hipertensas que en sus controles normotensos (por ejemplo, cambios en el número de conexiones de laminillas elásticas musculares o un aumento en la proporción de colágeno de tipo I a III o una acumulación de productos finales de la glicosilación avanzada), conducen a la alteración mecánica de la pared de la aorta de la rata SHR envejecida (Marque et al., 1999).

Todos los grupos tratados en el modelo de HTA L-NAME y SHR de seis semanas mostraron valores inferiores del grosor del tabique interventricular con respecto al grupo sin tratar siendo el descenso significativo en el caso del GBC y D para la HTA L-NAME y para el fármaco control CPT del grupo SHR de seis semanas. En el grupo de doce semanas, los valores prácticamente no se modifican. En el caso del L-NAME, también se observa que las flavonas (A, D) y flavanonas (GBC, LBC) muestran una mayor "capacidad" para influir en la "recuperación" de la hipertrofia del tabique interventricular que el COE. Estos efectos son muy probablemente debidos, entre otros, a la mejoría de las cifras de presión arterial que producen esos tratamientos.

En la HTA L-NAME, la inhibición de la NOS causa cambios estructurales en la pared de la aorta torácica como resultado del descenso de la producción de NO, siendo posible que la incontrolada proliferación vascular de las células lisas musculares lleve a una hiperplasia (Vardi, N. et al., 2003). También se sabe que la administración de L-NAME no afecta al diámetro interno de la aorta torácica pero incrementa el área de sección transversal y el espesor aórtico medio. Este cambio parece deberse principalmente al aumento de sustancia básica y al agua que pueden afectar a la elasticidad de la pared del vaso (Hlavačková et al., 2011). Estos cambios, pueden observarse también en las SHR que aunque no tengan un déficit de NO tan notorio, si tienen un predominio de sustancias vasoconstrictoras en su entorno como endotelina, angiotensina II, EO, etc. que los favorecerían (Lahera et al., 2000).

En el grupo L-NAME, se observan en general descensos significativos para la mayoría de los grupos tratados dándose las mayores reducciones en los tratamientos que contienen un grupo catecol (LBC, COE) en el caso de la aorta torácica que tienen un importante efecto IECA. La epicatequina (COE) y eriocitrina (LBC), reducen los niveles aórticos de superóxido inhibiendo también la expresión vascular de estos marcadores proinflamatorios y proaterogénicos (Gómez-Guzmán et al., 2011). Por otro lado, hay un cambio de preferencia para el caso de la aorta torácica ya que son los tratamientos formados por flavonas (A, D) con un doble enlace entre los

carbonos 2 y 3 y grupo hidroxilo en posición 4' las cuales consiguen recuperar los valores de los normotensos, dadas sus acciones como IECAs y antioxidantes.

En el modelo de HTA SHR de seis semanas, sólo se producen descensos significativos en el caso de la aorta abdominal y para todos los tratamientos en el que se confirma la potencial actividad del grupo catecol. Y en el grupo de doce semanas, no hay efectos significativos que comentar ya que todos los tratamientos presentan valores superiores a los del animal no tratado.

De forma similar al tejido renal, la arteriopatía hialina y la necrosis fibrinoide de las arteriolas intramiocárdicas, dan lugar a isquemia y a zonas de infartos en el tejido miocárdico, presentes en el grupo con HTA L-NAME. A estos cambios producidos directamente por el efecto de la elevada PA en el endotelio se unen los cambios estructurales inducidos por sustancias cuyos efectos son, en condiciones fisiológicas, contrarrestados mayormente por el NO. Entre estas sustancias destaca la angiotensina II, capaz de producir efectos directamente o indirectamente a través de sustancias como la endotelina y productos derivados del EO. Estos efectos son mediados por el receptor AT1 y entre ellos destacamos: efectos sobre el crecimiento celular, la proliferación de células musculares lisas, la síntesis proteica (colágeno), la respuesta inflamatoria, el EO, la NOS y la endotelina-1, que propician una hipertrofia y remodelado cardíaco y vascular ((Lahera et al., 2000); (Atlas, 2007); (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008)). Aunque no apreciamos diferencias significativas, los tratamientos tienden a mejorar varios de los parámetros miocárdicos evaluados como la presencia de arteriopatía hialina y necrosis fibrinoide y el número de infartos, y, en general, el daño vascular conjunto cardíaco y renal. Esta mejoría será debida a las diversas propiedades de los flavonoides que se han ido describiendo a lo largo de esta discusión y que podemos resumir en sus efectos como IECAs, antioxidantes, antiinflamatorios y mejora de la producción y/o biodisponibilidad de NO.

6.1 Conclusiones generales

La investigación desarrollada permite extraer las siguientes conclusiones generales:

- Los tratamientos utilizados reducen la presión arterial y la proteinuria, mejorando la disfunción endotelial, la excreción renal de sodio y biodisponibilidad de NO, aunque con un grado de efectividad inferior si se compara con el fármaco control Captopril.
- En relación con la presión arterial, el mejor tratamiento es el que corresponde al extracto de pomelo para el modelo L-NAME y también para el SHR de 6 semanas junto con el fármaco control Captopril.
- En relación con la función renal, el mejor tratamiento es el extracto de cacao para el grupo L-NAME y Captopril para el grupo SHR de 6 semanas con relación a la diuresis. En función del balance de sodio, los tratamientos más beneficiosos son el extracto de limón y Captopril para el grupo SHR de seis semanas.
- En relación con la función vascular, el mejor tratamiento es el extracto de limón para el modelo de HTA L-NAME en la máxima contracción a Fenilefrina. En referencia a la máxima relajación a Acetilcolina (ACh), es la flavona apigenina el tratamiento más beneficioso para el modelo de HTA SHR. Por último, en la máxima relajación a NPS, el tratamiento más beneficioso corresponde a la flavona apigenina para el modelo de HTA L-NAME, mientras que para el SHR de seis semanas corresponde al extracto de cacao y Captopril, y para el de tratamiento doce semanas, a la apigenina y al extracto de pomelo.
- Teniendo en cuenta lo anterior, se concluye que el mejor tratamiento de forma global es el que corresponde a la flavona apigenina.
- Los efectos beneficiosos son parcialmente debidos a la mejora de la función vasodilatadora, dependiente del endotelio y del NO. Sin embargo, no está claro el mecanismo a través del cual los flavonoides pueden modificar el metabolismo del óxido nítrico.

- A nivel estructural, los efectos más beneficiosos para el modelo de HTA L-NAME son las flavanonas y los flavanoles, mientras que para el modelo SHR son los flavanoles.
- Nuestros datos parecen indicar la existencia de una relación directa entre la estructura química de estos compuestos y su actividad biológica.
- Las dosis utilizadas, aunque son las recomendadas para la HTA en humanos, tal vez son pequeñas para las ratas de experimentación, ya que en general estas especies necesitan dosis mayores para ver un efecto similar al observado en humanos.

En general, los resultados obtenidos confirman el efecto beneficioso de los flavonoides sobre la función endotelial en ratas hipertensas, aunque se deberían realizar estudios adicionales que validen su eficacia en pacientes hipertensos.

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J.I., Keen, C.L., Fraga, C.G., 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett.* 555, 597–600.
- Adler, S., Huang, H., 2002. Impaired regulation of renal oxygen consumption in spontaneously hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13, 1788–1794.
- Aggio, A., Grassi, D., Onori, E., D'Alessandro, A., Masedu, F., Valenti, M., Ferri, C., 2013. Endothelium/nitric oxide mechanism mediates vasorelaxation and counteracts vasoconstriction induced by low concentration of flavanols. *Eur. J. Nutr.* 52, 263–272. doi:10.1007/s00394-012-0320-x
- Agrawal, A.D., 2011. Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 4, 1394–1398.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M., 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* 18, 75–81.
- Aires, R.D., Capettini, L.S.A., Silva, J.F., Rodrigues-Machado, M. da G., Pinho, V., Teixeira, M.M., Cortes, S.F., Lemos, V.S., 2013. Paraquat poisoning induces TNF- α -dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. *PLoS One* 8, e73562. doi:10.1371/journal.pone.0073562
- Ajay, M., Achike, F.I., Mustafa, A.M., Mustafa, M.R., 2006. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 345–350. doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04373.x
- Ajay, M., Achike, F.I., Mustafa, M.R., 2007. Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 55, 385–391. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.007
- Akaike, T., Maeda, H., 2000. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101, 300–308.
- Akhlaghi, M., Bandy, B., 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 309–317. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.12.003
- Akpononu, B.E., Mulrow, P.J., Hoffman, E.A., 1996. Secondary hypertension: evaluation and treatment. *Dis.-Mon.* DM 42, 609–722.
- Alam, M.A., Subhan, N., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Reza, H.M., Sarker, S.D., 2014. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv. Nutr. Bethesda Md* 5, 404–417. doi:10.3945/an.113.005603
- Alcasena, M S, Martínez, J, Romero, J, 1998. Hipertensión arterial sistémica: Fisiopatología. *An. Sis San Navar.* 21 Suppl 1, 7–18.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593–615.
- Alfieri, A.B., 2003. Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. *Vitae Acad. Bioméd. Digit.* 1–57.
- Alper, A.B., Jr, Chen, W., Yau, L., Srinivasan, S.R., Berenson, G.S., Hamm, L.L., 2005. Childhood uric acid predicts adult blood pressure: the Bogalusa Heart Study. *Hypertension* 45, 34–38. doi:10.1161/01.HYP.0000150783.79172.bb

- Álvarez, E., Orallo, F., 2003. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Offarm Ámbito Farm.* 22, 102–110.
- Amerena, J., Julius, S., 1995. The role of the autonomic nervous system in hypertension. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 18, 99–110.
- Ananth, P.H., Khan, S., Chandrasekhar, R., Ibrahim, M., 2012. Development of Validated HPTLC Method for Simultaneous Qualification of Rutin and Quercetin from Bark of *Anogeissus Latifolia*. *Int. J. Pharm.* 2, 33–38.
- Andriantsitohaina, R., Auger, C., Chataigneau, T., Étienne-Selloum, N., Li, H., Martínez, M.C., Schini-Kerth, V.B., Laher, I., 2012. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br. J. Nutr.* 108, 1532–1549. doi:10.1017/S0007114512003406
- Aoi, W., Niisato, N., Miyazaki, H., Marunaka, Y., 2004. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 892–896. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.150
- Aoi, W., Niisato, N., Sawabe, Y., Miyazaki, H., Tokuda, S., Nishio, K., Yoshikawa, T., Marunaka, Y., 2007. Abnormal expression of ENaC and SGK1 mRNA induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitively hypertensive rats. *Cell Biol. Int.* 31, 1288–1291. doi:10.1016/j.cellbi.2007.03.036
- Ardaillou, R., Chansel, D., Chatziantoniou, C., Dussaule, J.C., 1999. Mesangial AT1 receptors: expression, signaling, and regulation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10 Suppl 11, S40–46.
- Atlas, S.A., 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm. JMCP* 13, 9–20.
- Atucha, N M, Ramírez, A M, Pérez, M C, Martínez, C, Sánchez, A, Quesada, T, García-Estañ, J, 1994. Papel del óxido nítrico en las alteraciones renales de la cirrosis hepática. *NEFROLOGIA* 14, 651–655.
- Bachmann, S., Mundel, P., 1994. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 24, 112–129.
- Bader, M., Zhao, Y., Sander, M., Lee, M.A., Bachmann, J., Böhm, M., Djavidani, B., Peters, J., Mullins, J.J., Ganten, D., 1992. Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)27 rats. *Hypertension* 19, 681–686.
- Badyal, D K, Lata, H, Dadhich, A P, 2003. ANIMAL MODELS OF HYPERTENSION AND EFFECT OF DRUGS. *Indian J. Pharmacol.* 35, 349–362.
- Baek, I., Jeon, S.B., Song, M.-J., Yang, E., Sohn, U.D., Kim, I.K., 2009. Flavone Attenuates Vascular Contractions by Inhibiting RhoA/Rho Kinase Pathway. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 13, 201–207. doi:10.4196/kjpp.2009.13.3.201
- Bähr, A., Wolf, E., 2012. Domestic animal models for biomedical research. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 47 Suppl 4, 59–71. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02056.x
- Ballester, I., Camuesco, D., Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Zarzuelo, A., 2006. Flavonoides and Inflammatory bowel disease. *Ars Pharm.* 47, 5–21.
- Banegas, J.R., Rodríguez-Artalejo, F., de la Cruz Troca, J.J., Guallar-Castillón, P., del Rey Calero, J., 1998. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension* 32, 998–1002.
- Bartunek, J., Weinberg, E.O., Tajima, M., Rohrbach, S., Katz, S.E., Douglas, P.S., Lorell, B.H., 2000. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 101, 423–429.
- Bartzatt, R., Bartlett, M., Handler, N., 2013. Detection and Quantitative Analysis for 2-Thiobarbituric Acid Utilizing Uv-Visible Spectrophotometer. *Am. J. Pharmacol. Sci.* 1, 10–14. doi:10.12691/ajps-1-1-3

- Bedard, K., Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
- Benavente-García, O., Castillo, J., 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6185–6205. doi:10.1021/jf8006568
- Benavente-García, O., Castillo, J., Alcaraz, M., Vicente, V., Del Río, J.A., Ortuño, A., 2007. Beneficial action of Citrus flavonoids on multiple cancer-related biological pathways. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 795–809.
- Bencze, M., Behuliak, M., Zicha, J., 2013. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 62, 471–478.
- Benkusky, N.A., Lewis, S.J., Kooy, N.W., 1998. Attenuation of vascular relaxation after development of tachyphylaxis to peroxynitrite in vivo. *Am. J. Physiol.* 275, H501–508.
- Berger, M.E., Golub, M.S., Chang, C.T., al-Kharouf, J.A., Nyby, M.D., Hori, M., Brickman, A.S., Tuck, M.L., 1992. Flavonoid potentiation of contractile responses in rat blood vessels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 78–83.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. *Biochemistry* 5th Edition. New York.
- Bernatova, I., 2014. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *BioMed Res. Int.* 2014, 598271. doi:10.1155/2014/598271
- Berry, C., Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Magill, F.G., Berg, G.A., McMurray, J.J., Dominicczak, A.F., 2000. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation* 101, 2206–2212.
- Biancardi, V.C., Bergamaschi, C.T., Lopes, O.U., Campos, R.R., 2007. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 40, 401–408.
- Biel, M., Sautter, A., Ludwig, A., Hofmann, F., Zong, X., 1998. Cyclic nucleotide-gated channels--mediators of NO:cGMP-regulated processes. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358, 140–144.
- Blann, A.D., Nadar, S., Lip, G.Y.H., 2003. Pharmacological modulation of platelet function in hypertension. *Hypertension* 42, 1–7. doi:10.1161/01.HYP.0000077901.84467.E1
- Blaustein, M.P., Zhang, J., Chen, L., Song, H., Raina, H., Kinsey, S.P., Izuka, M., Iwamoto, T., Kotlikoff, M.I., Lingrel, J.B., Philipson, K.D., Wier, W.G., Hamlyn, J.M., 2009. The pump, the exchanger, and endogenous ouabain: signaling mechanisms that link salt retention to hypertension. *Hypertension* 53, 291–298. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119974
- Boon, C.-M., Ng, M.-H., Choo, Y.-M., Mok, S.-L., 2013. Super, red palm and palm oleins improve the blood pressure, heart size, aortic media thickness and lipid profile in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One* 8, e55908. doi:10.1371/journal.pone.0055908
- Bourassa, E.A., Fang, X., Li, X., Sved, A.F., Speth, R.C., 2010. AT₁ angiotensin II receptor and novel non-AT₁, non-AT₂ angiotensin II/III binding site in brainstem cardiovascular regulatory centers of the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 1359, 98–106. doi:10.1016/j.brainres.2010.08.081
- Brigelius-Flohé, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951–965.
- Briones, A.M., González, J.M., Somoza, B., Giraldo, J., Daly, C.J., Vila, E., González, M.C., McGrath, J.C., Arribas, S.M., 2003. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J. Physiol.* 552, 185–195. doi:10.1113/jphysiol.2003.046904

- Bryant, C.E., Allcock, G.H., Warner, T.D., 1995. Comparison of effects of chronic and acute administration of NG-nitro-L-arginine methyl ester to the rat on inhibition of nitric oxide-mediated responses. *Br. J. Pharmacol.* 114, 1673–1679.
- Buñag, R.D., 1973. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.* 34, 279–282.
- Buñag, R.D., Butterfield, J., 1982. Tail-cuff blood pressure measurement without external preheating in awake rats. *Hypertension* 4, 898–903.
- Bund, S.J., Lee, R.M.K.W., 2003. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J. Vasc. Res.* 40, 547–557. doi:75678
- Busse, R, Mülsch, A, Fleming, I, Hecker, M, 1993. Mechanisms of Nitric Oxide Release From the Vascular Endothelium. *Circulation* 87 Suppl V, V–18–V–25.
- Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840–844.
- Calderone, V., Chericoni, S., Martinelli, C., Testai, L., Nardi, A., Morelli, I., Breschi, M.C., Martinotti, E., 2004. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370, 290–298. doi:10.1007/s00210-004-0964-z
- Camera, E., Picardo, M., 2002. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 781, 181–206.
- Cannon, R.O., 1998. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.* 44, 1809–1819.
- Cardillo, C., Panza, J.A., 1998. Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension. *Vasc. Med. Lond. Engl.* 3, 138–144.
- Carey, R.M., Siragy, H.M., 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.* 24, 261–271.
- Carretero, O.A., Oparil, S., 2000. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101, 329–335.
- Cassidy, A., O'Reilly, É.J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J.P., Curhan, G., Rimm, E.B., 2011. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 338–347. doi:10.3945/ajcn.110.006783
- Cazarolli, L.H., Zanatta, L., Alberton, E.H., Figueiredo, M.S.R.B., Folador, P., Damazio, R.G., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R.M.B., 2008. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 1429–1440.
- Centelles, J J, Esteban, C, Imperial, S, 2004. Óxido nítrico Un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *Offarm Ámbito Farm.* 23, 96–102.
- Chantal G. M Heijnen, G.R.M.M.H., 2000. The interaction of tea flavonoids with the NO-system: discrimination between good and bad NO. *Food Chem. - FOOD CHEM* 70, 365–370. doi:10.1016/S0308-8146(00)00105-9
- Chatterjee, A., Catravas, J.D., 2008. ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE (NO) AND ITS PATHOPHYSIOLOGIC REGULATION. *Vascul. Pharmacol.* 49, 134–140. doi:10.1016/j.vph.2008.06.008
- Chauhan, S., Rahman, A., Nilsson, H., Clapp, L., MacAllister, R., Ahluwalia, A., 2003. NO contributes to EDHF-like responses in rat small arteries: a role for NO stores. *Cardiovasc. Res.* 57, 207–216.
- Chen, C.-C., Ke, W.-H., Ceng, L.-H., Hsieh, C.-W., Wung, B.-S., 2010. Calcium- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin. *Life Sci.* 87, 743–749. doi:10.1016/j.lfs.2010.10.014

- Choi, J.-S., Choi, Y.-J., Park, S.-H., Kang, J.-S., Kang, Y.-H., 2004. Flavones mitigate tumor necrosis factor- α -induced adhesion molecule upregulation in cultured human endothelial cells: role of nuclear factor- κ B. *J. Nutr.* 134, 1013–1019.
- Chou, T.C., Yen, M.H., Li, C.Y., Ding, Y.A., 1998. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31, 643–648.
- Chung, D.-H., Kim, S.-H., Myung, N., Cho, K.J., Chang, M.-J., 2012. The antihypertensive effect of ethyl acetate extract of radish leaves in spontaneously hypertensive rats. *Nutr. Res. Pract.* 6, 308–314. doi:10.4162/nrp.2012.6.4.308
- Cienfuegos-Jovellanos, E., Quiñones, M. del M., Muguerza, B., Moulay, L., Miguel, M., Aleixandre, A., 2009. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6156–6162. doi:10.1021/jf804045b
- Coca Payeras, A., 2001. [Control of arterial pressure: aim for clinicians of any level of care]. *Rev. Clínica Esp.* 201, 299–301.
- Cody, V., Middleton, E., Harborne, J.B., 1986. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships : proceedings of a symposium held in Buffalo, New York, July 22-26, 1985. Liss.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, 71–76. doi:10.1021/np970237h
- Cowley, A.W., Jr, Mattson, D.L., Lu, S., Roman, R.J., 1995. The renal medulla and hypertension. *Hypertension* 25, 663–673.
- Crowley, S.D., Gurley, S.B., Herrera, M.J., Ruiz, P., Griffiths, R., Kumar, A.P., Kim, H.-S., Smithies, O., Le, T.H., Coffman, T.M., 2006. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17985–17990. doi:10.1073/pnas.0605545103
- Cuéllar Mata, P, Solís Martínez, M O, Sánchez Leyva, M C, García Nieto, R M, Arias Negrete, S, 2010. El óxido nítrico: una molécula biológica llena de contrastes. *Acta Univ.* 20, 24–33.
- Curin, Y., Andriantsitohaina, R., 2005. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol. Rep. PR* 57 Suppl, 97–107.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 343–356.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità* 43, 348–361.
- De Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., Unger, T., 2000. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 415–472.
- De Mello, W.C., 1994. Is an intracellular renin-angiotensin system involved in control of cell communication in heart? *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23, 640–646.
- Díaz-Juárez, J.A., Tenorio-López, F.A., Zarco-Olvera, G., Valle-Mondragón, L.D., Torres-Narváez, J.C., Pastelín-Hernández, G., 2009. Effect of Citrus paradisi extract and juice on arterial pressure both in vitro and in vivo. *Phytother. Res. PTR* 23, 948–954. doi:10.1002/ptr.2680
- Dickhout, J.G., Lee, R.M., 1998. Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 274, H794–800.
- Dickhout, J.G., Lee, R.M., 1997. Structural and functional analysis of small arteries from young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29, 781–789.
- Doggrell, S.A., Brown, L., 1998. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* 39, 89–105.

- Dong, X., Liu, T., Yan, J., Wu, P., Chen, J., Hu, Y., 2009. Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 716–726. doi:10.1016/j.bmc.2008.11.052
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87, E1–9.
- Dornas, W.C., Silva, M.E., 2011. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* 36, 731–737.
- Dosh, S.A., 2001. The diagnosis of essential and secondary hypertension in adults. *J. Fam. Pract.* 50, 707–712.
- Duarte, J., Galisteo, M., Ocete, M.A., Pérez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Tamargo, J., 2001. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 155–160.
- Duarte, J., Jiménez, R., O'Valle, F., Galisteo, M., Pérez-Palencia, R., Vargas, F., Pérez-Vizcaíno, F., Zarzuelo, A., Tamargo, J., 2002. Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J. Hypertens.* 20, 1843–1854.
- Duarte, J., Pérez Vizcaíno, F., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., Zarzuelo, A., 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 24, 857–862.
- Egert, S., Rimbach, G., 2011. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements? *Adv. Nutr. Bethesda Md* 2, 8–14. doi:10.3945/an.110.000026
- Elton, T.S., Sansom, S.E., Martin, M.M., 2010. Cardiovascular Disease, Single Nucleotide Polymorphisms; and the Renin Angiotensin System: Is There a MicroRNA Connection? *Int. J. Hypertens.* 2010. doi:10.4061/2010/281692
- Engler, M.B., Engler, M.M., 2004. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. *Nutr. Res.* 24, 695–706. doi:10.1016/j.nutres.2004.05.001
- Enseleit, F., Lüscher, T.F., Ruschitzka, F., 2003. Angiotensin-converting enzyme inhibition and endothelial dysfunction: focus on ramipril. *Eur. Heart J. Suppl.* 5, A31–A36. doi:10.1016/S1520-765X(03)90061-7
- Escobales, N., Crespo, M.J., 2005. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3, 231–246.
- Estrada-Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A.G., 2012. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Ment.* 35, 375–384.
- Féléto, M., Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291, H985–1002. doi:10.1152/ajpheart.00292.2006
- Fernández, M., García-Pagán, J.C., Casadevall, M., Bernadich, C., Piera, C., Whittle, B.J., Piqué, J.M., Bosch, J., Rodés, J., 1995. Evidence against a role for inducible nitric oxide synthase in the hyperdynamic circulation of portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 108, 1487–1495.
- Ferrari, P., 2010. Rostafuroxin: an ouabain-inhibitor counteracting specific forms of hypertension. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 1254–1258. doi:10.1016/j.bbadis.2010.01.009
- Filipe, P., Lança, V., Silva, J.N., Morlière, P., Santus, R., Fernandes, A., 2001. Flavonoids and urate antioxidant interplay in plasma oxidative stress. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 79–87.
- Fleming, I., Busse, R., 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1–12. doi:10.1152/ajpregu.00323.2002
- Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A., 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip. Toxicol.* 5, 47–58. doi:10.2478/v10102-012-0009-2

- Förstermann, U., 2010. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 459, 923–939. doi:10.1007/s00424-010-0808-2
- Fortepiani, L.A., Janvier, J.J., Ortíz, M.C., Atucha, N.M., García-Estañ, J., 1999a. Effect of endothelin blockade on pressure natriuresis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *J. Hypertens.* 17, 287–291.
- Fortepiani, L.A., Rodrigo, E., Ortíz, M.C., Cachofeiro, V., Atucha, N.M., Ruilope, L.M., Lahera, V., García-Estañ, J., 1999b. Pressure natriuresis in nitric oxide-deficient hypertensive rats: effect of antihypertensive treatments. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 21–27.
- Fortepiani, L.A., Ruiz, M.C.O., Passardi, F., Bentley, M.D., Garcia-Estan, J., Ritman, E.L., Romero, J.C., 2003. Effect of losartan on renal microvasculature during chronic inhibition of nitric oxide visualized by micro-CT. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285, F852–860. doi:10.1152/ajprenal.00120.2003
- Fraga, C.G., 2007. Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions. *IUBMB Life* 59, 308–315. doi:10.1080/15216540701230529
- Fraga, C.G., Litterio, M.C., Prince, P.D., Calabró, V., Piotrkowski, B., Galleano, M., 2011. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48, 63–67. doi:10.3164/jcbn.11-010FR
- Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2011. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 813–823. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.002
- Frank, J., 2008. Managing hypertension using combination therapy. *Am. Fam. Physician* 77, 1279–1286.
- Fuchs, L.C., Hoque, A.M., Clarke, N.L., 1998. Vascular and hemodynamic effects of behavioral stress in borderline hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am. J. Physiol.* 274, R375–382.
- Fu, J.-Y., Qian, L.-B., Zhu, L.-G., Liang, H.-T., Tan, Y.-N., Lu, H.-T., Lu, J.-F., Wang, H.-P., Xia, Q., 2011. Betulinic acid ameliorates endothelium-dependent relaxation in L-NAME-induced hypertensive rats by reducing oxidative stress. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 44, 385–391. doi:10.1016/j.ejps.2011.08.025
- Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T., Kasahara, T., 2011. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int. Immunopharmacol.* 11, 1150–1159. doi:10.1016/j.intimp.2011.03.012
- Furchgott, R.F., 1999. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Rep.* 19, 235–251.
- Galleano, M., Pechanova, O., Fraga, C.G., 2010. Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 837–848.
- Gálvez, J., Crespo, M.E., Jiménez, J., Suárez, A., Zarzuelo, A., 1993. Antidiarrhoeic activity of quercitrin in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 45, 157–159.
- Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Jiménez, J., Torres, M.I., Fernández, M.I., Núñez, M.C., Ríos, A., Gil, A., Zarzuelo, A., 1995. Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. *Planta Med.* 61, 302–306.
- Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 428010. doi:10.1155/2012/428010
- García-Estañ, J., Ortiz, M.C., O'Valle, F., Alcaraz, A., Navarro, E.G., Vargas, F., Evangelista, S., Atucha, N.M., 2006. Effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors in combination with diuretics on blood pressure and renal injury in nitric oxide-deficiency-induced hypertension in rats. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 110, 227–233. doi:10.1042/CS20050165
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 58, 537–552. doi:10.1007/s00011-009-0037-3

- Gendron, G., Gobeil, F., Morin, J., D'Orléans-Juste, P., Regoli, D., 2004. Contractile responses of aortae from WKY and SHR to vasoconstrictors. *Clin. Exp. Hypertens. N. Y. N* 1993 26, 511–523.
- Gerritsen, M.E., Carley, W.W., Ranges, G.E., Shen, C.P., Phan, S.A., Ligon, G.F., Perry, C.A., 1995. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am. J. Pathol.* 147, 278–292.
- Ghiadoni, L., Virdis, A., Magagna, A., Taddei, S., Salvetti, A., 2000. Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension* 35, 501–506.
- Giudicelli, J.F., Freslon, J.L., Richer, C., 1981. [Preventive effect of captopril on the development of genetic hypertension in SHR rats (author's transl)]. *Nouv. Presse Médicale* 10, 1547–1549.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., Mira, L., Corvo, M.L., 2008. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 15, 1586–1605.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Romero, M., O'Valle, F., Lopez-Sepulveda, R., Quintela, A.M., Galindo, P., Zarzuelo, M.J., Bailón, E., Delpón, E., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2011. Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats. *Br. J. Nutr.* 106, 1337–1348. doi:10.1017/S0007114511004314
- González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M.J., 2007. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr. Hosp. Organo Of. Soc. Esp. Nutr. Parenter. Enter.* 22, 287–293.
- Grassi, D., Aggio, A., Onori, L., Croce, G., Tiberti, S., Ferri, C., Ferri, L., Desideri, G., 2008. Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *J. Nutr.* 138, 1554S–1560S.
- Grassi, D., Desideri, G., Ferri, C., 2010. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients* 2, 889–902. doi:10.3390/nu2080889
- Grassi, G., 2010. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *Am. J. Hypertens.* 23, 1052–1060. doi:10.1038/ajh.2010.154
- Griffiths, M.J., Messent, M., MacAllister, R.J., Evans, T.W., 1993. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.* 110, 963–968.
- Gross, M., 2004. Flavonoids and Cardiovascular Disease. *Pharm. Biol.* 42, 21–35. doi:10.3109/13880200490893483
- Grossman, R.C., 2010. Experimental models of renal disease and the cardiovascular system. *Open Cardiovasc. Med. J.* 4, 257–264. doi:10.2174/1874192401004010257
- Gross, S.S., Stuehr, D.J., Aisaka, K., Jaffe, E.A., Levi, R., Griffith, O.W., 1990. Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170, 96–103.
- Guerrero, J.A., Lozano, M.L., Castillo, J., Benavente-García, O., Vicente, V., Rivera, J., 2005. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 369–376. doi:10.1111/j.1538-7836.2004.01099.x
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., Muguerza, B., 2012. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One* 7, e49493. doi:10.1371/journal.pone.0049493
- Guillermo Reglero, P.F., 2008. Meat-based functional foods for dietary equilibrium omega-6/omega-3. *Mol. Nutr. Amp Food Res.* 52, 1153–61. doi:10.1002/mnfr.200700367
- Gupta, V.K., Kumria, R., Garg, M., Gupta, M., 2010. Recent Updates on Free Radicals Scavenging Flavonoids: An Overview. *Asian J. Plant Sci.* 9, 108–117. doi:10.3923/ajps.2010.108.117
- Gutterman, D.D., 1999. Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am. J. Physiol.* 277, H1265–1272.

- Guyton, A.C., 1991. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science* 252, 1813–1816.
- Halbwirth, H., 2010. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 595–621. doi:10.3390/ijms11020595
- Hall, J.E., 1986. Regulation of glomerular filtration rate and sodium excretion by angiotensin II. *Fed. Proc.* 45, 1431–1437.
- Hammersen, F., Hammersen, E., 1984. Some structural aspects of precapillary vessels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6 Suppl 2, S289–303.
- Handy, R.L., Moore, P.K., 1998. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. *Neuropharmacology* 37, 37–43.
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1365–1402. doi:10.3390/ijms11041365
- Hansberg Torres, W., 2002. BIOLOGÍA DE LAS ESPECIES DE OXÍGENO REACTIVAS. *Mensaje Bioquímico XXVI*, 19–54.
- Hansen, E., Krautwald, M., Maczurek, A.E., Stuchbury, G., Fromm, P., Steele, M., Schulz, O., Garcia, O.B., Castillo, J., Körner, H., Münch, G., 2010. A versatile high throughput screening system for the simultaneous identification of anti-inflammatory and neuroprotective compounds. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 451–464. doi:10.3233/JAD-2010-1233
- Hasan, K., Heesen, B.J., Corbett, J.A., McDaniel, M.L., Chang, K., Allison, W., Wolffenbuttel, B.H., Williamson, J.R., Tilton, R.G., 1993. Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. *Eur. J. Pharmacol.* 249, 101–106.
- Hata, A., 1995. Role of angiotensinogen in the genetics of essential hypertension. *Life Sci.* 57, 2385–2395.
- Heagerty, A.M., Aalkjaer, C., Bund, S.J., Korsgaard, N., Mulvany, M.J., 1993. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 21, 391–397.
- Hegarty, V.M., May, H.M., Khaw, K.T., 2000. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1003–1007.
- Heijnen, C.G., Haenen, G.R., van Acker, F.A., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 2001. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 15, 3–6.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Heistad, D.D., 2006. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 689–695. doi:10.1161/01.ATV.0000203525.62147.28
- Henrion, D., Dechaux, E., Dowell, F.J., Maclour, J., Samuel, J.L., Lévy, B.I., Michel, J.B., 1997. Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2. *Br. J. Pharmacol.* 121, 83–90. doi:10.1038/sj.bjp.0701109
- Henrion, D., Dowell, F.J., Levy, B.I., Michel, J.B., 1996. In vitro alteration of aortic vascular reactivity in hypertension induced by chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 28, 361–366.
- Henrion, D., Kubis, N., Lévy, B.I., 2001. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension* 38, 1150–1157.
- Henry, R., Casto, R., Printz, M.P., 1990. Diurnal cardiovascular patterns in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* 16, 422–428.
- Hermansen, K., 2000. Diet, blood pressure and hypertension. *Br. J. Nutr.* 83 Suppl 1, S113–119.

Herrera, M.D., Zarzuelo, A., Jiménez, J., Marhuenda, E., Duarte, J., 1996. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 27, 273–277.

Hipertensión arterial sistémica - Monografias.com [WWW Document], n.d. URL <http://www.monografias.com/trabajos19/hipertension-arterial/hipertension-arterial.shtml> (accessed 9.11.13).

Hlavačková, L., Janegová, A., Uličná, O., Janega, P., Černá, A., Babál, P., 2011. Spice up the hypertension diet - curcumin and piperine prevent remodeling of aorta in experimental L-NAME induced hypertension. *Nutr. Metab.* 8, 72. doi:10.1186/1743-7075-8-72

Hollman, P., 2004. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharm. Biol. Former. Int. J. Pharmacogn.* 42, 74–83. doi:10.1080/13880200490893492

Hong, H.J., Hsiao, G., Cheng, T.H., Yen, M.H., 2001. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38, 1044–1048.

Hwang, S.-L., Shih, P.-H., Yen, G.-C., 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 60, 877–885. doi:10.1021/jf204452y

Intengan, H.D., Schiffrin, E.L., 2000. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36, 312–318.

Intengan, H.D., Thibault, G., Li, J.S., Schiffrin, E.L., 1999. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation* 100, 2267–2275.

Islas-Carbajal, M.C., Covarrubias, A., Grijalva, G., Alvarez-Rodríguez, A., Armendáriz-Borunda, J., Rincón-Sánchez, A.R., 2005. Nitric oxide synthases inhibition results in renal failure improvement in cirrhotic rats. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 25, 131–140. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01018.x

Jain, P.K., Kharya, M.D., Gajbhiye, A., Sara, U.V.S., Sharma, V.K., 2010. Flavonoids as nutraceuticals. A review. *Herba Pol.* 56, 105–118.

Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515–540.

Javorková, V., Pechánová, O., Andriantsitohaina, R., Vrbjar, N., 2003. Effect of polyphenolic compounds on the renal Na(+),K(+)-ATPase during the restoration of normotension after experimentally induced hypertension in rats. *Exp. Physiol.* 88, 475–482.

J. Castillo, O.B.-G., 2001. Radioprotective Effects Against Chromosomal Damage Induced in Human Lymphocytes by gamma-Rays as a Function of Polymerization Grade of Grape Seed Extracts. *J. Med. Food* 4, 117–123. doi:10.1089/109662001300341770

Je, H.D., Kim, H.-D., La, H.-O., 2014. The Inhibitory Effect of Apigenin on the Agonist-Induced Regulation of Vascular Contractility via Calcium Desensitization-Related Pathways. *Biomol. Ther.* 22, 100–105. doi:10.4062/biomolther.2014.012

Jiménez, R., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F., 2012. Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8823–8830. doi:10.1021/jf205370q

Jin, B., Qian, L., Chen, S., Li, J., Wang, H., Bruce, I.C., Lin, J., Xia, Q., 2009. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 616, 200–205. doi:10.1016/j.ejphar.2009.06.020

JNC 7, 2004. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute (US), Bethesda (MD).

Jover, B., Mimran, A., 2001. Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38 Suppl 2, S65–70.

- Judy, W.V., Farrell, S.K., 1979a. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1, 605–614.
- Judy, W.V., Farrell, S.K., 1979b. Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1, 605–614.
- Kalliovalkama, J., Jolma, P., Tolvanen, J.P., Kähönen, M., Hutri-Kähönen, N., Wu, X., Holm, P., Pörsti, I., 1999. Arterial function in nitric oxide-deficient hypertension: influence of long-term angiotensin II receptor antagonism. *Cardiovasc. Res.* 42, 773–782.
- Kaplan, N.M., 2007. Clinical trials for hypertension: expectations fulfilled and unfulfilled. *Hypertension* 49, 257–259. doi:10.1161/01.HYP.0000253034.35704.92
- Kasal, D.A.B., Schiffrin, E.L., 2012. Angiotensin II, Aldosterone, and Anti-Inflammatory Lymphocytes: Interplay and Therapeutic Opportunities. *Int. J. Hypertens.* 2012, 829786. doi:10.1155/2012/829786
- Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, T., Hagihara, K., Yamadori, T., Shima, Y., Ogata, A., Kawase, I., Tanaka, T., 2007. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol. Int. Off. J. Jpn. Soc. Allergol.* 56, 113–123. doi:10.2332/allergolint.R-06-135
- Kay, C.D., 2010. The future of flavonoid research. *Br. J. Nutr.* 104 Suppl 3, S91–95. doi:10.1017/S000711451000396X
- Kenney, M.J., Claassen, D.E., Bishop, M.R., Fels, R.J., 1998. Regulation of the sympathetic nerve discharge bursting pattern during heat stress. *Am. J. Physiol.* 275, R1992–2001.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H., 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Mol. Basel Switz.* 18, 2328–2375. doi:10.3390/molecules18022328
- Kiani, J., Imam, S.Z., 2007. Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs. *Nutr. J.* 6, 33. doi:10.1186/1475-2891-6-33
- Klahr, S., 2001. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* 16 Suppl 1, 60–62.
- Knight, S.F., Quigley, J.E., Yuan, J., Roy, S.S., Elmarakby, A., Imig, J.D., 2008. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 51, 352–359. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099499
- Kooy, N.W., Lewis, S.J., 1996. Nitrotyrosine attenuates the hemodynamic effects of adrenoceptor agonists in vivo: relevance to the pathophysiology of peroxynitrite. *Eur. J. Pharmacol.* 310, 155–161.
- Kovacsova, M., Barta, A., Parohova, J., Vrankova, S., Pechanova, O., 2010. Neuroprotective Mechanisms of Natural Polyphenolic Compounds. *Act. Nerv. Super. Rediviva* 52, 181–186.
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G., 2004. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 15–21.
- Kühnau, J., 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24, 117–191.
- Kumar S, S.K.M., 2010. Efficacy of piperine, an alkaloidal constituent of pepper on nitric oxide, antioxidants and lipid peroxidation markers in L-NAME induced hypertensive rats. *Int. J. Res. Pharm. Sci.*
- Küng, C.F., Lüscher, T.F., 1995. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension* 25, 194–200.
- Küng, C.F., Moreau, P., Takase, H., Lüscher, T.F., 1995. L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension* 26, 744–751.
- Kurtz, T.W., Griffin, K.A., Bidani, A.K., Davisson, R.L., Hall, J.E., Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research, 2005.

Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, e22–33. doi:10.1161/01.ATV.0000158419.98675.d7

Lahera, V., Navarro-Cid, J., Cachofeiro, V., García-Estañ, J., Ruilope, L.M., 1997. Nitric oxide, the kidney, and hypertension. *Am. J. Hypertens.* 10, 129–140.

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

Lerman, L.O., Chade, A.R., Sica, V., Napoli, C., 2005. Animal models of hypertension: an overview. *J. Lab. Clin. Med.* 146, 160–173. doi:10.1016/j.lab.2005.05.005

Lewis, S.J., Hoque, A., Walton, T.M., Kooy, N.W., 2005. Potential role of nitration and oxidation reactions in the effects of peroxynitrite on the function of beta-adrenoceptor sub-types in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 518, 187–194. doi:10.1016/j.ejphar.2005.06.027

Liang, Y.C., Huang, Y.T., Tsai, S.H., Lin-Shiau, S.Y., Chen, C.F., Lin, J.K., 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20, 1945–1952.

Lima, N.K.C., Abbasi, F., Lamendola, C., Reaven, G.M., 2009. Prevalence of insulin resistance and related risk factors for cardiovascular disease in patients with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 22, 106–111. doi:10.1038/ajh.2008.263

Link, A., Balaguer, F., Goel, A., 2010. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1771–1792. doi:10.1016/j.bcp.2010.06.036

Lira Ruan, V., Arredondo Peter, Raúl, 2004. Óxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. *Elementos* 11, 11–17.

Liu, F., Havens, J., Yu, Q., Wang, G., Davisson, R.L., Pickel, V.M., Iadecola, C., 2012. The link between angiotensin II-mediated anxiety and mood disorders with NADPH oxidase-induced oxidative stress. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 4, 28–35.

Lotito, S.B., Frei, B., 2006. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J. Biol. Chem.* 281, 37102–37110. doi:10.1074/jbc.M606804200

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Lum, H., Roebuck, K.A., 2001. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C719–741.

Lüscher, T.F., 2000. Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system. *Heart Br. Card. Soc.* 84 Suppl 1, i20–22:discussion i50.

Lüscher, T.F., Dohi, Y., Tschudi, M., 1992. Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 19 Suppl 5, S34–42.

Machha, A., Mustafa, M.R., 2005. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 46, 36–40.

Maeso, R., Navarro-Cid, J., Muñoz-García, R., Rodrigo, E., Ruilope, L.M., Lahera, V., Cachofeiro, V., 1996. Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension* 28, 967–972.

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

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Marín, R., de la Sierra, A., Armario, P., Campo, C., Banegas, J.R., Gorostidi, M., 2005. [2005 Spanish guidelines in diagnosis and treatment of arterial hypertension]. *Med. Clínica* 125, 24–34.
- Marnett, L.J., 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res.* 424, 83–95.
- Marque, V., Kieffer, P., Atkinson, J., Lartaud-Idjouadiene, I., 1999. Elastic properties and composition of the aortic wall in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34, 415–422.
- Mar Quiñones, D.S., 2011. Mechanisms for antihypertensive effect of CoccoanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Res. Int.* 44, 1203–1208. doi:10.1016/j.foodres.2010.10.032
- Martínez, A., 2005. FLAVONOIDES. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica, Medellín.
- Martínez-Fernández, L., Pons, Z., Margalef, M., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., 2015. Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *J. Nutr. Biochem.* 26, 277–284. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.003
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J., 2002. [Flavonoids: properties and anti-oxidizing action]. *Nutr. Hosp. Organo Of. Soc. Esp. Nutr. Parenter. Enter.* 17, 271–278.
- Martínez-Lemus, L.A., 2012. The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 5–11. doi:10.1111/j.1742-7843.2011.00813.x
- Martin, K.R., Christy, L.A., 2010. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutr. Diet. Suppl.* 2, 1–12. doi:http://dx.doi.org/10.2147/NDS.S6422
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595–603.
- McCarty, R., Horwatt, K., Konarska, M., 1988. Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc. Sci. Med.* 1982 26, 333–341.
- McIntyre, M., Hamilton, C.A., Rees, D.D., Reid, J.L., Dominiczak, A.F., 1997. Sex differences in the abundance of endothelial nitric oxide in a model of genetic hypertension. *Hypertension* 30, 1517–1524.
- McQuaid, K.E., Keenan, A.K., 1997. Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide? *Exp. Physiol.* 82, 369–376.
- Medina, F.S. de, Martínez-Agustín, O., 2004. Arginina, óxido nítrico y función endotelial. *Ars Pharm.* 45, 303–317.
- Meng, X., Munishkina, L.A., Fink, A.L., Uversky, V.N., 2010. Effects of Various Flavonoids on the α -Synuclein Fibrillation Process. *Park. Dis.* 2010. doi:10.4061/2010/650794
- Messerli, F.H., Williams, B., Ritz, E., 2007. Essential hypertension. *Lancet* 370, 591–603. doi:10.1016/S0140-6736(07)61299-9
- Michel, J.-B., Thaumat, O., Houard, X., Meilhac, O., Caligiuri, G., Nicoletti, A., 2007. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1259–1268. doi:10.1161/ATVBAHA.106.137851
- Middleton, E., Jr, Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751.
- Mifune, M., Sasamura, H., Shimizu-Hirota, R., Miyazaki, H., Saruta, T., 2000. Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 36, 845–850.

- Miguel, M., Muguerza, B., Sánchez, E., Delgado, M.A., Recio, I., Ramos, M., Aleixandre, M.A., 2005. Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br. J. Nutr.* 94, 36–43.
- Milanovic S, J.D., 2012. Chronic changes of hematocrit value alter blood pressure and glomerular filtration in spontaneously hypertensive rats. *Acta Vet. (Beogr.)* Vol. 62, Pp. 27–37. doi:10.2298/AVB1201027M
- Misko, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., Nickols, G.A., Corbett, J.A., Tilton, R.G., McDaniel, M.L., Williamson, J.R., Currie, M.G., 1993. Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur. J. Pharmacol.* 233, 119–125.
- Miyake, Y., Mochizuki, M., Okada, M., Hiramitsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T., 2007. Isolation of antioxidative phenolic glucosides from lemon juice and their suppressive effect on the expression of blood adhesion molecules. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1911–1919.
- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T., Hrdina, R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 963–975. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.010
- Molina, R., Guija, E., Ortega, M., García, L., González, A., Alguacil, P., Sorroche, J., Panero, P., Martí, J., Márquez, E., Moreno, F.L., Mayoral, E., Martín, E., Jiménez, E., García, E.I., Ureña, T., 2006. Manual de hipertensión arterial en la práctica clínica de atención primaria. Sociedad Andaluza de Medicina de Familia.
- Moncada, S., 1999. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J. R. Soc. Med.* 92, 164–169.
- Moncada, S, Higgs, E A, Hodson, H F, Knowles, R G, López-Jaramillo, P, McCall, T, Palmer, R M J, Radomski, M W, Rees, D D, Schulz, R, 1991. The L-Arginine: Nitric Oxide Pathway : Journal of Cardiovascular Pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 Suppl 3, S1–S9.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1988. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 12, 365–372.
- Montezano, A.C., Touyz, R.M., 2012. Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Ann. Med.* 44 Suppl 1, S2–16. doi:10.3109/07853890.2011.653393
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E., 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 20, 187–210. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.048
- Moore, W.M., Webber, R.K., Jerome, G.M., Tjoeng, F.S., Misko, T.P., Currie, M.G., 1994. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J. Med. Chem.* 37, 3886–3888.
- Morand, C., Dubray, C., Milenkovic, D., Lioger, D., Martin, J.F., Scalbert, A., Mazur, A., 2011. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 93, 73–80. doi:10.3945/ajcn.110.004945
- Moreau, P., Takase, H., Küng, C.F., Shaw, S., Lüscher, T.F., 1997. Blood Pressure and Vascular Effects of Endothelin Blockade in Chronic Nitric Oxide-Deficient Hypertension. *Hypertension* 29, 763–769. doi:10.1161/01.HYP.29.3.763
- Morgan, L., Broughton Pipkin, F., Kalsheker, N., 1996. Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28, 1211–1222.
- Mount, P.F., Power, D.A., 2006. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol.* 187, 433–446. doi:10.1111/j.1748-1716.2006.01582.x
- M. Quiñones, D.S., 2010. Long-term intake of CoccoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 122, 1013–1019. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.059
- Mulvihill, E.E., Huff, M.W., 2012. Protection from Metabolic Dysregulation, Obesity, and Atherosclerosis by Citrus Flavonoids: Activation of Hepatic PGC1 α -Mediated Fatty Acid Oxidation. *PPAR Res.* 2012, 857142. doi:10.1155/2012/857142

- Muscará, M.N., Wallace, J.L., 1999. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am. J. Physiol.* 276, G1313–1316.
- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2, 7. doi:10.1186/1475-2891-2-7
- Nava, E., Farré, A.L., Moreno, C., Casado, S., Moreau, P., Cosentino, F., Lüscher, T.F., 1998. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J. Hypertens.* 16, 609–615.
- Navar, L.G., Zou, L., Von Thun, A., Tarnag Wang, C., Imig, J.D., Mitchell, K.D., 1998. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 13, 170–176.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.
- Noris, M., Remuzzi, G., 1999. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in chronic renal disease. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111, 602–610.
- Noroozi, M., Burns, J., Crozier, A., Kelly, I.E., Lean, M.E., 2000. Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54, 143–149.
- Numaguchi, K., Egashira, K., Takemoto, M., Kadokami, T., Shimokawa, H., Sueishi, K., Takeshita, A., 1995. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension* 26, 957–962.
- Ochoa M, C.I., Ayala A, A.A., 2004. Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Rev. Ing. Compet.* 6, 93 – 104.
- Olano, Daniel, Obregón, Sebastián, Orias, Marcelo, Páez, Olga, Páez, Gustavo, 2012. Fisiología de la hipertensión arterial. Modelos experimentales en el control de la presión arterial.
- Ortiz Marrón, H., Vaamonde Martín, R.J., Zorrilla Torrás, B., Arrieta Blanco, F., Casado López, M., Medrano Albero, M.J., 2011. [Prevalence, degree of control and treatment of hypertension in the adult population of Madrid, Spain]. *Rev. Esp. Salud Pública* 85, 329–338. doi:10.1590/S1135-57272011000400002
- Ortiz, M.C., Fortepiani, L.A., Ruiz-Marcos, F.M., Atucha, N.M., García-Estañ, J., 1998. Role of AT1 receptors in the renal papillary effects of acute and chronic nitric oxide inhibition. *Am. J. Physiol.* 274, R760–766.
- Ortiz, M.C., Sanabria, E., Manriquez, M.C., Romero, J.C., Juncos, L.A., 2001. Role of endothelin and isoprostanes in slow pressor responses to angiotensin II. *Hypertension* 37, 505–510.
- Ortiz, P.A., Garvin, J.L., 2002. Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282, F777–784. doi:10.1152/ajprenal.00334.2001
- Oscar Rosas-Carrasco, A.G., 2003. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Med. Interna Mex.* 19, 221–42.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270–278. doi:10.4161/oxim.2.5.9498
- Papageorgiou, N., Tousoulis, D., Katsargyris, A., Charakida, M., Androulakis, E., Siasos, G., Tentolouris, C., Stefanadis, C., 2013. Antioxidant Treatment and Endothelial Dysfunction: Is it Time for Flavonoids? *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* 8, 81–92.
- Paredes, F., Clemente, A., 2005. Polifenoles de aplicación en farmacia. *Offarm Ámbito Farm.* 24, 68–74.
- Park, H.-H., Lee, S., Son, H.-Y., Park, S.-B., Kim, M.-S., Choi, E.-J., Singh, T.S.K., Ha, J.-H., Lee, M.-G., Kim, J.-E., Hyun, M.C., Kwon, T.K., Kim, Y.H., Kim, S.-H., 2008. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 31, 1303–1311. doi:10.1007/s12272-001-2110-5

- Patel, D., Shukla, S., Gupta, S., 2007. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int. J. Oncol.* 30, 233–245.
- Patel, J.M., 2008. A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergrad. Res. J.* 3.
- Pechánová, O., Dobesová, Z., Cejka, J., Kunes, J., Zicha, J., 2004. Vasoactive systems in L-NAME hypertension: the role of inducible nitric oxide synthase. *J. Hypertens.* 22, 167–173.
- Pechánová, O., Zicha, J., Kojsová, S., Dobesová, Z., Jendeková, L., Kunes, J., 2006. Effect of chronic N-acetylcysteine treatment on the development of spontaneous hypertension. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 110, 235–242. doi:10.1042/CS20050227
- Peotta, V.A., Vasquez, E.C., Meyrelles, S.S., 2001. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. *Hypertension* 38, 555–559.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., 2010. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 31, 478–494. doi:10.1016/j.mam.2010.09.002
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., Osuna, A., 2009. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol. Rep. PR* 61, 67–75.
- Phillips, M.I., 1987. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 49, 413–435. doi:10.1146/annurev.ph.49.030187.002213
- Pietta, P.-G., 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035–1042. doi:10.1021/np9904509
- Pintérová, M., Kuneš, J., Zicha, J., 2011. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 60, 381–402.
- Pinto, Y.M., Paul, M., Ganten, D., 1998. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc. Res.* 39, 77–88.
- P O Iversen, A.N., 2000. Human cytokines modulate arterial vascular tone via endothelial receptors. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* 439, 93–100. doi:10.1007/s004240051132
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1499–1503.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Psaty, B.M., Lumley, T., Furberg, C.D., Schellenbaum, G., Pahor, M., Alderman, M.H., Weiss, N.S., 2003. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 289, 2534–2544. doi:10.1001/jama.289.19.2534
- Puddu, P., Puddu, G.M., Zaca, F., Muscari, A., 2000. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol.* 55, 221–232.
- Qiu, C., Muchant, D., Beierwaltes, W.H., Racusen, L., Baylis, C., 1998. Evolution of Chronic Nitric Oxide Inhibition Hypertension Relationship to Renal Function. *Hypertension* 31, 21–26. doi:10.1161/01.HYP.31.1.21
- Qiu, H.Y., Henrion, D., Levy, B.I., 1994. Endogenous angiotensin II enhances phenylephrine-induced tone in hypertensive rats. *Hypertension* 24, 317–321.
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2013. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.* 68, 125–131. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.018
- Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2012. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr. Hosp. Organo Of. Soc. Esp. Nutr. Parenter. Enter.* 27, 76–89. doi:10.1590/S0212-16112012000100009

- Quiñones, M., Muguerza, B., Miguel, M., Aleixandre, A., 2011. Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 64, 478–481. doi:10.1016/j.phrs.2011.06.005
- Rad, Aria, 2006. Renin-angiotensin-aldosterone system [WWW Document]. URL http://en.wikipedia.org/wiki/File:Renin-angiotensin-aldosterone_system.png (accessed 6.6.15).
- Rajasekaran, A., Sivagnanam, G., Xavier, R., 2008. Nutraceuticals as therapeutic agents: A Review. *Res. J. Pharm. Technol.* 1, 328–340.
- Rajeshwari, T., Raja, B., 2015. D-carvone, a monoterpene reverses alterations in heart rate, nitric oxide, aortic lipids and enzymatic antioxidant status in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Int. Lett. Nat. Sci.*
- Raj, M., 2011. Essential hypertension in adolescents and children: Recent advances in causative mechanisms. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 15 Suppl 4, S367–373. doi:10.4103/2230-8210.86981
- Raj, N.K., Sipral, R.M., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 33, 2–16.
- Ramelet, A.A., 2001. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency. *Angiology* 52 Suppl 1, S49–56.
- Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., Villarreal, F., 2010. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* 55, 1398–1405. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147892
- Rao, M.S., 2010. Inhibition of the renin angiotensin aldosterone system: focus on aliskiren. *J. Assoc. Physicians India* 58, 102–108.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K., 2009. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 8, 229–235.
- Recek, C., 2004. The venous reflux. *Angiology* 55, 541–548.
- Redón, J., Oliva, M.R., Tormos, C., Giner, V., Chaves, J., Iradi, A., Sáez, G.T., 2003. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 41, 1096–1101. doi:10.1161/01.HYP.0000068370.21009.38
- Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., Moncada, S., 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 101, 746–752.
- Reid, J.J., Rand, M.J., 1992. Renal vasoconstriction is modulated by nitric oxide. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 376–379.
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J., Czarnocki, Z., 2003. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim. Pol.* 50, 1129–1146. doi:0350041129
- Rey, F.E., Pagano, P.J., 2002. The reactive adventitia: fibroblast oxidase in vascular function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 1962–1971.
- Riccio, P., Rossano, R., Liuzzi, G.M., 2011. May diet and dietary supplements improve the wellness of multiple sclerosis patients? A molecular approach. *Autoimmune Dis.* 2010, 249842. doi:10.4061/2010/249842
- Richer, C., Doussau, M.P., Giudicelli, J.F., 1983. Effects of captopril and enalapril on regional vascular resistance and reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 5, 312–320.
- Rivero-Vilches, F., de Frutos, S., Rodríguez-Puyol, M., Rodríguez-Puyol, D., Saura, M., 2001. [Guanylate cyclases: physiological processes mediated by cyclic GMP]. *Nefrol. Publ. Of. Soc. Esp. Nefrol.* 21, 233–239.

- Rizzoni, D., Porteri, E., Boari, G.E.M., De Ciuceis, C., Sleiman, I., Muiesan, M.L., Castellano, M., Miclini, M., Agabiti-Rosei, E., 2003. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 108, 2230–2235. doi:10.1161/01.CIR.0000095031.51492.C5
- Robbins, R.C., 1971. Effects of phenyl benzo-gamma-pyrone derivatives (flavonoids) on blood cell aggregation: basis for a concept of mode of action. *Clin. Chem.* 17, 433–437.
- Rocha, W.A., Lunz, W., Baldo, M.P., Pimentel, E.B., Dantas, E.M., Rodrigues, S.L., Mill, J.G., 2010. Kinetics of cardiac and vascular remodeling by spontaneously hypertensive rats after discontinuation of long-term captopril treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 43, 390–396.
- Rodrigo, E., Maeso, R., Muñoz-García, R., Navarro-Cid, J., Ruilope, L.M., Cachofeiro, V., Lahera, V., 1997. Endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: consequences of chronic treatment with losartan or captopril. *J. Hypertens.* 15, 613–618.
- Rodríguez-Iturbe, B., Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Parra, G., Vaziri, N.D., 2004. Evolution of renal interstitial inflammation and NF-kappaB activation in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Nephrol.* 24, 587–594. doi:10.1159/000082313
- Romero, J.C., Reckelhoff, J.F., 1999. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34, 943–949.
- Rossi, M.A., Colombini-Netto, M., 2001. Chronic inhibition of NO synthesis per se promotes structural intimal remodeling of the rat aorta. *J. Hypertens.* 19, 1567–1579.
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19–34. doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
- Rubio-Perez, J.M., Morillas-Ruiz, J.M., 2012. A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012, 756357. doi:10.1100/2012/756357
- Russell O. Sinnhuber, Teh C. Yu, 2006. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *J. Food Sci.* 23, 626 – 634. doi:10.1111/j.1365-2621.1958.tb17614.x
- Sánchez, D., Quiñones, M., Moulay, L., Muguera, B., Miguel, M., Aleixandre, A., 2010. Changes in arterial blood pressure of a soluble cocoa fiber product in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1493–1501. doi:10.1021/jf902080b
- Sander, M., Victor, R.G., 1999. Neural mechanisms in nitric-oxide-deficient hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 8, 61–73.
- Santangelo, C., Vari, R., Scaccocchio, B., Di Benedetto, R., Filesì, C., Masella, R., 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità* 43, 394–405.
- Santeliz Contra, Hermelando, Romano Estrada, Lorena, González Chávez, Antonio, Hernández y Hernández, Héctor, 2008. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol* 19, 21–29.
- Sanz-Rosa, D., Oubiña, M.P., Cediël, E., de Las Heras, N., Vegazo, O., Jiménez, J., Lahera, V., Cachofeiro, V., 2005. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/ikappaB system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H111–115. doi:10.1152/ajpheart.01061.2003
- Sari, A., Selim, N., Dilek, M., Aydogdu, T., Adibelli, Z., Büyükkaya, P., Akpolat, T., 2012. Effect of lemon juice on blood pressure. *J Exp Clin Med* 29, 38–41.
- Sarikonda, K.V., Watson, R.E., Opara, O.C., Dipette, D.J., 2009. Experimental animal models of hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* 3, 158–165. doi:10.1016/j.jash.2009.02.003

- Savoia, C., Schiffrin, E.L., 2007. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 112, 375–384. doi:10.1042/CS20060247
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S–85S.
- Schmitt, C.A., Dirsch, V.M., 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 21, 77–91. doi:10.1016/j.niox.2009.05.006
- Schnorr, O., Brossette, T., Momma, T.Y., Kleinbongard, P., Keen, C.L., Schroeter, H., Sies, H., 2008. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 211–215. doi:10.1016/j.abb.2008.02.040
- Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., Gonsalves, J.L., Lazarus, S.A., Schmitz, H.H., German, J.B., Keen, C.L., 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 36–40.
- Seçilmiş, M.A., Özü, Ö.Y., Kiroğlu, O.E., Şingirik, E., Büyükaşar, K., 2014. The production of vasoconstriction-induced residual NO modulates perfusion pressure in rat mesenteric vascular bed. *Perfusion* 29, 488–495. doi:10.1177/0267659114524263
- Seddon, M., Looi, Y.H., Shah, A.M., 2007. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart Br. Card. Soc.* 93, 903–907. doi:10.1136/hrt.2005.068270
- Sekiguchi, F., Miyake, Y., Hirakawa, A., Nakahira, T., Yamaoka, M., Shimamura, K., Yamamoto, K., Sunano, S., 2001. Hypertension and impairment of endothelium-dependent relaxation of arteries from spontaneously hypertensive and L-NAME-treated Wistar rats. *J. Smooth Muscle Res. Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi* 37, 67–79.
- Sellén Crombet, J., 2008. Hipertensión arterial : diagnóstico, tratamiento y control. Ciudad de La Habana : Editorial Universitaria, 2008.
- Sen, S., Hoffman, G.C., Stowe, N.T., Smeby, R.R., Bumpus, F.M., 1972. Erythrocytosis in spontaneously hypertensive rats. *J. Clin. Invest.* 51, 710–714. doi:10.1172/JCI106860
- Serafini, M., Peluso, I., Raguzzini, A., 2010. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc. Nutr. Soc.* 69, 273–278. doi:10.1017/S002966511000162X
- Sharma, P.K., Vyawahare, N.S., Ladhha, A., 2010. Animal Models for Hypertension. *Pharmacologyonline* 3, 458–472.
- Shohaib, T., Shafique, M., Dhanya, N., Divakar, M.C., 2011. Importance of flavonoids in therapeutics. *Hygeia J. Drugs Med.* 3, 1–18.
- Sierra Benito, C., Coca Payeras, A., 2005. [Utility of extended release indapamide in the treatment of hypertension in at risk elderly: extended release study]. *Rev. Clínica Esp.* 205, 478–483.
- Silva, B.R., Pernomian, L., Grando, M.D., Bendhack, L.M., 2014. Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 738, 192–199. doi:10.1016/j.ejphar.2014.05.040
- Sivieri, D.O., Bispo-da-Silva, L.B., Oliveira, E.B., Resende, A.C., Salgado, M.C.O., 2007. Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension* 50, 110–115. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.085761
- Snyder, P.M., 2002. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr. Rev.* 23, 258–275.

- Song, Y., Manson, J.E., Buring, J.E., Sesso, H.D., Liu, S., 2005. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 376–384.
- Spencer, J.P.E., 2009. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr.* 4, 243–250. doi:10.1007/s12263-009-0136-3
- Spickett, C.M., Wiswedel, I., Siems, W., Zarkovic, K., Zarkovic, N., 2010. Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic. Res.* 44, 1172–1202. doi:10.3109/10715762.2010.498476
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R.M., Gärtner, C., Haenen, G., Hollman, P., Holst, B., Kelly, F.J., Polidori, M.C., Rice-Evans, C., Southon, S., van Vliet, T., Viña-Ribes, J., Williamson, G., Astley, S.B., 2002. Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* 23, 39–100.
- Stankevicius, E., Kevelaitis, E., Vainorius, E., Simonsen, U., 2003. [Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Med. Kaunas Lith.* 39, 333–341.
- Stenmark, K.R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., Das, M., 2006. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiol. Bethesda Md* 21, 134–145. doi:10.1152/physiol.00053.2005
- Stenmark, K.R., Frid, M.G., Yeager, M., Li, M., Riddle, S., McKinsey, T., El Kasmi, K.C., 2012. Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change. *Pulm. Circ.* 2, 3–14. doi:10.4103/2045-8932.94817
- Strijdom, H., Chamane, N., Lochner, A., 2009. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc. J. Afr.* 20, 303–310.
- Sui, H., Yu, Q., Zhi, Y., Geng, G., Liu, H., Xu, H., 2010. [Effects of apigenin on the expression of angiotensin-converting enzyme 2 in kidney in spontaneously hypertensive rats]. *Wei Sheng Yan Jiu* 39, 693–696, 700.
- Sui, H., Zhi, Y., Liu, H., Gao, P., Xu, H., Yan, W., 2011. [Endothelium-dependent vasorelaxation effects induced by apigenin on the thoracic aorta of rats and its possible mechanism]. *Wei Sheng Yan Jiu* 40, 416–419, 422.
- Sukor, N., 2011. Secondary hypertension: a condition not to be missed. *Postgrad. Med. J.* 87, 706–713. doi:10.1136/pgmj.2011.118661
- Sun, Y., Zhang, J., Zhao, D., Wang, Q., Gu, Y., Ma, H., Zhang, Z., 2011. Role of the epithelial sodium channel in salt-sensitive hypertension. *Acta Pharmacol. Sin.* 32, 789–797. doi:10.1038/aps.2011.72
- Tanwar, B., Rajni, M., 2012. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD* 2, 59–68. doi:10.5455/spatula.20120328100506
- Tapas, A.R., Sakarkar, D.M., Kakde, R.B., 2008. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7, 1089–1099.
- Tenorio López, F.A., del Valle Mondragón, L., Pastelín Hernández, G., 2006. [Flavonoids and the cardiovascular system: can they be a therapeutic alternative?]. *Arch. Cardiol. México* 76 Suppl 4, S33–45.
- Testai, L., Martelli, A., Cristofaro, M., Breschi, M.C., Calderone, V., 2013. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 750–756. doi:10.1111/jphp.12032
- Tikellis, C., Thomas, M.C., 2012. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *Int. J. Pept.* 2012, 256294. doi:10.1155/2012/256294
- Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J., 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275, 33238–33243. doi:10.1074/jbc.M002615200

Török, J., 2008. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 57, 813–825.

Touyz, R.M., 2004. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44, 248–252. doi:10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d

Triggle, C.R., Samuel, S.M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., Ding, H., 2012. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 713–738. doi:10.1139/y2012-073

Trippodo, N.C., Frohlich, E.D., 1981. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ. Res.* 48, 309–319.

Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2, 1231–1246. doi:10.3390/nu2121231

T. Sugimoto, H.M., 2003. Age-related changes in the morphology and mechanics of arterial wall in the rat. *JSME Int. J. Ser. C* 46, 1312–1320. doi:10.1299/jsmec.46.1312

Tuñón, M.J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., González-Gallego, J., 2009. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr. Drug Metab.* 10, 256–271.

Ulker, S., McMaster, D., McKeown, P.P., Bayraktutan, U., 2003. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc. Res.* 59, 488–500.

Vanheel, B., Van de Voorde, J., 2000. EDHF and residual NO: different factors. *Cardiovasc. Res.* 46, 370–375.

Vapaatalo, H., Mervaala, E., Nurminen, M.L., 2000. Role of endothelium and nitric oxide in experimental hypertension. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 49, 1–10.

Vardi, N., Öztürk, F., Fadilloğlu, E., Otlu, A., Yağmurca, M., 2003. Histological changes in the rat thoracic aorta after chronic nitric oxide synthase inhibition. *Turkish Journal of Medical Sciences* 33, 141–147.

Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C., Spencer, J.P.E., 2008. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr.* 3, 115–126. doi:10.1007/s12263-008-0091-4

Vaziri, N.D., Ni, Z., Oveisi, F., 1998. Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 31, 1248–1254.

Verstraeten, S.V., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2003. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 84–92.

Verstraeten, S.V., Mackenzie, G.G., Oteiza, P.I., Fraga, C.G., 2008. (-)-Epicatechin and related procyanidins modulate intracellular calcium and prevent oxidation in Jurkat T cells. *Free Radic. Res.* 42, 864–872. doi:10.1080/10715760802471452

Viera, A.J., Neutze, D.M., 2010. Diagnosis of secondary hypertension: an age-based approach. *Am. Fam. Physician* 82, 1471–1478.

Vila, E., Salaices, M., 2005. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H1016–1021. doi:10.1152/ajpheart.00779.2004

Vlkovicová, J., Javorková, V., Mézesová, L., Pechánová, O., Vrbjar, N., 2008. Regulatory role of nitric oxide on the cardiac Na, K-ATPase in hypertension. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 57 Suppl 2, S15–22.

Vozzo, R., Wittert, G.A., Chapman, I.M., Fraser, R., Hope, P.J., Horowitz, M., Alshaher, M.M., Kumar, V.B., Morley, J.E., 1999. Evidence that nitric oxide stimulates feeding in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123, 145–151.

- Vrbjar, N., Javorková, V., Pechánová, O., 2002. Changes of sodium and ATP affinities of the renal Na,K-ATPase during and after nitric oxide-deficient hypertension. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 51, 475–481.
- Wallace, T.C., 2011. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 2, 1–7. doi:10.3945/an.110.000042
- Wang, X., Quinn, P.J., 2000. The location and function of vitamin E in membranes (review). *Mol. Membr. Biol.* 17, 143–156.
- Wang, X., Quinn, P.J., 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* 38, 309–336.
- Wei, C.-L., Hon, W.-M., Lee, K.-H., Khoo, H.-E., 2005. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 25, 647–656. doi:10.1111/j.1478-3231.2005.01063.x
- Weiss, W.P., 1998. Requirements of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.* 81, 2493–2501. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)70141-9
- Weng, C.-J., Yen, G.-C., 2012. Flavonoids, a ubiquitous dietary phenolic subclass, exert extensive in vitro anti-invasive and in vivo anti-metastatic activities. *Cancer Metastasis Rev.* 31, 323–351. doi:10.1007/s10555-012-9347-y
- Weseler, A.R., Bast, A., 2010. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr. Hypertens. Rep.* 12, 154–161. doi:10.1007/s11906-010-0103-9
- WHO, 2009. Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks. World Health Organization.
- Widlansky, M.E., Price, D.T., Gokce, N., Eberhardt, R.T., Duffy, S.J., Holbrook, M., Maxwell, C., Palmisano, J., Keaney, J.F., Jr, Morrow, J.D., Vita, J.A., 2003. Short- and long-term COX-2 inhibition reverses endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Hypertension* 42, 310–315. doi:10.1161/01.HYP.0000084603.93510.28
- Wilcox, C.S., 2002. Reactive oxygen species: roles in blood pressure and kidney function. *Curr. Hypertens. Rep.* 4, 160–166.
- Wu, X.C., Johns, E.J., 2002. Nitric oxide modulation of neurally induced proximal tubular fluid reabsorption in the rat. *Hypertension* 39, 790–793.
- Xu, S., Touyz, R.M., 2006. Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive. *Can. J. Cardiol.* 22, 947–951.
- Yi, L., Jin, X., Chen, C.-Y., Fu, Y.-J., Zhang, T., Chang, H., Zhou, Y., Zhu, J.-D., Zhang, Q.-Y., Mi, M.-T., 2011. Chemical Structures of 4-Oxo-Flavonoids in Relation to Inhibition of Oxidized Low-Density Lipoprotein (LDL)-Induced Vascular Endothelial Dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 5471–5489. doi:10.3390/ijms12095471
- Yuan, S.Y., Rigor, R.R., 2010. Regulation of Endothelial Barrier Function, Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA).
- Yuan, Y.V., Kitts, D.D., Godin, D.V., 1996. Heart and red blood cell antioxidant status and plasma lipid levels in the spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 290–297.
- Yung, L.M., Leung, F.P., Yao, X., Chen, Z.-Y., Huang, Y., 2006. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 6, 1–19.
- Zalba, G., San José, G., Moreno, M.U., Fortuño, M.A., Fortuño, A., Beaumont, F.J., Díez, J., 2001. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 38, 1395–1399.
- Zaragozá, F., Tofiño, M.I., Oliveira, L., 2002. Flavonoides y fitoterapia. *Rev. Fitoter.* 2, 21–32.

Zhang-James, Y., Middleton, F.A., Faraone, S.V., 2013. Genetic architecture of Wistar-Kyoto rat and spontaneously hypertensive rat substrains from different sources. *Physiol. Genomics* 45, 528–538. doi:10.1152/physiolgenomics.00002.2013

Zhang, Y.H., Park, Y.S., Kim, T.J., Fang, L.H., Ahn, H.Y., Hong, J.T., Kim, Y., Lee, C.K., Yun, Y.P., 2000. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen. Pharmacol.* 35, 341–347.

Zhang, Z., Chen, L., Zhong, J., Gao, P., Oudit, G.Y., 2014. ACE2/Ang-(1-7) signaling and vascular remodeling. *Sci. China Life Sci.* 57, 802–808. doi:10.1007/s11427-014-4693-3

8.1 Anexo 1: Participación en congresos y jornadas de investigación

Participación en congresos

Romecín PA, Paredes MD, Ortiz AJ, Ortiz Ruiz E, Meseguer AB, Millán J, García EM, Atucha NM, García-Estañ J, Ortiz MC. Crosstalk between RAS/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in the increased NFκB expression of cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) from cirrhotic rats. Revista: XIV Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular (SEBC). Páginas: P0083, Fecha: 12/2011

Paredes MD, Meseguer AB, Romecín PA, Molina MM, Millán JE, Atucha NM, Castillo J, García-Estañ J y Ortiz-Ruiz MC. Effect of flavonoids on endothelial dysfunction in L-NAME hypertensive rats: Role of oxidative stress and nitric oxide. Campus Mare Nostrum: I Congreso Internacional de Jóvenes Investigadores en el Mediterráneo. Fecha: 10/2013

Jornadas de investigación

Paredes MD, Meseguer AB, Romecín PA, Molina MM, Millán JE, Atucha NM, Castillo J, García-Estañ J y Ortiz-Ruiz MC. Poster (P-IM-7): Effect of flavonoids on endothelial dysfunction in L-NAME Hypertensive rats: role of oxidative stress and nitric oxide. Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM): I Jornadas Doctorales. URL: <http://www.um.es/web/eidum/jornadas-doctorales>. (acceso 28.04.2015). Fecha: 04/2015.

ABREVIATURAS

A	Apigenina
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín-5'-difosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANG	Angiotensinógeno
Ang I	Angiotensina
Ang II	Angiotensina II
AP-1	Proteína de activación 1
ARA II	Bloqueantes de los receptores de angiotensina II
ATP	Trifosfato de adenosina/ Adenosín-5'-trifosfato
AT₁	Receptor de tipo 1 de la angiotensina II
AT₂	Receptor de tipo 2 de la angiotensina II
BCA	Ácido bicinconínico
BZD	Benzodiazepinas
BH₄	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
Ca²⁺	Ión calcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalasa
CMLV	Células musculares lisas vasculares
COE	Extracto de Cacao
COX	Ciclooxigenasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta activado por AMP cíclico
CVD	Enfermedad cardiovascular
D	Diosmina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DE	Disfunción endotelial
EA	Enfermedad de Alzheimer
EC	Electroforesis capilar
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDCFs	Factores de contracción derivados del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factor relajante derivado del endotelio
EDRFs	Factores de relajación derivados del endotelio
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ENaC	Canal de sodio epitelial
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
EO	Estrés oxidativo
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FC	Frecuencia cardíaca

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

FE	Fenilefrina
FMN	Flavín mononucleótido
GBC	Extracto de Pomelo + Naranja amarga
GC	Gasto cardíaco
GMPc	Guanosín monofostato cíclico
GPx	Glutación peroxidasa
GTP	Guanosín trifosfato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Forma oxidada del glutación
HCIO	Ácido hipocloroso
HDL	Lipoproteína de alta densidad
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HTA	Hipertensión arterial
IECA	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
IL	Interleuquina
INFγ	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	Inositol trifosfato
JNK	Kinasa c-jun, NH ₂ -terminal
K⁺	Ión potasio
LBC	Extracto de Limón
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	LDL oxidada
LHP	Lactasa floridzina hidrolasa
L-NAME	N ^{ω} -nitro-L-arginina metil éster
LOX	Lipooxigenasa
LPS	Lipopolisacárido
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LVH	Hipertrofia ventricular izquierda
MAPK	Proteína kinasa activada por mitógenos
MDA	Malonildialdehído
mmHg	Milímetros de mercurio
MS	Espectrometría de masas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NFκB	Factor nuclear kappa B
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NPS	Nitroprusiato sódico
OH[•]	Radical hidroxilo
ONOO[•]	Peroxinitrito

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

OMS	Organización Mundial de la Salud
O₂⁻	Anión superóxido
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PA	Presión arterial
PAL	Fenilalanina
PAM	Presión arterial sistémica media
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PD	Enfermedad de Parkinson
PDE	Fosfodiesterasa
PE	Polifenoles extraíbles
PGE2	Prostaglandina E2
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina I ₂
PI3-K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PNA	Péptido natriurético auricular
PPAR	Receptor para el activador de la proliferación de peroxisomas
PPARγ	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma
PPR	Presión de perfusión renal
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RAS	Sistema renina angiotensina
RP	Resistencia vascular periférica
RVS	Resistencia vascular sistémica
SEM	Error estándar de la media
SGLT1	Cotransportador de glucosa acoplado al sodio
SH	Hipertensión secundaria
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SRDA	Síndrome de distrés respiratorio agudo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TGF	Tasa de filtración glomerular
TGFβ	Factor transformador de crecimiento β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
t-PA	Activador del plasminógeno tisular
TXA₂	Tromboxano A ₂
VCAM	Molécula de adhesión al endotelio vascular

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN RATAS CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WKY	Ratas Wistar Kyoto
XO	Xantina oxidasa

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de población observada de la presión sanguínea sistólica en comparación con la distribución ideal de población (adaptado de (WHO, 2009))	2
Figura 2. Disminución estimada de la presión sanguínea mediante acciones no-farmacológicas sobre la hipertensión (adaptado de (Messerli et al., 2007))	3
Figura 3. Vaso normal e hipertenso (adaptado de (Stenmark et al., 2012))	6
Figura 4. Factores fisiopatológicos de la HTA (GC: gasto cardíaco, R-A: renina-angiotensina, RP: Resistencias periféricas) (adaptado de (Alcasena, M S et al., 1998))	8
Figura 5. Arquitectura del lecho microvascular (adaptado de (Yuan and Rigor, 2010)).....	8
Figura 6. Representación de una arteriola con tono (adaptado de (Martinez-Lemus, 2012)).....	9
Figura 7. Endotelio sano (A) frente a endotelio insalubre (B) (adaptado de (Triggle et al., 2012)).....	10
Figura 8. Deterioro de órganos diana en diana en diferentes modelos genéticos experimentales de HTA (adaptado de (Dornas and Silva, 2011))	18
Figura 9. Estructuras de resonancia en la molécula de NO (Adaptado de (Centelles, J J et al., 2004))	19
Figura 10. Reacción de la NO-sintasa que produce óxido nítrico y citrulina a partir de arginina (adaptado de (Centelles, J J et al., 2004))	19
Figura 11. Reacción global y cofactores de NOS (adaptado de (Alderton et al., 2001)).....	20
Figura 12. Estructura de dominio de nNOS, eNOS e iNOS (adaptado de (Alderton et al., 2001)).....	22
Figura 13. Efecto del incremento agudo del estrés de roce sobre la activación de la eNOS vascular (adaptado de (Alfieri, 2003))	25
Figura 14. La producción de óxido nítrico evita la constricción de las arterias (adaptado de (Centelles, J J et al., 2004)).....	28
Figura 15. Descripción general de las funciones de NO en la fisiología renal (adaptado de (Mount and Power, 2006))	30
Figura 16. Alcance de la enfermedad cardiovascular hipertensiva desde la prehipertensión hasta el daño a los órganos diana y enfermedad en la etapa final (adaptado de (Messerli et al., 2007))	32
Figura 17. Posibles mecanismos de disminución de la actividad de NO en la hipertensión esencial (adaptado de (Cardillo and Panza, 1998))	32
Figura 18. Esquema del sistema SRAA (adaptado de (Rad, Aria, 2006))	34
Figura 19. Principales isoformas de la enzima ECA (adaptado de (Santeliz Contra, Hermelando et al., 2008))	36
Figura 20. Vía enzimática de la síntesis de Angiotensina II (adaptado de (Elton et al., 2010))	38
Figura 21. Enzimas implicadas en la generación e inactivación de EROs (adaptado de (Förstermann, 2010))	42
Figura 22. (a) Enzimas NOX en la pared vascular (b) Estructura del núcleo central de las enzimas (NOX) de la NADPH oxidasa (adaptado de (Bedard and Krause, 2007))	43
Figura 23. Esquema de la eNOS cuya reducción de oxígeno está desacoplada de la síntesis de NO (adaptado de (Förstermann, 2010)).....	45
Figura 24. Efectos de las ROS en el desarrollo de HTA (adaptado de (Montezano and Touyz, 2012))	49
Figura 25. Estructura general de los flavonoides (adaptado de (Flora et al., 2012)).....	52
Figura 26. Clases de flavonoides (adaptado de (Paredes and Clemente, 2005))	54
Figura 27. Esquema de estrategias para la extracción de flavonoides (adaptado de (Tsao, 2010))	57
Figura 28. Bandas de absorción de los flavonoides en el espectro UV-VIS (adaptado de (Halbwirth, 2010))	58
Figura 29. Absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos (adaptado de (Stahl et al., 2002))	61

Figura 30. Posibles lugares de acción de los polifenoles sobre el metabolismo de los carbohidratos y homeostasis de la glucosa (adaptado de (Hanhineva et al., 2010))	62
Figura 31. Efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la enfermedad cardiovascular (adaptado de (Quiñones et al., 2013))	64
Figura 32. Mecanismos de los efectos antioxidantes de los flavonoides (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009)).....	65
Figura 33. Reacción de Fenton (adaptado de (Pietta, 2000))	66
Figura 34. Posibles sitios de unión de metales a flavonoides (adaptado de (Halbwirth, 2010))	66
Figura 35. Captación de ERO por los flavonoides (adaptado de (Gupta et al., 2010))	66
Figura 36. Flavonoide captando superóxido y peroxinitrito (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009)) ..	67
Figura 37. Los tres principales requisitos estructurales de los flavonoides para tener un alto potencial antioxidante (adaptado de (Halbwirth, 2010))	68
Figura 38. Objetivos de los flavonoides en la modulación de la respuesta inflamatoria (adaptado de (Gomes et al., 2008))	70
Figura 39. Características estructurales de las actividades antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides (adaptado de (Lotito and Frei, 2006))	71
Figura 40. Topología del ENaC (adaptado de (Sun et al., 2011))	72
Figura 41. Efecto de los flavonoides sobre la relajación dependiente de endotelio (adaptado de (Akhlaghi and Bandy, 2009)).....	74
Figura 42. Mecanismos moleculares de inflamación vascular (adaptado de (Savoia and Schiffrin, 2007))	76
Figura 43. Posibles mecanismos para la reducción de los factores de riesgo en la aterosclerosis por los flavonoides (adaptado de (Mulvihill and Huff, 2012)).....	77
Figura 44. Representación esquemática de los requerimientos químicos de los 4-oxo-flavonoides para la inhibición de la disfunción endotelial (adaptado de (Yi et al., 2011))	78
Figura 45. Mecanismos epigenéticos implicados en la carcinogénesis (adaptado de (Link et al., 2010)) ..	80
Figura 46. Potenciales objetivos de señalización de flavonoides asociados con neuroprotección (adaptado de (Hwang et al., 2012))	86
Figura 47. Jaulas metabólicas donde se llevaron a cabo los estudios metabólicos	104
Figura 48. Medida de la presión arterial en una rata mediante el método del manguito en la cola	106
Figura 49. Extracción de la aorta torácica	106
Figura 50. Aorta torácica extraída	107
Figura 51. Medición de anillos aórticos.....	107
Figura 52. A) Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica. B) Copa de vidrio	108
Figura 53. Esquema del sistema in vitro de baños	108
Figura 54. Esquema de la reacción entre malondialdehído y ácido tiobarbitúrico	110
Figura 55. Reacción de Griess.....	112
Figura 56. Medición del espesor de la pared muscular y de la relación pared/luz vascular en la aorta torácica de una rata control (Hematoxilina 20x y 4x, respectivamente).....	116
Figura 57. Evolución de la medida de la PAS y de la FC en el modelo de HTA (SHR) para el grupo no tratado.	120
Figura 58. Presión arterial media (PAM) de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores.	122

Figura 59. Presión arterial sistólica (PAS) y frecuencia cardiaca (FC) de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores.	125
Figura 60. Peso corporal del grupo L-NAME y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores. ...	126
Figura 61. Peso corporal del grupo SHR y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores.	127
Figura 62. Diuresis de todos los grupos experimentales y efecto de los tratamientos sobre sus valores	129
Figura 63. Balance de sodio de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre sus valores	130
Figura 64. (A) Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de los grupos control y L-NAME no tratado; (B) Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de todos los grupos experimentales para el protocolo L-NAME.	134
Figura 65. Reactividad vascular aórtica a Fenilefrina de todos los grupos experimentales para el protocolo SHR 6 y 12.	135
Figura 66. (A) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina y (B) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina tras la administración aguda de L-NAME (10^{-4} M) de todos los grupos experimentales del protocolo L-NAME.	136
Figura 67. (A) y (C) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina; (B) y (D) Reactividad vascular aórtica a la máxima contracción a Fenilefrina tras la administración aguda de L-NAME (10^{-4} M) de todos los grupos experimentales del protocolo SHR 6 y 12.	138
Figura 68. Reactividad vascular aórtica a Acetilcolina de todos los grupos experimentales para el protocolo L-NAME, SHR 6 y 12.	139
Figura 69. Efecto de la administración aguda de L-NAME (10^{-4} M) sobre la reactividad vascular a Acetilcolina en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales.	141
Figura 70. Máximas relajaciones a ACh antes y después de la administración aguda de L-NAME (10^{-4} M) en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales.	144
Figura 71. Efecto de la administración aguda de Nitroprusiato Sódico sobre la reactividad vascular a Acetilcolina en anillos aórticos de rata de todos los grupos experimentales.	146
Figura 72. Niveles de TBARS plasmáticos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	148
Figura 73. Niveles de TBARS en tejido renal de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	150
Figura 74. Niveles de TBARS urinarios en todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	151
Figura 75. Niveles de nitritos plasmáticos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	153
Figura 76. Excreción urinaria de nitritos de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	155
Figura 77. Niveles de proteínas urinarias de todos los grupos experimentales y efecto de los distintos tratamientos sobre ellos.	156
Figura 78. Arteria intramiocárdica sin alteraciones morfológicas (PAS, magnificación original 10x)	158
Figura 79. Arteria segmentaria del hilio renal sin alteraciones morfológicas (PAS, magnificación original x10)	158
Figura 80. Hiperplasia severa de la capa media en arteria intramiocárdica de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x)	159

Figura 81. Arteria interlobular con hiperplasia de la capa muscular y reducción de la luz en rata DS tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x).....	159
Figura 82. Arteriopatía hialina en vaso miocárdico de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 10x)	159
Figura 83. Arteriopatía hialina concéntrica en arteria interlobular con reducción de la luz vascular y atrofia tubular leve en rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original, 10x).....	159
Figura 84. Intensa necrosis fibrinoide en vaso miocárdico de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 20x).....	159
Figura 85. Necrosis fibrinoide y estenosis de la luz en arteria interlobular y cilindros tubulares de rata SD tratada con L-NAME (PAS, magnificación original 10x)	159
Figura 86. (A) Necrosis fibrinoide en los cuatro vasos pero sin áreas de infarto. (B), (C) y (D) Intensa necrosis fibrinoide de los diferentes vasos de las tres imágenes que producen necrosis incipiente de miocardiocitos y suscitan respuesta inflamatoria, éstas son áreas de infarto miocárdico recientes (PAS a diferentes aumentos)	160
Figura 87. Grosor del tabique interventricular (TI) de los grupos experimentales con HTA-L-NAME y efecto de los distintos tratamientos.....	161
Figura 88. Espesor de la pared de la Aorta Torácica y la Abdominal de los grupos experimentales con HTA-L-NAME.....	162
Figura 89. Grosor del tabique interventricular (TI) de los grupos experimentales con HTA (SHR).	165
Figura 90. Espesor de la pared de la Aorta Torácica y Abdominal de los grupos experimentales con HTA (SHR).	167

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos de 18 años o más	1
Tabla 2. Control de la HTA en el mundo.....	2
Tabla 3. Nomenclatura y características generales de las NOS (Adaptado de (Alfieri, 2003))	21
Tabla 4. Diferentes inhibidores de las isoformas de la NOS (adaptado de (Alfieri, 2003))	27
Tabla 5. Efectos biológicos del NO sobre el sistema cardiovascular (adaptado de (Strijdom et al., 2009))	29
Tabla 6. Representación esquemática de los principales miembros de la familia de polifenoles (adaptado de (Habauzit and Morand, 2012))	50
Tabla 7. Flavonoides alimenticios, subclases y fuentes típicas de alimentación (adaptado de (Shohaib et al., 2011)).....	56
Tabla 8. Actividades farmacológicas de los flavonoides (adaptado de (Tanwar and Rajni, 2012))	89
Tabla 9. Componentes y estructuras químicas de los flavonoides estudiados	91
Tabla 10. Composición de los extractos utilizados mediante técnica HPLC	100
Tabla 11. Tratamientos y dosis suministradas de flavonoides	101
Tabla 12. Reactivos y tiempos de contacto de la etapa de inclusión	113
Tabla 13. Reactivos y tiempos de contacto en la etapa de tinción	114
Tabla 14. Valores de la presión arterial sistólica (PAS) y frecuencias cardíacas (FC) del grupo SHR 12 no tratado.....	121
Tabla 15. Valores de la presión arterial media (PAM), presión arterial sistólica (PAS) y frecuencias cardíacas (FC) de todos los grupos experimentales.	125
Tabla 16. Número de ratas, peso corporal, ingesta de bebidas y comida, diuresis, balance de sodio y hematocrito de todos los grupos experimentales.....	131
Tabla 17. Valores de hematocrito de todos los grupos experimentales	132
Tabla 18. Valores de la máxima respuesta aórtica de contracción a fenilefrina y relajación a acetilcolina tras la administración aguda de L-NAME 10^{-4} M de todos los grupos experimentales	144
Tabla 19. Valores de la dosis eficaz 50 (ED50) de fenilefrina y acetilcolina y de la máxima respuesta aórtica de contracción a fenilefrina y relajación a acetilcolina y a nitroprusiato sódico de todos los grupos experimentales.	147
Tabla 20. Valores de TBARS plasmáticos, renales y urinarios de todos los grupos experimentales.	152
Tabla 21. Valores de nitritos plasmáticos, excreción urinaria de nitritos y de proteínas urinarias de todos los grupos experimentales.....	157
Tabla 22. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón del grupo L-NAME.	161
Tabla 23. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón del grupo L-NAME.....	162
Tabla 24. Valores de los distintos parámetros histológicos renales del grupo L-NAME.	163
Tabla 25. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón de los grupos SHR de 6 y 12 semanas.....	164
Tabla 26. Valores de los distintos parámetros histológicos del corazón de los grupos SHR de 6 y 12 semanas.....	168
Tabla 27. Valores de los distintos parámetros histológicos renales del grupo SHR.	169