



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica
Cátedra de Fisicoquímica
Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular
(IBIMOL)
(UBA-CONICET)

(-)-EPICATEQUINA Y QUERCETINA EN LA
MODULACIÓN
DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO

Lic. María Valeria Calabro López

Director: Prof. Dr. César G. Fraga

Directora Adjunta: Dra. Bárbara Piotrkowski

2017

Mis agradecimientos son para todas las personas que me acompañaron durante esta etapa:

A mi director de tesis, Dr. César G. Fraga por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

A mi Directora Adjunta, Dra. Bárbara Piotrkowski, por su confianza en mí para realizar este trabajo. Por su generosidad para enseñarme y su apoyo incondicional. Por guiarme y ayudarme día a día. Y fundamentalmente por convertirse en una gran amiga.

A la Dra. Mónica Galleano, por su guía y su fundamental aporte para el desarrollo de esta tesis.

A Corina y Laura, excelentes compañeras de trabajo que se convirtieron en grandes amigas. Por acompañarme en todo momento. Por aconsejarme y por su complicidad.

A todo el personal de la Cátedra de Fisicoquímica que de una u otra forma me ayudaron durante el desarrollo de esta tesis.

A todos mis amigos de Fisicoquímica, en especial a Virginia, Analía K., Analía C., Natacha, Silvina, Tami y Darío; y de Química General e Inorgánica, Mariana, Romina, Timoteo, Lourdes y Alejandro.

Al Dr. Pablo Evelson por aconsejarme y brindarme el espacio y el tiempo necesarios para terminar la escritura de mi tesis en la Cátedra de Química General e Inorgánica. Por confiar en mí para formar parte de su grupo de trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, la facultad de Farmacia y Bioquímica y el IBIMOL, por el marco institucional brindado.

A mis amigas y colegas Gaby, Tami, Gise, Vicky y Ceci, por hacer que la carrera de Biología resultara una de las etapas de mi vida más felices e inolvidables. Por seguir acompañándome en todos los aspectos de mi vida.

A toda mi familia, por el apoyo, el amor y la paciencia.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se encuentran incluidos en los siguientes trabajos científicos de investigación:

-Valeria Calabró, Barbara Piotrkowski, Laura Fischerman, Marcela A. Vazquez Prieto, Mónica Galleano and César G. Fraga. Modifications in nitric oxide and superoxide anion metabolism induced by fructose overload in rat heart are prevented by (-)-epicatechin. *Food Funct*, 2016 (7): 1876-1883.

-Barbara Piotrkowski*, Valeria Calabró*, Mónica Galleano and César G. Fraga. (-)-Epicatechin prevents alterations in the metabolism of superoxide anion and nitric oxide in the heart of L-NAME-treated rats. *Food Funct*, 2015 (6)(1):155-61, 2015.

***ambos autores contribuyeron de igual manera.**

Además, durante el período de ejecución de mi Doctorado participé en la elaboración de los siguientes trabajos de revisión relacionados con el trabajo de tesis:

-Galleano M, Calabró V, Prince PD, Litterio MC, Piotrkowski B, Vázquez-Prieto MA, Miatello RM, Oteiza PI, Fraga CG. Flavonoids and metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 2012 (1259):87-94.

-Fraga CG, Litterio MC, Prince PD, Calabró V, Piotrkowski B, Galleano M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J Clin Biochem Nutr*, 2011 (48):63-7.

Abreviaturas



ABREVIATURAS

A•: radical libre derivado de antioxidante

ABC: área bajo la curva

Abs: absorbancia

AH: antioxidante

Akt: proteína quinasa B

BH4: tetrahidrobiopterina

CaM: calmodulina

CAT: catalasa

DMSO: dimetilsulfóxido

DOCA: ratas hipertensas por tratamiento con desoxicorticosterona acetato

DUOX: dual oxidasa

EC: (-)-epicatequina

ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles

ECV: enfermedad cardiovascular

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERK: proteína quinasa regulada por señal extracelular

FAD: flavina adenina dinucleótido

FMN: flavina mononucleótido

GCs: guanilato ciclasa soluble

GMPc: guanosina monofosfato cíclica

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HDL: lipoproteína de alta densidad

HEPES: N-hidroxietil-piperazina-N-ácido etanosulfónico

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HT: hipertensión

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

k: constante de velocidad

k': constante de velocidad de pseudoprimer orden

LDL: lipoproteína de baja densidad

LN: L-NAME

L-NAME: metil éster de N ω -nitro-L-arginina

L-NNA: N ω -nitro-L-arginina

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MDA: malondialdehído

MMP: metaloproteasa de matriz

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

NOX: NADPH oxidasa

O₂•⁻: anión superóxido

ONOO⁻: peroxinitrito

PA: presión arterial

PAS: presión arterial sistólica

PAD: presión arterial diastólica

PBS: buffer fosfato salino

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

QC: quercetina

Rac1: Rho GTPasa

SDS: dodecil sulfato de sodio

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SM: síndrome metabólico

SOD: superóxido dismutasa

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TG: triglicéridos

U: unidades

U.A.: unidades arbitrarias

XO: xantina oxidasa

Índice



ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	8
<hr/>	
1. Compuestos bioactivos de origen vegetal	9
1.1. Flavonoides	10
1.2. Flavanoles	11
1.3. Flavonoles	12
1.4. (-)-Epicatequina (EC) y quercetina (QC): fuentes alimenticias, estructura, absorción y metabolismo	12
2. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos	15
2.1. Radicales libres	15
2.1.1. Especies reactivas del oxígeno	15
2.1.2. Fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno	16
2.1.3. Reacción de especies reactivas del oxígeno con moléculas de importancia biológica	17
3. Antioxidantes	18
3.1. Definición de antioxidante	18
3.2. Defensas antioxidantes enzimáticas	19
3.3. Defensas antioxidantes no enzimáticas	21
3.4. Flavonoides como antioxidantes: mecanismos de acción antioxidante directa e indirecta	22
4. Óxido nítrico	24
4.1. Óxido nítrico: química	24
4.2. Reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido	25
4.3. Óxido nítrico sintasas (NOS)	26
4.4. Regulación de la actividad de las NOS	28
4.5. Isoformas de NOS	28
4.5.1. eNOS	28
4.5.2. nNOS	29

4.5.3. iNOS	30
5. Anión superóxido	30
5.1. Anión superóxido: química	30
5.2. NADPH oxidasas (NOX)	30
5.2.1. Isoformas de NOX	31
5.2.2. NOX2 y NOX4: localización, subunidades regulatorias y activación	33
5.2.2.1. NOX2	34
5.2.2.2. NOX4	35
6. Estrés oxidativo	37
7. Sistema circulatorio	38
7.1. Corazón	38
7.2. Cardiomiocitos	39
7.3. Arterias	40
8. NOS y NOX en el sistema cardiovascular: funciones fisiológicas	41
8.1. Señalización <i>redox</i> en corazón	41
8.2. Funciones de NOS y NOX en la vasculatura	43
8.3. Funciones de NOS y NOX en el corazón	44
9. Biodisponibilidad de NO: concentración en estado estacionario de óxido nítrico ([NO]_{EE})	45
10. Efecto de los flavonoides sobre la salud cardiovascular	47
11. Hipertensión arterial	48
12. Síndrome metabólico	50
13. Hipertrofia y remodelamiento cardíaco	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
<hr/>	
1. Hipótesis	53
2. Objetivo general	54

3. Objetivos específicos	54
---------------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	57
-----------------------------	----

1. Reactivos	57
---------------------	----

2. Animales y tratamientos	58
-----------------------------------	----

2.1. <i>Estudio 1.</i> Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME	59
---	----

2.2. <i>Estudio 2.</i> Efectos de quercetina (QC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME	60
---	----

2.3. <i>Estudio 3.</i> Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de ratas con sobrecarga de fructosa	61
--	----

3. Determinación de la presión arterial	63
--	----

4. Obtención y procesamiento de muestras biológicas	63
--	----

5. Determinación del contenido de proteínas	64
--	----

6. Determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL	64
--	----

7. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en corazón	65
--	----

8. Determinación de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en corazón	65
--	----

9. Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS)	66
--	----

10. Determinación de la producción de anión superóxido	67
---	----

11. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa	68
--	----

12. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa	70
--	----

13. Determinación de la actividad de catalasa	71
--	----

14. Determinación de la actividad de metaloproteasa de matriz	
--	--

extracelular tipo 9	72
15. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blot	73
16. Análisis histológico del corazón	75
17. Métodos estadísticos	75
RESULTADOS	76
<hr/>	
<i>Estudio 1</i>	76
1. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME	76
1.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante el tratamiento experimental	76
1.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco	78
1.3. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo	79
1.4. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de iNOS	81
1.5. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47 ^{phox} , gp91 ^{phox} y NOX4	82
1.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa	84
<i>Estudio 2</i>	86
2. Efectos de quercetina (QC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME	86
2.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante	

el tratamiento experimental	86
2.2. Efectos de quercetina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia cardíaca	87
2.3. Efectos de quercetina sobre marcadores de estrés oxidativo	88
2.4. Efectos de quercetina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de eNOS, nNOS e iNOS	90
2.5. Efectos de quercetina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47 ^{phox} y NOX4	92
2.6. Efectos de quercetina sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)	92
Estudio 3	95
3. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de ratas con sobrecarga de fructosa	95
3.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante el tratamiento experimental	95
3.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre parámetros metabólicos	96
3.3. Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco	97
3.4. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo	100
3.5. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de eNOS, nNOS e iNOS	101
3.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47 ^{phox} y NOX4	103
3.7. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa	103

DISCUSIÓN	106
<hr/>	
1. (-)-Epicatequina y quercetina: mecanismos de acción y análisis termodinámico	106
1.1. Mecanismos de acción directa e indirecta	106
1.2. Aspectos termodinámicos y cinéticos de (-)-epicatequina y quercetina como antioxidantes	107
2. Modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME	111
2.1. Cantidad administrada de (-)-epicatequina y quercetina	112
2.2. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la presión arterial	114
2.3. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre marcadores de estrés oxidativo	117
2.4. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la biodisponibilidad de NO en corazón	120
2.4.1. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la producción de NO	120
2.4.1.1. Efectos de (-)-epicatequina	120
2.4.1.2. Efectos de quercetina	122
2.4.2. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la producción de anión superóxido	124
2.5. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la actividad de enzimas antioxidantes	127
2.6. Modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME: integración de resultados	128
3. Modelo de sobrecarga de fructosa	132
3.1. Efectos de (-)-epicatequina en ratas con sobrecarga de fructosa	132
3.2. Cantidad administrada de (-)-epicatequina	133
3.3. Aspectos metabólicos generales	134
3.4. Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial	135

3.5. Marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco	136
3.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo	137
3.7. Efectos de (-)-epicatequina sobre la biodisponibilidad de NO en corazón	139
3.7.1. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de NO	139
3.7.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido	141
3.8. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de enzimas antioxidantes	143
3.9. Modelo de sobrecarga de fructosa: integración de resultados	144
4. Efectos diferenciales de (-)-epicatequina y quercetina	145
5. Consideraciones finales	147
CONCLUSIONES	149
RESUMEN	152
REFERENCIAS	155

Introducción



INTRODUCCIÓN

Los cambios en el estilo de vida que ocurrieron en las últimas décadas, así como el incremento en la longevidad permitido por los avances de la medicina, han llevado a un aumento de la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Los cuatro tipos principales de ECNT son: las enfermedades cardiovasculares (ECV), el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. Dichas enfermedades tienen gran prevalencia y generalmente son de progresión lenta, constituyendo un serio problema de salud pública.

Dentro de las ECNT, las ECV son responsables de la mayor parte de las muertes (15 millones en 2015), seguidas del cáncer (8,8 millones), enfermedades respiratorias (3,2 millones) y diabetes (1,6 millones) (OMS, Informe 2015). Este conjunto de enfermedades son causantes de alrededor del 80% de las muertes por ECNT. El consumo de tabaco, el sedentarismo, el abuso del alcohol y las dietas inadecuadas aumentan la mortalidad a causa de las ECNT. La mayor parte de estas muertes, que pueden considerarse prematuras, ocurren en países de bajos y medianos ingresos. Además, un alto porcentaje de individuos no está adecuadamente controlado o incluso diagnosticado (OMS, Informe 2015).

Dentro de las estrategias destinadas a prevenir o disminuir el riesgo de ECV se proponen cambios en el estilo de vida, incluyendo el consumo de dietas adecuadas y la realización de actividad física. El efecto de la dieta sobre la prevención y/o atenuación de las ECV ha sido ampliamente estudiado durante muchos años. Numerosos estudios corroboraron que las dietas ricas en frutas y hortalizas resultan beneficiosas para la salud previniendo ECV y también otras ECNT (Hollman 2004; Hung y col. 2004; Mennen y col. 2004; Buijsse y col. 2006; Taubert y col. 2007; Grassi y col. 2008a; Iqbal y col. 2008).

Uno de los objetivos de la investigación en el campo de la nutrición es el de establecer recomendaciones con rigurosa base científica para enriquecer la dieta en alimentos específicos y fomentar políticas destinadas a la población en general y a los

grupos de riesgo en particular. Esto obliga al avance en la identificación de los compuestos responsables de los efectos beneficiosos para la salud, así como de sus mecanismos de acción asociados a dichos efectos.

1. Compuestos bioactivos de origen vegetal

En la actualidad se estudian distintos compuestos presentes en los alimentos de origen vegetal, que serían los responsables de los efectos beneficiosos para la salud. En la literatura estos compuestos son llamados *fitoquímicos*, *fitonutrientes* o *compuestos bioactivos* aún cuando estos términos no son equivalentes y no definen con precisión al grupo de compuestos en estudio. *Fitoquímicos* involucra a todos los compuestos producidos por las plantas, mientras que *fitonutrientes* incluye a los nutrientes esenciales de origen vegetal. *Compuestos bioactivos* incluye compuestos de origen tanto vegetal como animal. Por lo tanto en esta tesis se utilizará el término *compuesto bioactivo de origen vegetal* para referirse a sustancias de origen vegetal que tienen potenciales efectos beneficiosos sobre la salud humana.

Entre los compuestos bioactivos de origen vegetal más estudiados en relación a la salud humana, se encuentran los polifenoles, alcaloides, fitoesteroles y carotenoides, entre otros (Liu 2004). Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas. Las funciones de estos compuestos en las plantas son numerosas, como ejemplos se pueden mencionar la protección contra la radiación ultravioleta, la regulación del crecimiento de la planta y como elementos estructurales en tejidos de soporte. Además, cumplen una importante función en la defensa contra el herbivorismo y diversos patógenos (bacterias, protozoos) y participan en la atracción de polinizadores a través del color y el aroma que dan a las plantas y sus flores (Harborne y col. 2000; Havsteen 2002). Con respecto a su estructura química, los polifenoles incluyen miles de variantes que abarcan desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos condensados.

1.1. Flavonoides

Los flavonoides son una familia químicamente definida de polifenoles. Se conocen más de 8000 flavonoides. Estos compuestos incluyen una serie de subclases que poseen una estructura básica en común, caracterizada por la presencia de dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por un puente de 3 carbonos que forman un heterociclo oxigenado (anillo C) (Figura 1). En base a los grupos funcionales y el grado de oxidación del anillo C los flavonoides pueden clasificarse en distintas subclases, siendo las más relevantes en la dieta humana las siguientes: flavanoles, flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas y antocianidinas (Figura 1) (Beecher 2003; Fraga 2007; Fantini y col. 2015). Además, las distintas sustituciones en los anillos A y B le dan identidad a cada compuesto dentro de una determinada subclase (Fraga y col. 2010; Marzocchella y col. 2011).

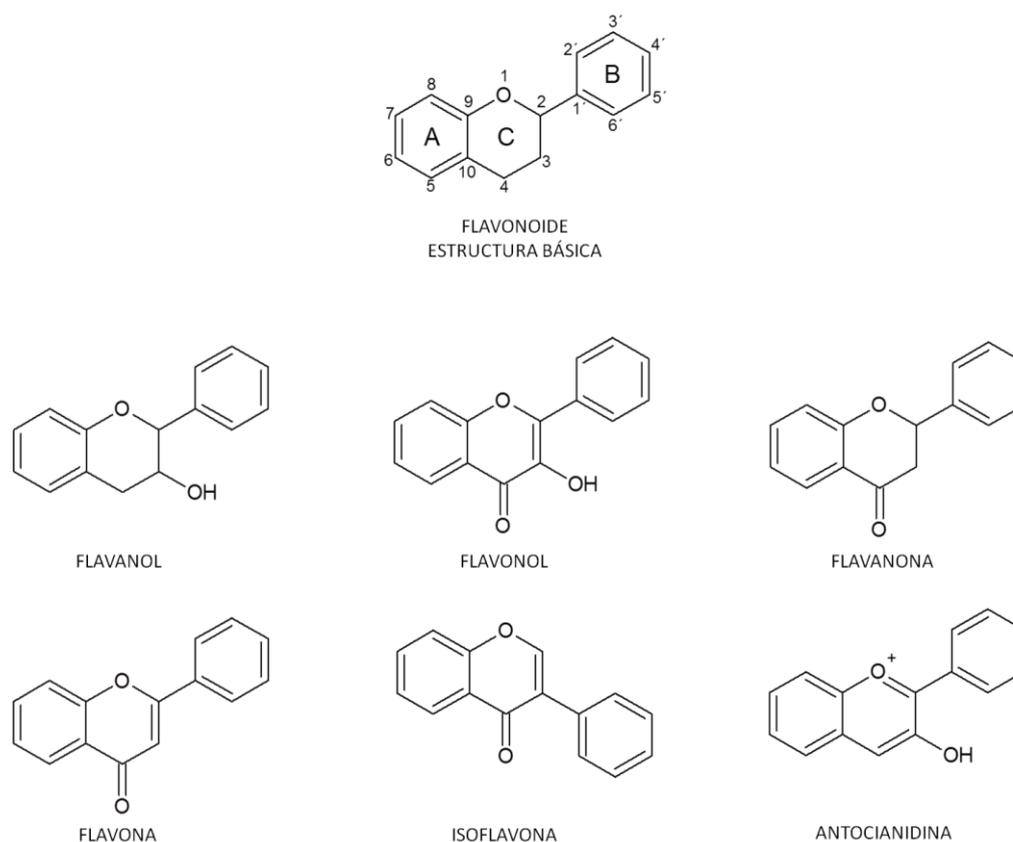


Figura 1. Estructura química de las distintas subclases de flavonoides.

1.2. Flavanoles

Los flavanoles representan una subclase de flavonoides consumidos en la dieta humana (Scalbert y col. 2000). Estos compuestos se encuentran en alta concentración en el cacao, té, uvas, nueces y manzanas, entre otros alimentos (Galleano y col. 2010a).

Los flavanoles más comunes son la (-)-epicatequina (EC), la (+)-catequina y sus galatos. La EC está presente en las plantas tanto como compuestos simples monoméricos como formando compuestos oligoméricos (procianidinas) y poliméricos (taninos) (Figura 2) (Galleano y col. 2010b).

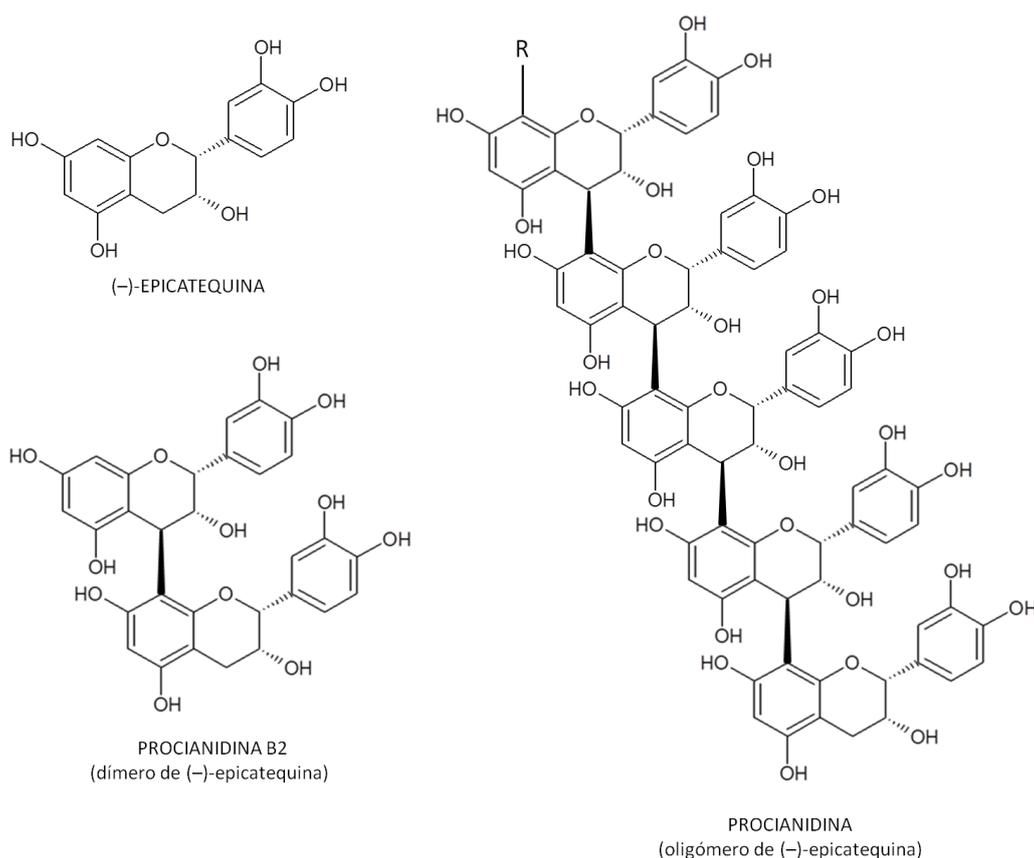


Figura 2. Estructura química de (-)-epicatequina (monómero), procianidina B2 (dímero de (-)-epicatequina) y procianidina (oligómero de (-)-epicatequina). R = monómero de (-)-epicatequina.

1.3. Flavonoles

Los flavonoles más representativos en la dieta humana son la quercetina (QC), el kaempferol y la myricetina (Figura 3). Estos compuestos se encuentran en diversas frutas y hortalizas, siendo más abundantes en la espinaca, coliflor, frutillas y diversos cítricos (Erlund 2004). La quercetina es el flavonol más ubicuo y especialmente abundante en la cebolla (Fraga 2009; Rothwell y col. 2013).

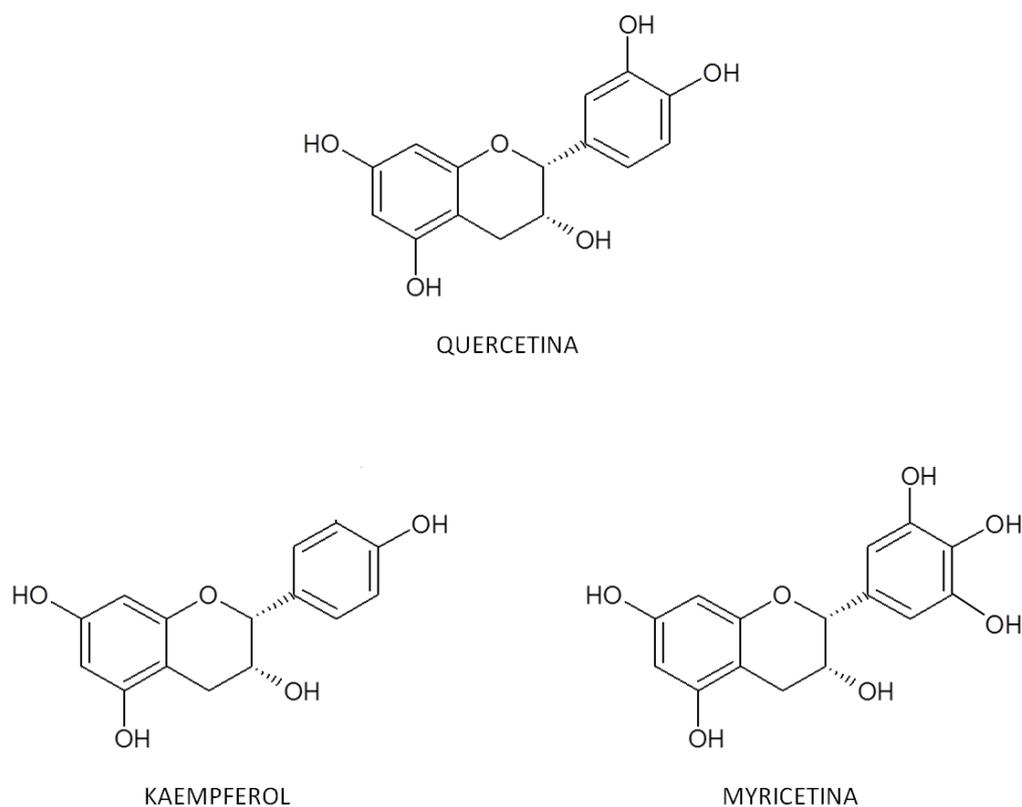


Figura 3. Estructura química de quercetina, kaempferol y myricetina.

1.4. (-)-Epicatequina (EC) y quercetina (QC): fuentes alimenticias, estructura, absorción y metabolismo

El flavanol EC y el flavonol QC son abundantes en la dieta humana, por lo cual son potencialmente importantes para la salud. Ambos presentan la estructura

básica de los flavonoides y poseen grupos hidroxilos en las posiciones 3', 4', 3, 5 y 7. La QC difiere de la EC por la presencia de un doble enlace entre la posición 2 y 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 del anillo C (Figura 4) (Bors 1990). En la Tabla 1 se detalla el contenido de dichos flavonoides en distintos alimentos y bebidas de origen vegetal.

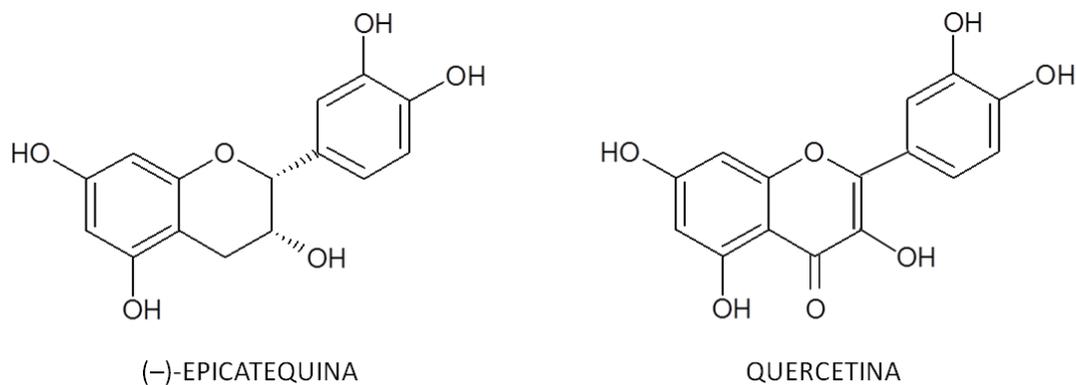


Figura 4. Estructura química de (-)-epicatequina y quercetina.

Antes de alcanzar el sistema circulatorio, los polifenoles ingeridos por vía oral estarán sujetos a distintas condiciones fisiológicas del sistema digestivo que definirán su biodisponibilidad.

La QC está presente en las plantas en su forma β -glicosilada. La deglicosilación resulta necesaria para que la QC sea absorbida por el intestino delgado (Scalbert y col. 2000). La EC, a diferencia de la QC, se encuentra presente en su forma no glicosilada, no requiriendo el paso de deglicosilación para poder ser absorbida por los enterocitos y ser metabolizada. Luego de su absorción, la EC y la QC son metabolizadas por distintos órganos (intestino delgado y grueso, hígado y riñones) dando lugar a metabolitos glucuronidados, sulfatados u *O*-metilados (Fraga 2009; Cifuentes-Gomez y col. 2015).

Tabla 1. Contenido de los flavonoides EC y QC en alimentos y bebidas.

Tipo de alimento	(-)-Epicatequina			Quercetina		
	<i>mg/100 g peso fresco</i>					
Cacao	Promedio	DE	n	Promedio	DE	n
Cacao en polvo	158	86	10	-	-	-
Chocolate amargo	70	30	16	25	0	1
Chocolate con leche	15	5	5	-	-	-
Frutas y vegetales						
Manzana	7	4	33	1,3	0,06	51
Durazno pelado	8	4	21	-	-	-
Pera	4	3	7	-	-	-
Damasco	4	3	6	4	2	6
Uva negra	5	6	2	-	-	-
Mora	12	11	2	0,72	0,1	2
Frambuesa roja	5	4	4	5	4	7
Cereza	8	3	2	-	-	-
Cebolla	-	-	-	20-100	-	78
Frutilla	0,007	-	2	3	2	2
Espinaca	-	-	-	4	1	1
Coliflor	-	-	-	1,8	-	1
<i>mg/100 ml</i>						
Bebidas	Promedio	DE	n	Promedio	DE	n
Vino tinto	4	3	137	0,8	0,5	208
Vino blanco	0,9	1	29	0,04	0,2	12
Leche chocolatada	6	5	3	9	11	2
Té verde	8	14	76	0,7	1	60
Té negro	4	4	98	2	4	93
Naranja jugo	-	-	-	1	0,8	4

DE: desviación estándar; n: número de valores de contenido. Información tomada de la base de datos on line Phenol-explorer 3.6 database (Rothwell y col. 2013) y del libro Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology (Fraga 2009).

2. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos

2.1. Radicales libres

Los radicales libres son átomos o moléculas con un número impar de electrones debido a la presencia de uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos. Un electrón desapareado es aquel que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo. Debido a esta característica, son especies químicas altamente reactivas (Pryor 1976). Los radicales libres más importantes en los sistemas biológicos son aquellos derivados del oxígeno (Gutteridge y col. 1989; Halliwell 1989*a*; Halliwell y col. 1989*b*), como ejemplos se pueden mencionar: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el radical peroxilo ($ROO\bullet$). El oxígeno molecular (O_2) posee un número par de electrones pero presenta dos electrones desapareados en dos orbitales diferentes, por lo cual puede considerarse un radical libre. El O_2 reacciona rápidamente con radicales libres formando otros radicales que son más reactivos y que causan oxidación selectiva de lípidos, proteínas o ADN (Halliwell 2007*a*; Halliwell 2007*b*).

2.1.1. Especies reactivas del oxígeno

En los organismos aeróbicos, durante el proceso de respiración celular mediante el cual se produce ATP, el O_2 se reduce a agua. En los pasos intermedios de la reducción secuencial del O_2 se forman distintas especies químicas: $O_2^{\bullet-}$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y $\bullet OH$, correspondientes a los pasos de reducción por uno, dos y tres electrones, respectivamente (Sies 1997; Kalyanaraman 2013) (Figura 5). Además, el O_2 puede ser excitado para formar oxígeno singulete (1O_2). El H_2O_2 no es un radical libre pero es precursor de radicales libres y actúa como molécula señal en distintos procesos fisiológicos como la diferenciación y migración celular (Reczek y col. 2015). El término especies reactivas del oxígeno surge para describir al conjunto de los compuestos arriba mencionados y que poseen alta reactividad.

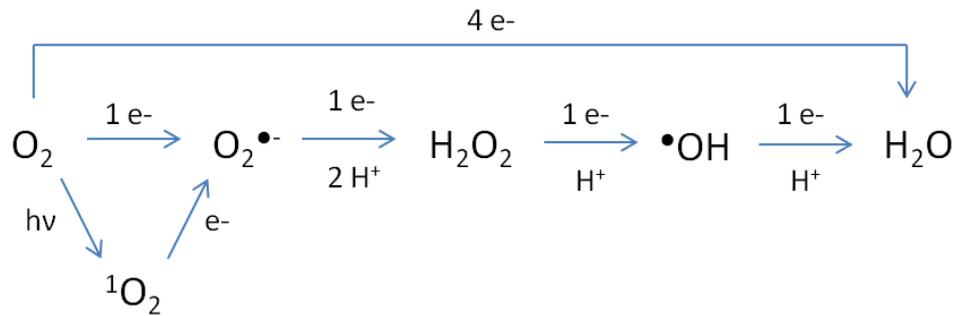


Figura 5. Reducción secuencial del O_2 a agua y especies químicas intermediarias. Oxígeno molecular (O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$), oxígeno singlete (1O_2) y agua (H_2O).

2.1.2. Fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno

Existen distintas fuentes de generación de especies reactivas del oxígeno en las células de mamíferos: la mitocondria, las enzimas xantina oxidasa, ciclooxigenasa, oxidasa de peroxisomas, citocromo p450 y la familia de las enzimas NADPH oxidasas (NOX).

La función primaria de la mitocondria es la producción de ATP a través del proceso de fosforilación oxidativa. Durante este proceso se produce anión superóxido como consecuencia del transporte de electrones al O_2 a través de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. En situaciones donde se altera la función mitocondrial, que puede ocurrir en ciertas enfermedades o bien por toxicidad ambiental, el mecanismo de transporte de electrones de la cadena mitocondrial está afectado y se produce una mayor generación de especies reactivas del oxígeno.

La xantina oxidasa reduce el O_2 para formar anión superóxido como intermediario primario, proceso mediante el cual la xantina es convertida a ácido úrico (Kalyanaraman 2013). La ciclooxigenasa y la lipoxigenasa generan ROO^{\bullet} como intermediario en la producción de hidroperóxidos ($ROOH$) (Schneider y col. 2007).

En contraste con las enzimas arriba mencionadas, las cuales producen especies oxidantes como productos secundarios, las NADPH oxidasas (NOX) son una familia de enzimas que generan anión superóxido o H_2O_2 como productos primarios de su actividad.

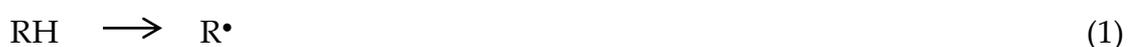
2.1.3. Reacción de especies reactivas del oxígeno con moléculas de importancia biológica

La consecuencia más importante del daño producido por las especies reactivas del oxígeno son las alteraciones de las funciones celulares debidas a la oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El daño al ADN puede generar mutaciones que, de no ser reparadas, pueden llevar a alteraciones en la expresión génica. Las modificaciones en las proteínas causadas por las especies reactivas del oxígeno incluyen la formación de carbonilos y la nitración de tirosinas, lo que puede alterar su función (Houee-Levin y col. 2015; Trnkova y col. 2015).

Los lípidos también sufren daño oxidativo a través de una reacción mediada por especies reactivas del oxígeno con los lípidos, denominada peroxidación lipídica. En presencia de oxidantes como $\bullet OH$, dióxido de nitrógeno (NO_2) y $\bullet OOH$ se puede generar un radical centrado en carbono mediante la oxidación de un ácido graso insaturado. El radical formado puede reaccionar con el O_2 para formar $ROO\bullet$, lo cual puede resultar sumamente perjudicial ya que esta especie puede iniciar y propagar una reacción en cadena que ocasione la destrucción y/o modificación de numerosas moléculas de lípidos (Heinrich y col. 2013).

La peroxidación lipídica puede ser descripta como una reacción en cadena ya que comprende las distintas etapas de este tipo de reacciones: iniciación, propagación y terminación (ecuaciones 1-10).

Iniciación:



Propagación:



Terminación:



En donde RH representa la molécula de un lípido, $R\cdot$ un radical libre, $ROO\cdot$ un radical libre peroxilo y $ROOH$ un hidroperoxilo, todos ellos derivados del RH.

3. Antioxidantes

3.1. Definición de antioxidante

El concepto clásico de antioxidante fue definido por Halliwell y Gutteridge en 1989 como una *sustancia que estando presente en concentraciones menores que el sustrato oxidable, retarda o inhibe la oxidación del mismo* (Halliwell y col. 1989b).

Los organismos aeróbicos disponen de un conjunto de defensas antioxidantes para controlar los niveles de oxidantes. Las mismas incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos de detoxificación de estas especies. Entre los primeros se encuentran enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa, mientras que el segundo grupo incluye moléculas antioxidantes de bajo peso molecular como glutatión, ubiquinol, α -tocoferol y ácido ascórbico.

3.2. Defensas antioxidantes enzimáticas

La superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa son las principales enzimas encargadas de la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Se conocen tres isoformas de SOD: la cobre-zinc-SOD citoplasmática (CuZn-SOD), la cobre-zinc-SOD extracelular (EC-SOD) y la manganeso-SOD (Mn-SOD) mitocondrial. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido a H_2O_2 y O_2 , aumentando la velocidad de reacción 10^4 veces (ecuaciones 11 y 12) (Fridovich 1983; Kalyanaraman 2013). La SOD disminuye la concentración en estado estacionario del anión superóxido ($[\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{EE}}$). La suposición del estado estacionario asume que en un momento puntual la velocidad de producción de una especie química se iguala a su velocidad de degradación y que la concentración resultante es la responsable de su biodisponibilidad.



SOD

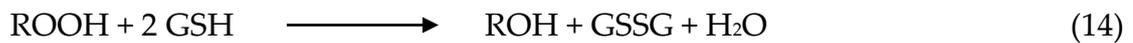


A diferencia del anión superóxido, el H_2O_2 generado es más estable y puede difundir a otros compartimentos de la célula. La catalasa y la GPx se encargan de descomponer el H_2O_2 .

La catalasa se localiza principalmente en los peroxisomas y posee una actividad de peroxidasa específica para H_2O_2 . Esta enzima cataliza la reducción de H_2O_2 a O_2 y H_2O de acuerdo con la siguiente reacción:



La GPx, distribuida en el citosol y la mitocondria, cataliza la reacción de hidroperóxidos con glutatión reducido (GSH) para formar glutatión oxidado (GSSG) y el producto de reducción del hidroperóxido, utilizando como dador de electrones al NADPH (ecuación 14).



Dentro de las células, el GSH es regenerado a partir del GSSG formado por medio de una reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR) dependiente de NADPH. La dinámica de toda la maquinaria de enzimas antioxidantes se muestra en la Figura 6.

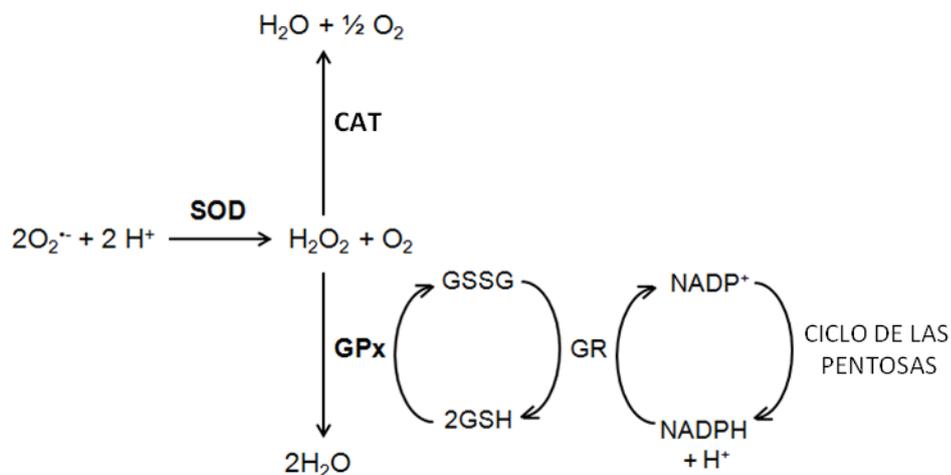
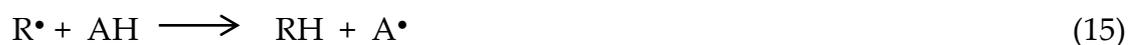


Figura 6. Detoxificación enzimática de anión superóxido y H_2O_2 . SOD: superóxido dismutasa, GPx: glutatión peroxidasa, CAT: catalasa, GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado, GR: glutatión reductasa, NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida, NADP^+ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma oxidada (tomado y modificado de Weydert y col. 2010 y Kalyanaraman 2013).

3.3. Defensas antioxidantes no enzimáticas

Además de los mecanismos de defensas antioxidantes enzimáticas ya descritos, existen moléculas de bajo peso molecular que actúan como antioxidantes no enzimáticos, siendo los de mayor importancia el GSH, el ácido ascórbico (Vitamina C) y el α -tocoferol (Vitamina E) (Halliwell 1989a; Buettner 1993; Valko y col. 2007). Estos compuestos actúan esencialmente como atrapadores de radicales libres de acuerdo a la reacción descrita en la siguiente ecuación:



En donde $R\bullet$ representa un radical libre que es reducido a RH (por la ganancia de un electrón y un protón) al reaccionar con el antioxidante AH. En este proceso se genera $A\bullet$, el radical de AH. La eficiencia de AH como antioxidante dependerá de que su reactividad sea mucho menor que la de $R\bullet$, de tal manera que disminuya la velocidad de propagación de la reacción en cadena de los radicales libres y facilite de esa manera reacciones de terminación que generan productos no nocivos (Machlin y col. 1987).

El glutatión es un compuesto hidrosoluble que se presenta en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) de manera abundante en citosol, núcleo y mitocondria, siendo el GSH el principal antioxidante hidrosoluble en dichos compartimentos (Valko y col. 2007). El GSH, además de actuar atrapando radicales libres, es un cofactor de las enzimas GPx y glutatión transferasa (Masella y col. 2005). La relación entre los niveles de GSH y GSSG se utiliza para evaluar el estado de oxidación-reducción (o *redox*) del tejido.

El ácido ascórbico (AsCH) es una cetolactona soluble que posee dos grupos hidroxilos ionizables. A pH fisiológico, el AsCH se presenta predominantemente como anión ascorbato (Asc^-). El Asc^- es un buen agente reductor ya que experimenta

dos oxidaciones consecutivas para formar el radical ascorbato (Asc^\bullet) y ácido dehidroascórbico (DHA), respectivamente.

El α -tocoferol es un antioxidante liposoluble incorporado al organismo a través de la dieta. Dicho compuesto se incorpora en las membranas celulares en donde preserva su integridad e inhibe la peroxidación de lípidos. Este compuesto puede donar un electrón a un radical libre y generar el radical α -tocoferilo que es más estable que el radical original y puede volver a convertirse en α -tocoferol al reaccionar con otros antioxidantes no enzimáticos.

3.4. Flavonoides como antioxidantes: mecanismos de acción antioxidante directa e indirecta

Los flavonoides han sido ampliamente reconocidos por tener una acción antioxidante (Bors 1990; van Acker y col. 1998; Rice-Evans 2001; Chang y col. 2007). Tanto EC como QC poseen una estructura química que les permite actuar como antioxidantes clásicos (atrapar radicales libres y quelar metales prooxidantes) (Figura 7). Se ha postulado que la capacidad de neutralizar radicales libres sería el origen de sus efectos beneficiosos para la salud (Bazzano y col. 2002; Rimm 2002; Touyz 2003a; Hung y col. 2004).

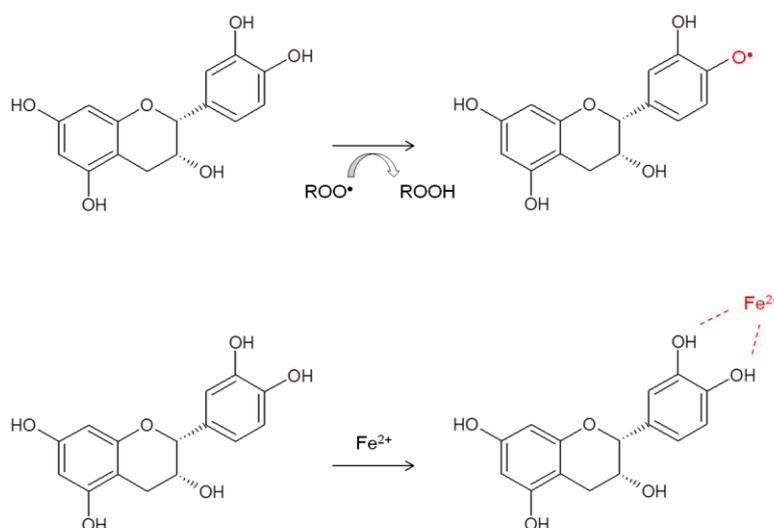


Figura 7. Reacción de flavonoides con radicales libres y como atrapadores de metales prooxidantes.

Sin embargo, la baja concentración alcanzada en los tejidos (concentraciones plasmáticas en el orden nanomolar) y la alta velocidad de metabolización de estos compuestos no son consistentes con esta hipótesis (Galleano y col. 2010b).

Existen diversos mecanismos mediante los cuales se podría lograr un efecto antioxidante (Halliwell y col. 2005; Fraga 2007; Fraga y col. 2010; Galleano y col. 2010b; Mladenka y col. 2010), los mismos involucran dos tipos de acciones:

- i. *acción antioxidante directa*: involucra reacciones de atrapamiento de radicales libres y secuestro de metales prooxidantes.
- ii. *acción antioxidante indirecta*: implica interacciones con estructuras celulares o moléculas específicas que mediante uno o más pasos resultan en la disminución de las especies reactivas del oxígeno en el sistema. Un ejemplo de este tipo de mecanismo es la inhibición de enzimas productoras de anión superóxido. Este tipo de acción no requiere que el antioxidante interactúe directamente con los radicales libres o metales prooxidantes.

Es así que en los últimos años se ha incrementado la evidencia acerca de otros posibles mecanismos de acción antioxidante indirecta, de mayor especificidad, que ejercerían los flavonoides y que serían responsables de los efectos *in vivo* en los cuales estarían involucrados. Dentro de estos mecanismos indirectos se puede incluir:

- i. alteraciones de ciertas propiedades de las membranas celulares y de la función de los receptores (Verstraeten y col. 2005; Erlejman y col. 2006; Sirk y col. 2009).
- ii. regulación de la actividad y expresión de enzimas, especialmente aquellas involucradas en la producción de óxido nítrico y anión superóxido (Middleton y col. 2000; Mervaala y col. 2001).

- iii. modulación de la señalización celular y expresión génica (Mackenzie y col. 2004; Erlejman y col. 2008).

4. Óxido nítrico

4.1. Óxido nítrico: química

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa, soluble tanto en medios acuosos como lipídicos. Se trata de un radical libre por poseer un electrón desapareado, pero no presenta una reactividad tan elevada como otros radicales libres (Valko y col. 2007; Heinrich y col. 2013). Es capaz de difundir rápidamente a través del citoplasma y de las membranas plasmáticas. Su vida media en sistemas biológicos es menor a 5 s (Ignarro 1990; Duarte y col. 2001*a*).

El efecto del NO como un potente factor de relajación dependiente del endotelio fue propuesto por primera vez por Furchgott e Ignarro en 1986 (Ignarro y col. 1986; Martin y col. 1986) y confirmado en trabajos posteriores (Ignarro y col. 1987; Furchgott y col. 1989).

Además es una molécula de gran relevancia en la fisiología cardiovascular ya que participa en la regulación de la PA, la frecuencia cardíaca, la contractibilidad cardíaca y vascular, así como en la vasorelajación. El NO ejerce funciones en diversos procesos fisiológicos en el sistema nervioso e inmune.

El NO es producido por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina, NADPH y O₂, siendo sus productos L-citrulina, NADP⁺ y NO. La producción de NO requiere de la presencia de varios cofactores, incluyendo tetrahidrobiopterina (BH₄), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), calmodulina (CaM) y el grupo hemo (Figura 8).

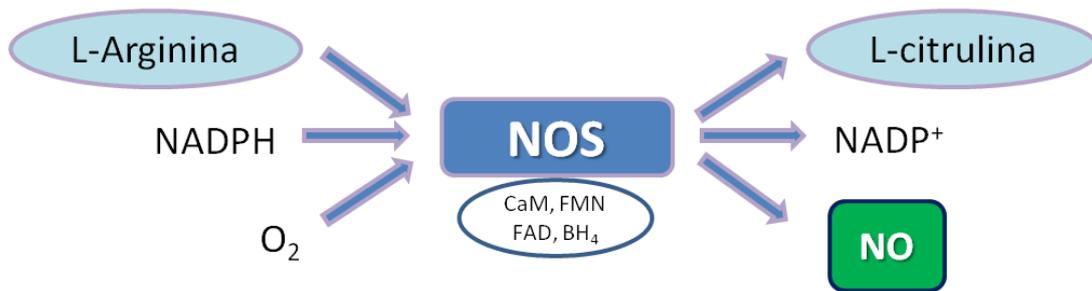


Figura 8. Esquema de la generación de NO a partir de L-arginina.

4.2. Reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido

El NO puede reaccionar con el anión superóxido a una velocidad cercana al límite de difusión ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para formar peroxinitrito (ONOO^-) (ecuación 16) (Huie y col. 1993).



Existen dos consecuencias fundamentales de la reacción entre el NO y el anión superóxido: i) el consumo de NO y ii) la formación de ONOO^- que es un potente oxidante y puede reaccionar con grupos tioles libres o unidos a proteínas (Radi y col. 1991; Hughes 2008).

Los mecanismos mediante los cuales el NO y otras especies derivadas de él, como el ONOO^- , el ion nitrosonio (NO^+), el dióxido de nitrógeno (NO_2), el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) y S-nitrosotioles reaccionan con sus blancos biológicos se pueden clasificar en tres tipos de reacciones diferentes:

- i. Nitrosación: adición de un grupo NO^+ a un centro nucleofílico (tiol o amina), de manera directa o por transferencia de un dador de NO^+ (N_2O_3) para generar compuestos tipo R-NO.

- ii. Nitrosilación: coordinación de NO con un metal (M) para formar un complejo tipo M-NO, por una reacción directa con el NO. Como ejemplo de relevancia fisiológica de este tipo de reacción se puede mencionar la unión covalente de NO al grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (GCs) (Ignarro 1999).
- iii. Nitración: cualquier proceso que lleve a la formación de nitrocompuestos tipo R-NO₂. Un ejemplo destacable en este caso es la nitración de los residuos tirosina de las proteínas para formar 3-nitrotirosinas (Radi y col. 1991). Las 3-nitrotirosinas pueden determinarse mediante la técnica de western blot utilizando anticuerpos anti-nitrotirosina para caracterizar o indicar daño a proteínas mediado por ONOO⁻ (Heinrich y col. 2013).

4.3. Óxido nítrico sintasas (NOS)

Se han identificado tres genes que codifican para isoenzimas de NOS que están presentes en el sistema cardiovascular: NOS endotelial (eNOS o NOS3), NOS neuronal (nNOS o NOS1) y NOS inducible (iNOS o NOS2) (Andrew y col. 1999; Alderton y col. 2001; Forstermann y col. 2012). Se ha descrito una NOS mitocondrial que correspondería a una variante de splicing de la nNOS: α -nNOS (mtNOS) (Elfering y col. 2002). Las isoformas eNOS y nNOS se expresan constitutivamente mientras que la expresión de iNOS se induce frente a distintos estímulos proinflamatorios como por ejemplo lipopolisacárido bacteriano (LPS) o ciertas citoquinas (INF- γ , TNF- α , IL-1 β).

Estructuralmente, las tres isoformas son sintetizadas como monómeros (Figura 9) y requieren de la formación de dímeros para unirse al sustrato L-arginina y a BH₄ para catalizar la producción de NO (Rafikov y col. 2011). Cada monómero está constituido por dos dominios:

- i. Dominio oxigenasa: N-terminal con sitios de unión para el grupo hemo, BH_4 , O_2 y L-arginina.
- ii. Dominio reductasa: C-terminal con sitios de unión para NADPH, FMN y FAD.

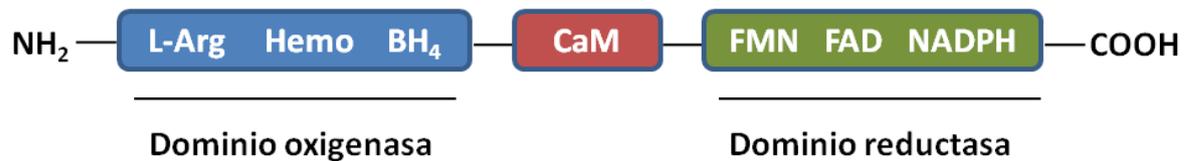


Figura 9. Monómero de NOS.

Ambos dominios están ligados por el sitio de reconocimiento a calmodulina (CaM), lo que asegura una transferencia de electrones eficiente, facilitando el flujo de electrones desde el NADPH del dominio reductasa hacia el grupo hemo del dominio oxigenasa, vía FMN-FAD. En el dominio oxigenasa, el O_2 es reducido e incorporado al grupo guanidina de la L-arginina dando lugar a la formación de NO (Figura 12) (Alderton y col. 2001; Zhang, M. y col. 2014).

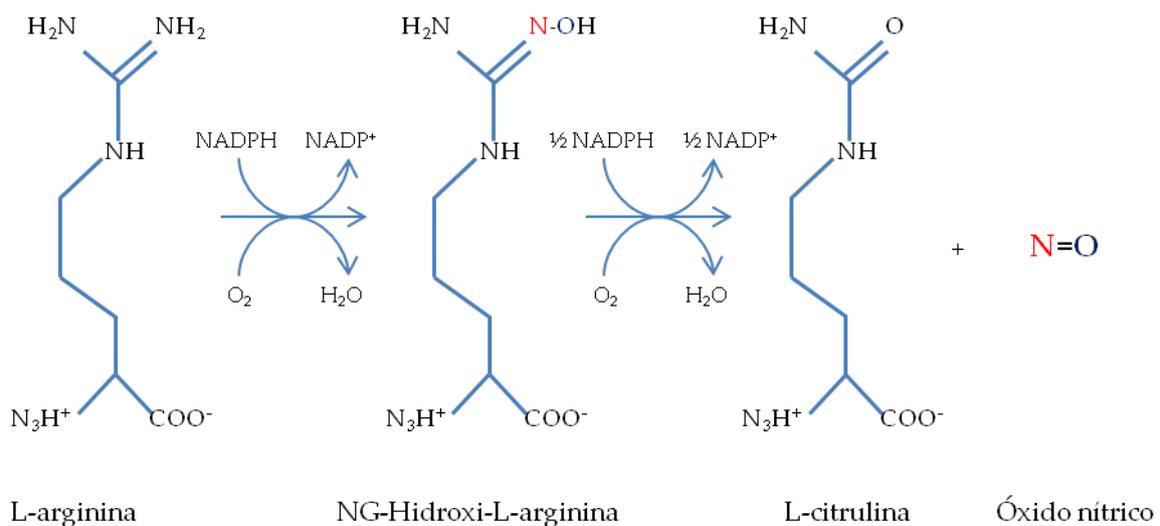


Figura 10. Incorporación de O_2 a L-arginina en el dominio oxigenasa.

4.4. Regulación de la actividad de las NOS

Todas las isoformas de NOS son activadas por unión al complejo Ca^{2+} -CaM. La iNOS presenta mayor afinidad a dicho complejo que las otras isoformas, por lo cual resulta un factor no limitante para su actividad, mientras que sí lo es para las isoformas eNOS y nNOS. La actividad de las NOS también dependerá de la disponibilidad de sustrato y cofactores como la L-arginina, BH_4 y NADPH (Herrera y col. 2005). Además, su actividad está regulada por diferentes modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilaciones, desfosforilaciones e interacciones proteína-proteína (Michell y col. 2002; Fulton y col. 2005; Loot y col. 2009).

El NO tiene un área de difusión limitada dada la abundancia de otras proteínas y moléculas que interactúan con él (como la mioglobina abundante en cardiomiocitos). Esto hace que la compartimentalización de las NOS, o su translocación hacia sitios cercanos a sus proteínas blanco, sea esencial para ejercer su función de manera eficiente.

4.5. Isoformas de NOS

4.5.1. eNOS

La isoforma endotelial de NOS es de expresión constitutiva y se localiza en estructuras de la membrana plasmática llamadas caveolas. En dichas estructuras la eNOS interactúa con la proteína caveolina, la cual inhibe su actividad y cuya asociación está regulada por el complejo Ca^{2+} -CaM. La eNOS está presente en distintos tipos celulares siendo los principales las células endoteliales vasculares, cardiomiocitos y neuronas del sistema nervioso central (Feron y col. 1996; Danson y col. 2005).

Distintos estímulos inician la activación de eNOS, entre los cuales se encuentran: la fuerza de rozamiento de las arterias, la acetilcolina, la histamina y la bradiquinina, entre otros. A su vez, la activación puede darse por mecanismos tanto

dependientes como independientes de Ca^{2+} (Bae y col. 2003; Li y col. 2003; Mondillo y col. 2009; Andrews y col. 2010; Kolluru y col. 2010).

Las modificaciones postraduccionales, particularmente la fosforilación de eNOS en sitios específicos, son un mecanismo importante de regulación de la actividad de la enzima y es un proceso independiente de los niveles de Ca^{2+} . Se han identificado 7 sitios susceptibles de fosforilación de eNOS en humanos: Ser¹¹⁷⁷, Ser¹¹⁴, Ser⁶¹⁵, Ser⁶³³, Tyr⁸¹, Thr⁴⁹⁵ y Tyr⁶⁵⁷ (Qian y col. 2013; Oliveira-Paula y col. 2016).

4.5.2. nNOS

La isoforma neuronal de NOS fue identificada inicialmente en neuronas y posteriormente en células musculares lisas y esqueléticas y en otros tipos celulares. En los cardiomiocitos la nNOS se localiza en el retículo sarcoplasmático (RS) y en la membrana plasmática (Feron y col. 1996; Bendall y col. 2004). La nNOS se expresa constitutivamente y requiere de su asociación al complejo Ca^{2+} -CaM para su activación (Liu y col. 2008).

En los cardiomiocitos, el NO derivado de la nNOS provee una regulación intrínseca de su contracción y relajación. La nNOS atenúa la respuesta inotrópica al modular la actividad de los canales de calcio tipo-L en la membrana plasmática, mediante S-nitrosilación o mecanismos GMPc dependientes, con el fin de reducir la concentración de Ca^{2+} intracelular. La S-nitrosilación es un proceso mediante el cual el NO modifica grupos tioles de residuos cisteína como mecanismo de modificación postraducciona (Stamler y col. 2001). Además, la nNOS facilita la relajación del cardiomiocito al promover la recaptación de Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el RS, a través de la proteína calcio ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA) (Massion y col. 2003; Sears y col. 2003; Zhang, Y. H. y col. 2014).

4.5.3. iNOS

La iNOS se expresa principalmente en macrófagos cumpliendo una función en la defensa inmune, siendo su expresión y actividad estimulada por citoquinas

proinflamatorias (IL-1, IFN- γ y TNF- α) y lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas (Bogdan 2015). También se expresa en endotelio vascular, células musculares lisas, corazón y riñón, entre otros. La iNOS es una enzima citosólica que, a diferencia de eNOS y nNOS, no requiere de niveles altos de Ca²⁺ para su activación. Una vez inducida, la iNOS produce cambios en la concentración de NO mucho mayores que las NOS constitutivas (Beck 1999; Bogdan 2015).

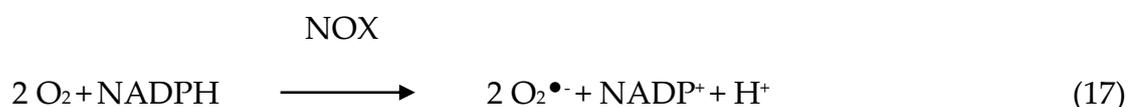
5. Anión superóxido

5.1. Anión superóxido: química

El anión superóxido es un radical libre del oxígeno que se produce fisiológicamente por la reducción parcial univalente del O₂ molecular. El anión superóxido puede dismutar a H₂O₂ espontáneamente o enzimáticamente por acción de la SOD, como se indicó en la sección 3.2. Debido a su carga negativa, el anión superóxido no puede difundir a través de la membrana plasmática. Es así que sería probable que muchas de sus acciones de señalización fueran mediadas directamente por su producto de dismutación, el H₂O₂, el cual no posee carga. Además, existe evidencia de la presencia de canales capaces de transportar anión superóxido hacia el citosol (Lassegue 2007).

5.2. NADPH oxidasas (NOX)

Las NADPH oxidasas (NOX) son una familia de enzimas heteromultiméricas asociadas a membrana, cuya función exclusiva es producir anión superóxido y H₂O₂. Para ello catalizan la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O₂, para generar anión superóxido (ecuación 17).



Históricamente, las NOX se han conocido por su función en la defensa inmunológica de los neutrófilos. Sin embargo, en los últimos 20 años, las NOX y el anión superóxido y el H_2O_2 derivados de su actividad se han identificado como moduladores esenciales de varias vías de señalización celular (Brown, D. I. y col. 2009; Brandes y col. 2014a). Entre las funciones fisiológicas de las NOX podemos mencionar roles en el crecimiento celular, proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. También participarían en procesos más especializados como la defensa inmune, regulación del tono vascular, modulación de los niveles de fosforilación de enzimas al actuar sobre proteínas quinasas y fosfatasas, regulación de la expresión génica activando factores de transcripción, entre otros (Lassegue y col. 2012; Zhang y col. 2013).

Tanto la actividad exacerbada de NOX como su deficiencia han sido asociadas a diferentes situaciones patológicas. La producción aumentada de especies reactivas del oxígeno debida a una actividad aumentada de distintas isoformas de NOX, se ha descrito en varias patologías incluyendo a la ECV, diabetes, obesidad, cáncer y neurodegeneración. En relación a aquellas enfermedades asociadas a la deficiencia de NOX podemos mencionar la enfermedad granulomatosa crónica, cuyos pacientes se encuentran inmunosuprimidos y susceptibles a infecciones ya que carecen de una isoforma de NOX (NOX2) necesaria para combatir a los patógenos durante la respuesta inmune (Dinauer 2014; O'Neill y col. 2015).

5.2.1. Isoformas de NOX

Además de estar presente en tejidos con actividad fagocítica, la NOX es considerada una de las principales fuentes de producción de anión superóxido en el sistema cardiovascular (Griendling y col. 2000). En la actualidad se conocen 7 isoformas de NOX en células de mamíferos, que se distinguen en base a su subunidad catalítica: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2 (Figura 11).

Estructuralmente, todos los miembros de la familia de las NOX poseen una subunidad catalítica de membrana con 6 dominios transmembrana y dominios de unión a FAD y NADPH en la región C-terminal, además de dos grupos hemo. Las distintas isoformas presentan diferencias en cuanto a sus requerimientos de subunidades citosólicas regulatorias y mecanismos de activación (Figura 11) (Santillo y col. 2015).

Las isoformas NOX1, NOX2 y NOX3 poseen mecanismos de activación similares e involucran el reclutamiento a membrana de subunidades regulatorias citosólicas (Brown, D. I. y col. 2009). La actividad de NOX4 es constitutiva, no requiere de subunidades regulatorias y estaría regulada principalmente por su nivel de expresión (Schroder y col. 2009; von Lohneysen y col. 2012). En contraste, NOX5, DUOX1 y DUOX2 contienen sitios de unión al Ca^{2+} que las hace directamente dependientes de la concentración del mismo. DUOX1 y DUOX2 además requieren de subunidades citosólicas (DUOXA1 y DUOXA2, respectivamente) para su activación (Brown, D. I. y col. 2009; Brandes y col. 2014*b*; Santillo y col. 2015).

Otra característica distintiva es el tipo de especie reactiva del oxígeno que liberan: NOX1, NOX2, NOX3 y NOX5 liberan anión superóxido, mientras que NOX4, DUOX1 y DUOX2 liberan H_2O_2 .

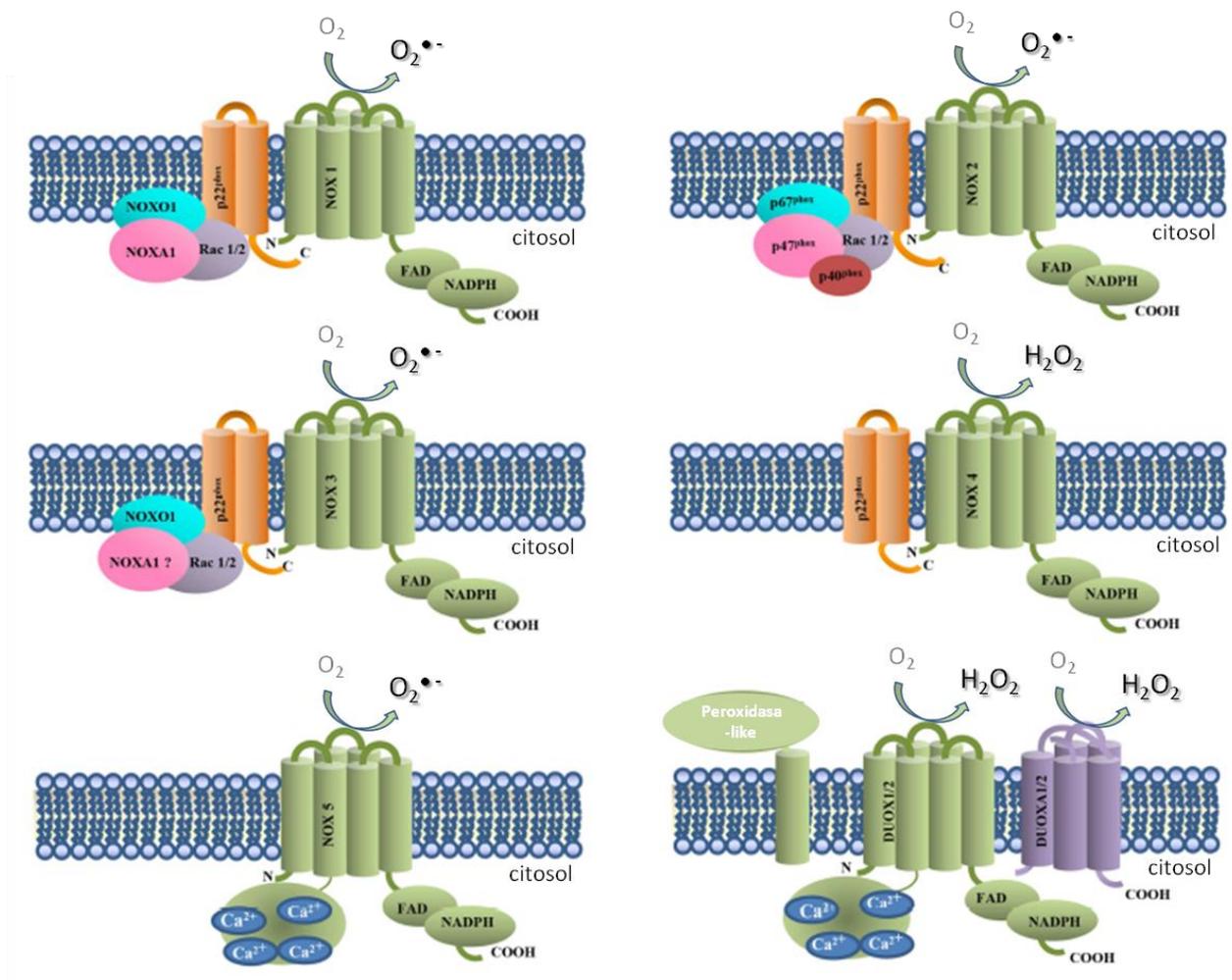


Figura 11. Composición de los complejos enzimáticos de las distintas isoformas de NOX (esquema tomado y modificado de Santillo y col. 2015).

5.2.2. NOX2 y NOX4: localización, subunidades regulatorias y activación

Se describirán los mecanismos de activación de NOX2 y NOX4 en corazón, ya que son las isoformas más abundantes en este tejido (Maejima y col. 2011) y las cuales fueron particularmente estudiadas en esta tesis.

Tanto NOX2 como NOX4 están presentes en todos los tipos celulares del tejido cardíaco como células musculares lisas de la pared de los vasos, células endoteliales, fibroblastos cardíacos y cardiomiocitos. Ambas isoformas poseen similitudes estructurales que comparten con las otras isoformas de NOX. Sin

embargo, como se indicó en la sección 5.2.1., NOX2 y NOX4 poseen propiedades marcadamente diferentes entre sí en cuanto a la regulación de su actividad, localización subcelular y potenciales funciones en el sistema cardiovascular.

5.2.2.1 NOX2

NOX2 se localiza en la membrana plasmática y es activada por diversos estímulos (Byrne y col. 2003). Entre los factores que estimulan la activación de la NOX2 se encuentran la angiotensina II, factores de crecimiento, citoquinas, hipoxia y estímulos mecánicos, los cuales inducen el reclutamiento de las subunidades citosólicas regulatorias y activan la enzima (Hordijk 2006; Sirker y col. 2011).

La subunidad catalítica NOX2, también conocida como gp^{9phox}, forma un heterodímero de membrana con la subunidad p22^{phox}. Para su activación, requiere la translocación y acoplamiento a membrana de la proteína Rac1 (GTPasa) y de sus subunidades citosólicas regulatorias p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}.

La subunidad p67^{phox} es una subunidad activadora que se une al sitio de activación. Esta subunidad requiere, para estabilizar y fortalecer su unión, la presencia de la subunidad organizadora p47^{phox}. Ésta última actúa como una proteína adaptadora, ya que se une a p22^{phox} y permite la aproximación de p67^{phox} a NOX2. Un paso esencial para la activación de NOX2 es la fosforilación de p47^{phox} en residuos serina mediada por distintas proteínas quinasas (PKC, PKA, Akt) (Drummond y col. 2011). Dicha fosforilación deja en exposición los sitios SH3, PR y PX de p47^{phox} para su unión a p22^{phox}, p67^{phox} y fosfolípidos de membrana (PIP3), respectivamente, para lograr un ensamblado estable del complejo enzimático (Figura 12).

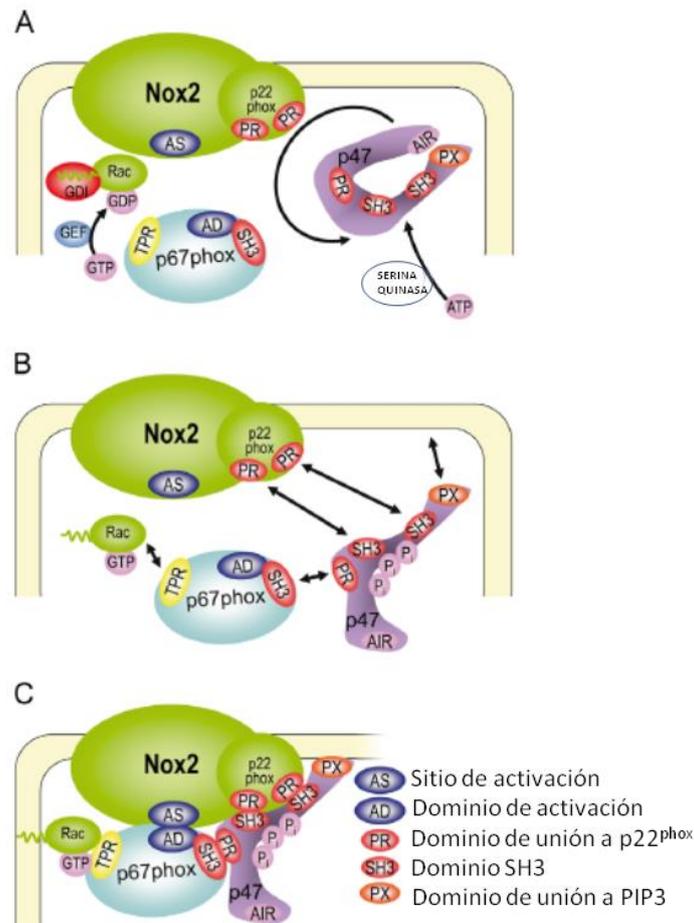


Figura 12. Activación de NOX2. A) Fosforilación de la subunidad p47^{phox} por proteínas quinasa. B) Exposición de los sitios SH3, PR y PX de p47^{phox} para su unión a p22^{phox}, p67^{phox} y fosfolípidos de membrana (PIP3), respectivamente. C) Complejo enzimático ensamblado y activado (esquema tomado y modificado de Brandes y col. 2014b).

5.2.2.2 NOX4

En marcado contraste con la NOX2 (y las otras isoformas), NOX4 posee actividad constitutiva que no requiere de su asociación con subunidades citosólicas para activarse. Se regula principalmente por cambios en la expresión de su ARN mensajero (Serrander y col. 2007). NOX4 se localiza en membranas de compartimentos intracelulares como mitocondrias, retículo endoplasmático y núcleo (Zhang y col. 2010). Además, existe evidencia de que NOX4 libera directamente H₂O₂, en lugar de anión superóxido (Serrander y col. 2007; Dikalov y col. 2008; Takac y col. 2011). Se sugiere que la propiedad de NOX4 de producir H₂O₂ se debe a una

característica estructural: la presencia de un loop que difiere significativamente de aquellos presentes en las otras isoformas de NOX. Este loop contiene un motivo rico en histidinas altamente conservado que podría prevenir la liberación de anión superóxido y/o podría proveer protones para la dismutación del anión superóxido y así liberar directamente H₂O₂ (Maejima y col. 2011; Sirker y col. 2011; Takac y col. 2011).

Una observación a tener en cuenta es que distintas isoformas de NOX coexisten en células y tejidos. La compartimentalización y localización subcelular diferencial de las NOX dentro de la misma célula, permitiría desencadenar respuestas fisiológicas diferentes frente a distintos estímulos externos (Brown, D. I. y col. 2009; Maejima y col. 2011). En la Tabla 2 se resumen las características principales de NOX2 y NOX4 en cuanto a su activación, regulación y localización.

Tabla 2. Actividad, regulación y expresión de las isoformas predominantes en tejido cardíaco: NOX2 y NOX4.

	NOX2	NOX4
Actividad	activada por estímulo ¹	constitutiva ²
Requerimiento de p22^{phox}	si ¹	si ²
Subunidades regulatorias	p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , p40 ^{phox} y Rac1 ¹	no posee ²
Control	modificación postraduccional de subunidades regulatorias ³	transcripcional ²
Localización celular	célula endotelial, cardiomiocito, fibroblasto, fibra muscular lisa, célula inflamatoria ⁴⁻⁷	célula endotelial, cardiomiocito, fibroblasto, fibra muscular lisa ⁸⁻¹²
Localización subcelular	membrana plasmática, membrana del fagosoma ^{1,4-7}	membranas internas, núcleo, RE perinuclear, mitocondria ^{2,8-12}
Especie oxidante liberada	O ₂ ^{•-} ^{1,13-16}	H ₂ O ₂ ^{2, 13-15}

¹(Byrne y col. 2003); ²(Serrander y col. 2007); ³(Drummond y col. 2011); ⁴(Jones y col. 1996); ⁵(Quinn y col. 2006); ⁶(Peng y col. 2005); ⁷(Vignais 2002); ⁸(Petry y col. 2006); ⁹(Geiszt y col. 2000); ¹⁰(Yang y col. 2001); ¹¹(Vallet y col. 2005); ¹²(Cucoranu y col. 2005); ¹³(Dikalov y col. 2008); ¹⁴(Santillo y col. 2015); ¹⁵(Brown, D. I. y col. 2009); ¹⁶(Brandes y col. 2014b).

6. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes que lleva a una alteración de los mecanismos de control y señalización dependientes del estado de óxido-reducción y/o al daño de componentes (moléculas) celulares (Sies 2007). El estrés oxidativo está asociado con factores de riesgo cardiovasculares como hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo y obesidad, entre otros (Forstermann 2010).

El estrés oxidativo puede desencadenarse por un aumento de la producción de especies oxidantes, una disminución de los niveles de antioxidantes o una combinación de ambas situaciones. Como resultado del desequilibrio entre la velocidad de producción y metabolización de especies oxidantes se produce un aumento sostenido de la concentración en estado estacionario de dichas especies que llevan al daño oxidativo.

La alteración de los sistemas necesarios para expresar genes involucrados en la defensa antioxidante, así como la ausencia de antioxidantes dietarios (vitaminas, flavonoides, etc) y micronutrientes necesarios para la correcta función de enzimas antioxidantes, resulta en la acumulación de especies oxidantes que lleva a estrés oxidativo. El aumento de especies oxidantes también puede ocurrir por exposición a toxinas (paraquat, humo de cigarrillo) y activación de enzimas endógenas como las NADPH oxidasas en condiciones patológicas (Blanco-Ayala y col. 2014; Dinauer 2014; O'Neill y col. 2015).

Independientemente de la causa que origine el estrés oxidativo, una concentración aumentada de especies reactivas del oxígeno puede llevar a un mayor número de reacciones iniciadas por radicales libres que conducen a daño oxidativo en la estructura y función de los componentes celulares. Dependiendo de la magnitud del estrés oxidativo, el daño celular puede ser reversible o puede derivar en un daño irreversible e incluso en la muerte celular si el estrés oxidativo persiste en el tiempo.

7. Sistema circulatorio

El sistema circulatorio de los vertebrados es un sistema cerrado constituido por una bomba propulsora de sangre (el corazón) y por vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares).

7.1. Corazón

El corazón es el órgano propulsor que bombea sangre al interior del sistema circulatorio. El corazón de mamíferos está constituido por cuatro cámaras musculares: dos aurículas (derecha e izquierda) y dos ventrículos (derecho e izquierdo). El lado derecho del corazón bombea sangre hacia los pulmones a través de las arterias pulmonares para su oxigenación; mientras que el lado izquierdo bombea la sangre oxigenada hacia todo el cuerpo (circulación sistémica) a través de la arteria aorta. Así se transporta sangre a través del sistema arterial hasta los lechos capilares de los tejidos, donde el O_2 se intercambia por dióxido de carbono. El sistema venoso devuelve la sangre desoxigenada a la aurícula derecha a través de la vena cava (Figura 13A).

La pared del corazón está compuesta por tres capas: endocardio (interna), miocardio (intermedia) y epicardio (externa). El miocardio comprende tres tipos de células musculares cardíacas o cardiomiocitos que difieren en tamaño y en la función que desempeñan:

- i. *Células miocárdicas del nódulo senoauricular y del nódulo auriculoventricular*: son células que se contraen débilmente y son autorríticas, se las conoce como células *marcapasos*.
- ii. *Células miocárdicas más grandes*: se encuentran en el endocardio ventricular, están especializadas en la conducción rápida. Estas células constituyen el sistema de propagación de la excitación a lo largo del corazón.

- iii. *Células miocárdicas de tamaño intermedio*: de contracción potente, constituyen la mayor parte del corazón.

Además, el miocardio posee muchos capilares sanguíneos en los que la sangre puede circular.

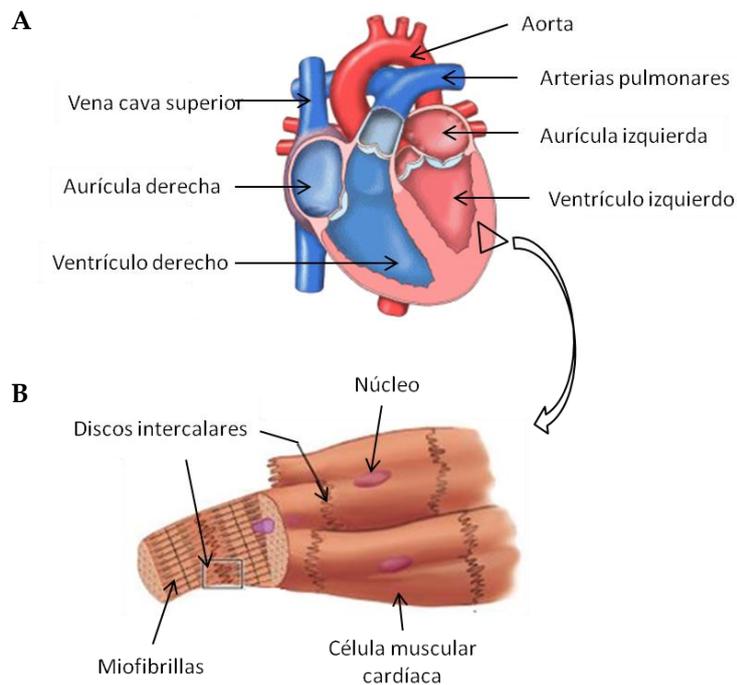


Figura 13. A) Estructura del corazón y B) detalle de una sección de ventrículo izquierdo.

7.2. Cardiomiocitos

Los cardiomiocitos son células mononucleadas o binucleadas, alargadas y con ramificaciones que permiten la comunicación con células vecinas. Las células se unen mediante complejos de unión especializados llamados discos intercalares (Figura 13B). La membrana plasmática de los cardiomiocitos posee una región especializada conocida como túbulo T, que consiste en invaginaciones de la membrana plasmática hacia el interior de la célula (Figura 14).

Al igual que el músculo esquelético, el músculo cardíaco es un tipo de músculo estriado y se caracteriza por una organización similar de los filamentos de actina y miosina (sarcómeros) que intervienen en la contracción del cardiomiocito (Figura 14).

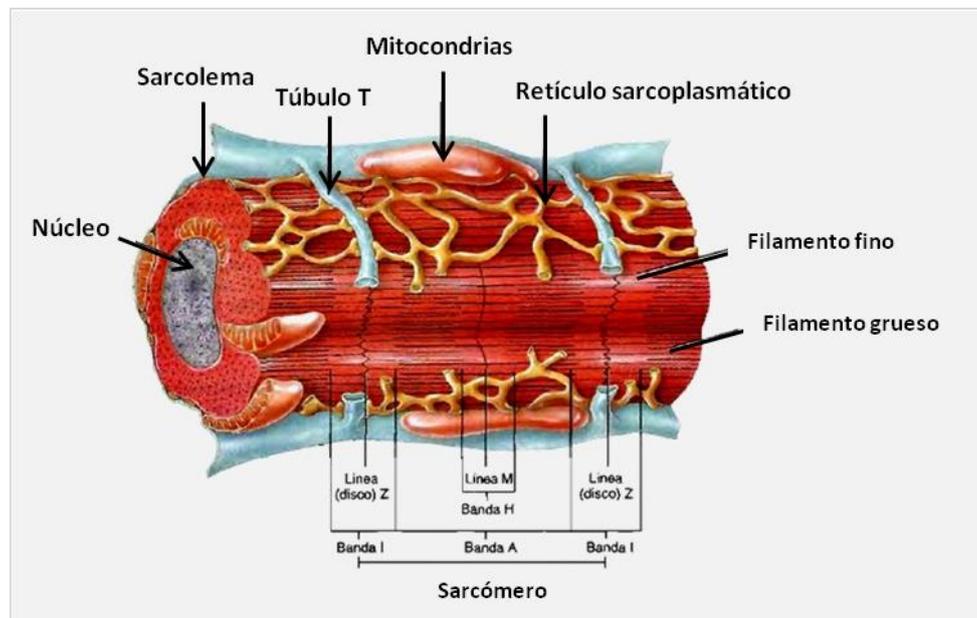


Figura 14. Estructura de un sarcómero del cardiomiocito.

7.3. Arterias

Las arterias poseen tres capas o tunicas que constituyen la pared arterial (Figura 15):

- i. *Túnica íntima*: compuesta por una monocapa de células endoteliales (endotelio) y una membrana elástica interna. El endotelio cumple un importante papel en la regulación del diámetro de los vasos mediante la liberación de NO producido por la eNOS de las células endoteliales.
- ii. *Túnica media*: compuesta por capas concéntricas de fibras musculares lisas, cuyo número varía según el tipo y calibre del vaso. Esta capa tiene un papel fundamental en la contracción y relajación de los vasos sanguíneos.

- iii. *Túnica externa o adventicia*: compuesta por terminaciones nerviosas, tejido adiposo perivascular, vasa vasorum, fibroblastos y fibras de colágeno que confieren nutrición y soporte a los vasos sanguíneos.

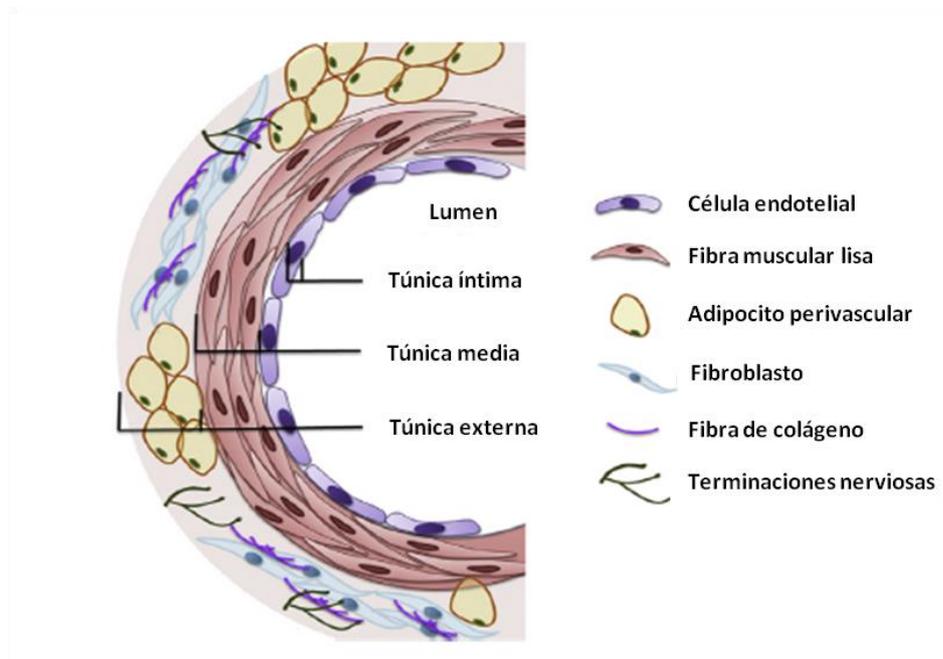


Figura 15. Estructura general de la pared de una arteria (Zhao y col. 2015).

8. NOS y NOX en el sistema cardiovascular: funciones fisiológicas

8.1. Señalización *redox* en corazón

A diferencia de la oxidación irreversible producto de una situación de estrés oxidativo severo continuo, en condiciones fisiológicas existe una producción constante y controlada de especies reactivas del oxígeno que pueden oxidar y reducir moléculas involucradas en la señalización celular.

Se entiende por señalización *redox* a las modificaciones específicas de oxidación-reducción, generalmente reversibles, de moléculas involucradas en vías de señalización celular. Las especies oxidantes involucradas en la señalización *redox* incluyen el anión superóxido, H_2O_2 y moléculas como el NO y el $ONOO^-$ (Santos y col. 2011; Burgoyne y col. 2012; Zhang, M. y col. 2014).

En el corazón, la señalización *redox* está involucrada en muchos procesos fisiológicos como la contractibilidad y diferenciación celular; y tiene un papel importante en diversos procesos patológicos como en el remodelamiento y fibrosis cardíaca (Burgoyne y col. 2012; Hafstad y col. 2013).

Los efectos de la señalización *redox* están influenciados por el tipo de especie producida, la localización subcelular, la concentración alcanzada y el estado *redox* general del tejido. La producción de niveles fisiológicos de especies oxidantes en zonas subcelulares localizadas y en respuesta a distintos estímulos, modulará la actividad de diferentes moléculas blanco como por ejemplo: canales iónicos, fosfatasas, quinasas y otras proteínas que participan en la señalización *redox*. En la Tabla 3 se muestran las principales moléculas blanco de importancia para la función del cardiomiocito, que son sensibles a cambios en el estado *redox*.

Por otro lado, como se indicó en la sección 6., si la producción de especies reactivas del oxígeno se desplaza a favor de una mayor concentración de oxidantes respecto de los antioxidantes, las células experimentarán estrés oxidativo que puede resultar en daño celular, déficit energético, disfunción cardíaca y apoptosis debido a modificaciones en lípidos de membrana, proteínas y ADN (Zhang, M. y col. 2014).

Tabla 3. Principales moléculas blanco *redox* sensibles de importancia para la función del cardiomiocito.

Componente	Modificación <i>redox</i>	Efecto principal
RyR2	S-nitrosilación, S-glutatiolación, unión disulfuro, fosforilación por CamKII*	Liberación de calcio desde el RS
SERCA	S-nitrosilación, S-glutatiolación, nitración de tirosinas, unión disulfuro	Recaptación de calcio hacia el RS
Miofilamentos	Unión disulfuro, fosforilación por PKA/PKG*	Función contráctil
Canales/Intercambiadores iónicos	Unión disulfuro	Alteración del flujo de iones

*vía indirecta por activación de quinasas *redox* sensibles. CamKII: calmodulina quinasa tipoII; RS: retículo sarcoplasmático; RyR2: receptor de rianodina; SERCA: proteína calcio ATPasa del RS; PKA: proteína quinasa A; PKG proteína quinasa G (Santos y col. 2011).

8.2. Funciones de NOS y NOX en la vasculatura

La producción de NO por la eNOS en las células endoteliales es fundamental para la regulación del tono vascular, ya que actúa como un factor de vasorelajación.

El mecanismo de transducción de la señal del NO mejor caracterizado es su difusión a través de la membrana hasta las fibras musculares lisas de la pared de los vasos, donde activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), que aumenta los niveles de GMPc. Este aumento estimula la activación de enzimas como PKG, que llevan a la disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular, resultando en un efecto vasorelajante (Figura 16).

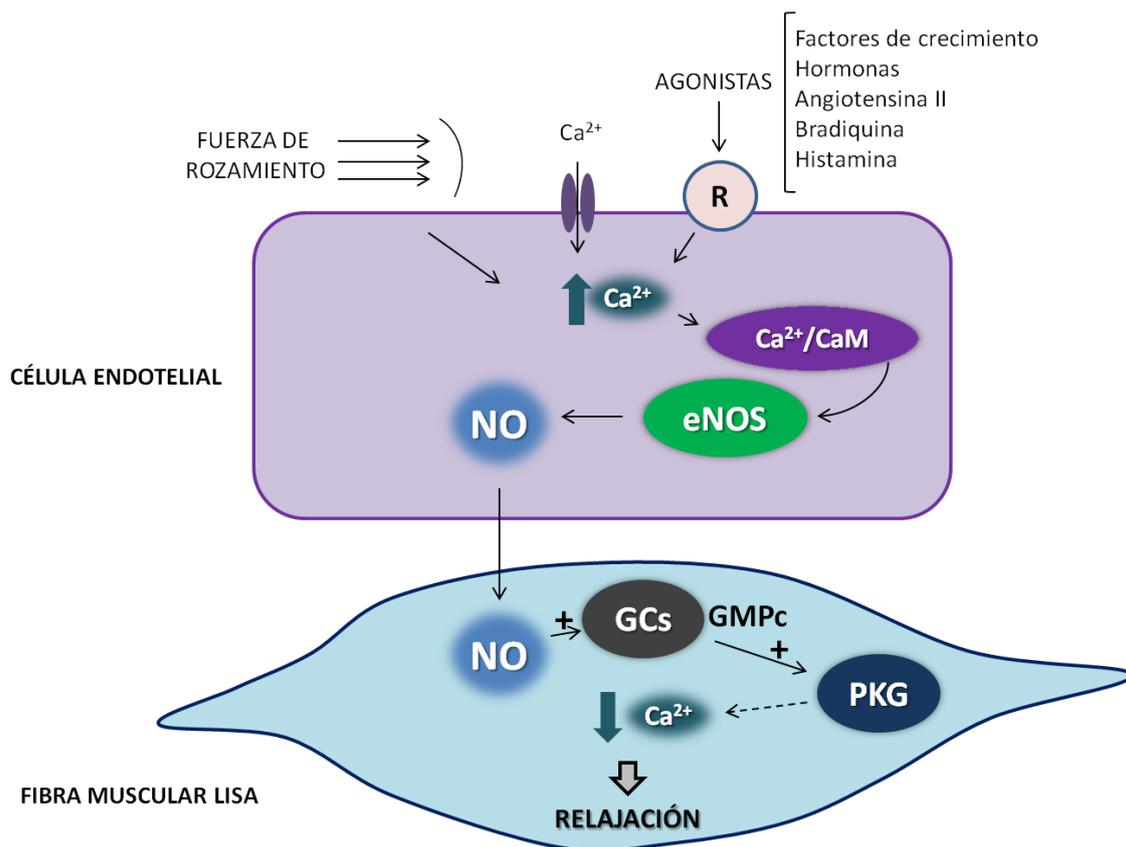


Figura 16. Transducción de la señal del NO en la pared vascular.

Además hay evidencia de la existencia de otras vías de transducción de la señal del NO, como la S-nitrosilación de residuos cisteína en el sitio activo de

proteínas, el cual es un proceso que puede modular la función enzimática de distintas proteínas (Sun y col. 2006; Qian y col. 2012).

La señalización mediada por el anión superóxido producido por las NOX también desempeña un papel fundamental en la vasorelajación dependiente del endotelio. Las células endoteliales expresan las isoformas NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5 (ésta última encontrada sólo en humanos) (Damico y col. 2012) que regulan procesos fisiológicos de diferenciación y migración celular, angiogénesis y tono vascular. Una actividad exacerbada de NOX2 ha sido vinculada con la disminución de la biodisponibilidad de NO derivada del endotelio (Gorlach y col. 2000).

8.3. Funciones de NOS y NOX en el corazón

Además de sus efectos sobre el endotelio, el NO derivado de las células endoteliales ejercería efectos parácrinos sobre la función de los cardiomiocitos que incluirían la modulación de la fuerza de contracción, el consumo de O₂ y la diferenciación y crecimiento del cardiomiocito (Gyurko y col. 2000; Shah y col. 2000; Godecke y col. 2001; Barouch y col. 2002; Layland y col. 2002; Brutsaert 2003; Buys y col. 2007)

Los efectos autócrinos del NO derivado de eNOS estarían involucrados en la modulación de la respuesta inotrópica al estiramiento mecánico (Eisner y col. 2000; Massion y col. 2004; Seddon y col. 2007). En cuanto a la nNOS, esta isoforma sería responsable de la regulación autocrina de la contracción del cardiomiocito a través de la modulación del acoplamiento excitación-contracción regulando los niveles de Ca²⁺ intracelular y promoviendo la relajación (Burkard y col. 2007; Zhang, M. y col. 2014). Además, la nNOS estaría involucrada en la patofisiología del remodelamiento cardíaco adverso (Petroff y col. 2001; Shaul 2002; Seddon y col. 2007). También, bajo situaciones patológicas, la iNOS podría ser una fuente importante de NO (Carnicer y col. 2013).

En cuanto a los efectos de las NOX, éstas contribuyen a la respuesta inotrópica al estiramiento mecánico en cardiomiocitos. El estiramiento fisiológico desencadenaría la activación de NOX2 en el túbulo T de la membrana plasmática (Prosser y col. 2011; Prosser y col. 2013*a*; Prosser y col. 2013*b*) lo que estimularía la activación del canal de Ca^{2+} , RyR2, lo que induce la liberación de este ion desde el RS hacia el citoplasma, aumentando la fuerza de contracción (Prosser y col. 2013*a*; Sag y col. 2013).

También se ha sugerido que las NOX pueden modular distintas proteínas quinasas involucradas en la señalización del Ca^{2+} . Las proteínas Ca^{2+} -ATPasa del RS, Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática y canales LTCC, son algunos ejemplos de moléculas blanco de las especies oxidantes derivadas de las NOX que participarían en la modulación de los niveles de Ca^{2+} intracelulares ligados a la contractibilidad de los cardiomiocitos (Sag y col. 2013).

9. Biodisponibilidad de NO: concentración en estado estacionario de óxido nítrico ($[\text{NO}]_{\text{EE}}$)

La biodisponibilidad de NO, desde el punto de vista químico, es equivalente a la concentración en estado estacionario del NO ($[\text{NO}]_{\text{EE}}$). Como se indicó en la sección 3.2., la suposición de estado estacionario asume que, en un momento puntual, la velocidad de producción de una especie química se iguala a su velocidad de degradación y que la concentración resultante (concentración en estado estacionario) corresponde a su biodisponibilidad.

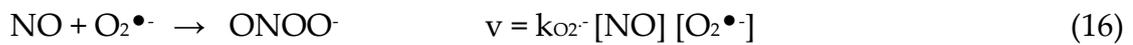
La biodisponibilidad de NO en los tejidos dependerá tanto de su producción por parte de la NOS como de su degradación. Una de las principales vías de metabolización del NO es a través de su reacción con el anión superóxido. Debido a ello, la $[\text{NO}]_{\text{EE}}$ está influenciada marcadamente por la presencia de anión superóxido, el cual reacciona con el NO a una velocidad cercana al límite de difusión como se indicó en la ecuación 16 de la sección 4.2. (Hamilton y col. 2002; Piotrkowski y col.

2007; Ferrer-Sueta y col. 2009). El resto de las reacciones se representan resumidamente en la ecuación 18, donde X representa al conjunto de los blancos biológicos del NO que son diferentes del anión superóxido.

A continuación se aplicará la suposición de estado estacionario para el NO en las células endoteliales y cardíacas.

La velocidad de producción del NO catalizada por la NOS se puede escribir como:

$$v_{\text{producción}} = d[\text{NO}]/dt \quad (17)$$



Dadas las ecuaciones 16 y 18 podemos plantear la velocidad de desaparición de NO como:

$$v_{\text{desaparición NO}} = -d[\text{NO}]/dt = k_{\text{O}_2^{\bullet-}} [\text{NO}] [\text{O}_2^{\bullet-}] + k_{\text{X}} [\text{NO}] [\text{X}] \quad (19)$$

Mediante la suposición de estado estacionario se puede calcular la $[\text{NO}]_{\text{EE}}$, ya que las velocidades de producción y de desaparición se igualan, de manera que podemos escribir (ecuaciones 20-23):

$$v_{\text{producción NO}} = v_{\text{desaparición NO}} \quad (20)$$

$$d[\text{NO}]/dt = -d[\text{NO}]/dt \quad (21)$$

$$v_{\text{producción NO}} = k_{\text{O}_2^{\bullet-}} [\text{NO}]_{\text{EE}} [\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{EE}} + k_{\text{X}} [\text{NO}]_{\text{EE}} [\text{X}]_{\text{EE}} \quad (22)$$

$$[\text{NO}]_{\text{EE}} = v_{\text{producción NO}} / (k_{\text{O}_2^{\bullet-}} [\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{EE}} + k_{\text{X}} [\text{X}]_{\text{EE}}) \quad (23)$$

Asumiendo que la concentración de X no se ve afectada por el tratamiento en estudio, la $[\text{NO}]_{\text{EE}}$ estará determinada en gran parte por la actividad de NOS y la concentración de anión superóxido en estado estacionario ($[\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{EE}}$).

El concepto de NO como modulador de la presión arterial (PA) se basa en el hecho de que una adecuada biodisponibilidad de NO se asocia con una vasodilatación y PA normales. Por el contrario, niveles bajos de NO pueden llevar a una menor vasorelajación de las fibras musculares lisas de los vasos y el consecuente aumento de la PA y desarrollo de hipertensión (HT).

En condiciones normales, las defensas antioxidantes endógenas mantienen en valores fisiológicos la concentración de anión superóxido, minimizando su reacción con el NO. Sin embargo, en situaciones patológicas donde existe una mayor producción de anión superóxido, como en la HT, pueden ocasionar una disminución de los niveles de NO (Fraga y col. 2011). La disminución de la biodisponibilidad de NO se asocia con un aumento de especies reactivas del oxígeno y es considerada un marcador temprano de desarrollo de ECV (Seddon y col. 2007).

10. Efecto de los flavonoides sobre la salud cardiovascular

Estudios epidemiológicos muestran una disminución en la incidencia de ECV y de HT en sujetos que consumen regularmente una dieta rica en frutas y hortalizas. Estos estudios apoyan la idea de que los beneficios podrían estar causalmente relacionados con la presencia de ciertos flavonoides en las frutas y hortalizas (Hodgson y col. 1999; Bernatova y col. 2002; Hodgson y col. 2002; Taubert y col. 2007; Grassi y col. 2008a; Hooper y col. 2012; Wang y col. 2014). Se han realizado un importante número de estudios de intervención en humanos en donde se evaluaron los efectos de flavonoides y alimentos que los contienen, sobre los factores de riesgo de ECV. Los resultados de estos estudios sugieren funciones antiplaquetaria, antitrombótica y antihipertensiva de ciertos flavonoides (Chong y col. 2010; Wang y col. 2014).

Los flavonoides o alimentos ricos en ellos han sido estudiados en humanos y animales de laboratorio observando modificaciones en la función cardiovascular, especialmente la PA (Chong y col. 2010; Dornas y col. 2011). Ensayos de intervención en humanos mostraron una disminución de la PA asociados con el consumo de EC a través de la administración de cacao o productos derivados del mismo, como el chocolate (Lucesoli y col. 1995; Suzuki y col. 1998; Landmesser y col. 2003; Fraga 2005a; Grassi y col. 2005a; Schroeter y col. 2006; Bian y col. 2008), tanto en sujetos normotensos (jóvenes, ancianos, obesos e hipercolesterolémicos) como hipertensos (en distintos estadios de HT, con o sin intolerancia a la glucosa) (Fraga y col. 2005a; Allen y col. 2008; Crews y col. 2008; Faridi y col. 2008; Ried y col. 2009; Desch y col. 2010; Desideri y col. 2012). En la mayoría de los casos la disminución de la PA se asoció con el consumo de cacao.

Un menor número de estudios se realizaron utilizando flavonoides purificados y suplementados en la dieta. Se analizó el efecto de (+)-catequina y (-)-epigallocatequina galato (flavanoles) en sujetos con sobrepeso u obesos y se observó, en ambos casos, un efecto antihipertensivo de estos compuestos suplementados en la dieta (Matsuyama y col. 2008; Brown, A. L. y col. 2009). En relación a los flavanoles, cuando se administró un extracto rico en QC en la dieta de sujetos sanos se encontró una disminución de la PA (Edwards y col. 2007; Brull y col. 2015). El mismo efecto de disminución de la PA se observó en distintos modelos animales de hipertensión en donde se administró QC pura (Garcia-Saura y col. 2005; Mackraj y col. 2008; Perez-Vizcaino y col. 2009; Montenegro y col. 2010; Gao y col. 2012).

11. Hipertensión arterial

El organismo se asegura un flujo sanguíneo adecuado en los tejidos para cubrir sus necesidades metabólicas mediante la regulación de la PA. Esta regulación

es muy compleja y consta de varios mecanismos fisiológicos de control, que incluyen mecanismos nerviosos, humorales y locales (endoteliales).

La PA normal en adultos es de 120 mmHg cuando el corazón se contrae (PA sistólica) y de 80 mmHg cuando el corazón se relaja (PA diastólica). La HT se define como PA sistólica (PAS) igual o superior a 140 mmHg y/o como PA diastólica (PAD) igual o superior a 90 mmHg, o por el consumo de medicación antihipertensiva (European Society of Hypertension Guidelines 2003; Chobanian y col. 2003a).

La HT es la causa prevenible más importante de ECV y accidentes cerebrovasculares. La etiología de la HT es desconocida en la mayoría de los casos. La HT *primaria* o *esencial* corresponde al 90% de los casos y se desarrolla como resultado de causas ambientales o genéticas; mientras que el 10% restante corresponde a causas secundarias y se la conoce como HT *secundaria*. Las causas más frecuentes de HT secundaria son de origen renal, vascular, endócrino, exógeno y embarazo, entre otros (European Society of Hypertension Guidelines 2003; Chobanian y col. 2003a; Chobanian y col. 2003b).

Se han identificado un número importante de factores de riesgo de desarrollo de HT que son prevenibles, entre ellos se incluyen: el sobrepeso, un alto consumo de sodio, el sedentarismo, un bajo consumo de frutas y hortalizas y el consumo nocivo de alcohol y tabaco. Es así que se pueden adoptar distintas medidas para minimizar las probabilidades de padecer HT y sus consecuencias adversas, como por ejemplo consumir una dieta rica en frutas y hortalizas, realizar actividad física y evitar el consumo de alcohol y tabaco.

Se han desarrollado distintos modelos animales para estudiar la HT. Éstos incluyen modelos genéticos (por variaciones espontáneas mantenidas por endocría o por manipulación genética), como no genéticos (quirúrgicos, endócrinos y dietarios). Las ratas tratadas con L-NAME, un inhibidor de la NOS, o con sobrecarga de fructosa administrados en el agua de bebida, constituyen modelos en donde los animales desarrollan un aumento de su PA y fueron utilizados en esta tesis doctoral.

12. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) fue descrito por primera vez en el año 1988 por Gerald M. Reaven, quien en ese momento lo denominó “síndrome X”, caracterizado por la presencia de un conjunto de alteraciones metabólicas cuyo rasgo fisiopatológico central era la resistencia a la insulina (Reaven 1988). Desde entonces se discutieron diferentes definiciones y criterios para su diagnóstico. No fue hasta el año 2009 que se logró un consenso entre la Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la Asociación Americana del Corazón (AHA)/Instituto Nacional de Corazón, Pulmón y Sangre (NHLBI), en donde se estableció que el diagnóstico de SM sería por la presencia de tres de los siguientes cinco factores de riesgo: circunferencia de cintura elevada, triglicéridos (TG) plasmáticos elevados, HDL-colesterol plasmático bajo, presión arterial (PA) elevada, glucosa plasmática en ayuno elevada. Los puntos de corte para cada una de estas variables se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico.

Medida	Punto de corte
Circunferencia de cintura	Específicas según población y país
TG plasmáticos elevados (o tratamiento con drogas para TG elevados) ^a	≥ 150 mg/dl
HDL-colesterol plasmático bajo (o tratamiento con drogas anticolesterolémicas) ^a	< 40 mg/dl en hombres < 50 mg/dl en mujeres
PA elevada (o tratamiento con drogas antihipertensivas en un paciente con historia de HT) ^a	PAS ≥ 130 mmHg y/o PAD ≥ 85 mmHg
Glucosa plasmática en ayuno elevada (o tratamiento con drogas hipogluceminas) ^a	≥ 100 mg/dl

^a como indicadores alternativos.

El alto consumo de fructosa, proveniente de bebidas endulzadas y de ciertos alimentos, ha sido asociado con varias condiciones de salud no deseadas, que

incluyen el aumento de la PA y un mayor riesgo de desarrollar ECV. En modelos animales de experimentación, la sobrecarga de fructosa se ha utilizado para promover desarreglos funcionales y metabólicos similares a los que se presentan en pacientes con SM (Martinez y col. 1994; Kamide y col. 2002; Le y col. 2006; Conti y col. 2014; Castro y col. 2015; Stanisic y col. 2016).

13. Hipertrofia y remodelamiento cardíaco

En el corazón, la HT y los desarreglos metabólicos (producidos por ejemplo por un alto consumo de fructosa) pueden conducir a situaciones de estrés oxidativo y comprometer tanto la estructura como la función del corazón (Girard y col. 2005; Huggins y col. 2008), promoviendo el desarrollo de ECV.

La hipertrofia del miocardio ocurre en respuesta a un estrés crónico como la sobrecarga de presión e involucra tanto estímulos mecánicos como neurohumorales (Sirker y col. 2007). La fibrosis intersticial del miocardio es un componente importante del corazón hipertrofiado e impacta sobre el llenado pasivo del corazón, la hipoxia tisular y la susceptibilidad a la arritmia. Distintos factores favorecen el desarrollo de hipertrofia, remodelamiento y fibrosis, entre ellos una sobrecarga de presión o volumen, la activación del sistema renina-angiotensina mediado por estrés oxidativo y las citoquinas (Sirker y col. 2007).

Una de las principales vías involucradas en el desarrollo de la hipertrofia es la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs -ERK, JNK y p38-MAPK-) que conforman una familia de serina/treonina quinasas, las cuales se activan por fosforilación secuencial de dichos residuos (Nishida y col. 1993; Ruwhof y col. 2000; Zhang y col. 2004; Tsutsui y col. 2011; Asrih y col. 2013). Existe evidencia que implica a diferentes vías de señalización *redox* con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca y cuyos mecanismos involucran la activación de MAPKs mediada por especies reactivas del oxígeno (Li y col. 2002; Cave y col. 2005; Sriramula y col. 2015).

El remodelamiento cardíaco incluye la degradación de la matriz extracelular, angiogénesis defectuosa, fibrosis y apoptosis. Dentro de los mecanismos de señalización involucrados en el remodelamiento y fibrosis se encuentra la estimulación de la expresión y/o actividad de metaloproteasas de matriz (MMP), enzimas involucradas en la renovación de la matriz extracelular (Rude y col. 2005; Awad y col. 2010). La isoforma MMP-9 es inducible, está involucrada en el remodelamiento fisiopatológico de la matriz extracelular y se ha asociado un aumento de su actividad con el desarrollo de arritmia y disfunción contráctil en el cardiomiocito (Phatharajaree y col. 2007; Mishra y col. 2013; Prathipati y col. 2016).

Además, existe evidencia de un aumento de NOX en la fibrosis (Sirker y col. 2007) y se han sugerido diversos mecanismos mediante los cuales NOX2 podría promover hipertrofia, remodelamiento, fibrosis y arritmia (Sirker y col. 2011; Sriramula y col. 2015).

Hipótesis y objetivos



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo de tesis es que los flavonoides, incorporados a través de la dieta, pueden actuar sobre la modulación de la biodisponibilidad del NO en corazón, mediante uno o varios de los siguientes mecanismos: a) aumentando la activación y/o expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS), b) disminuyendo la producción de anión superóxido por inhibición de la actividad y/o expresión de la NADPH oxidasa (NOX) y c) disminuyendo los niveles en estado estacionario de las especies oxidantes por activación de enzimas antioxidantes.

El planteo de esta hipótesis se apoya en resultados previos obtenidos por nuestro grupo, donde se observó que: a) la ingesta de alimentos ricos en flavanoles y la suplementación con (-)-epicatequina pura, tienen efectos beneficiosos disminuyendo la presión arterial (Fraga y col. 2005; Fraga 2007; Litterio y col. 2012), b) ciertos flavonoides están presentes en plasma durante varias horas después del consumo de alimentos con alto contenido de esos flavonoides (Holt y col. 2002; Fraga 2005b). Hallazgos de otros grupos complementan las bases de nuestra hipótesis ya que mostraron que: a) ciertos flavonoides alteran la función vascular *in vivo*, aparentemente por mecanismos mediados por NO y/o sensibles a la actividad de la NOS (Heiss y col. 2003; Ralay Ranaivo y col. 2004; Heiss y col. 2006); b) metabolitos de flavonoides inhiben la actividad de NOX (Steffen y col. 2007; Steffen y col. 2008); c) ciertos flavonoides incrementan la actividad/expresión de eNOS (Sanchez y col. 2006; Lorenz y col. 2015; Zhang y col. 2015) y d) (-)-epicatequina y quercetina incrementaron los niveles de fosforilación de eNOS en células endoteliales humanas (Li y col. 2012; Ramirez-Sanchez y col. 2012; Zhao y col. 2014).

2. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue estudiar los efectos de dos flavonoides suplementados individualmente en la dieta, la (-)-epicatequina (EC) y quercetina (QC), sobre el metabolismo del NO y del anión superóxido, y los posibles mecanismos de acción involucrados, en tejido cardíaco en dos modelos animales donde se encuentra comprometida la biodisponibilidad de NO.

Dentro de este contexto, el uso de animales adquiere particular importancia ya que permite una aproximación a las condiciones fisiológicas en los procesos de absorción y metabolización de los flavonoides que se estudiarán.

Para uno de los modelos se tratarán ratas con L-NAME, un inhibidor de la NOS, que provoca una deficiencia de NO produciendo el consecuente aumento de la PA. En el segundo modelo se trabajará con ratas que recibirán una sobrecarga de fructosa en el agua de bebida, generando alteraciones metabólicas similares al síndrome metabólico en humanos. Estas alteraciones incluyen HT, hipertrigliceridemia y disminución de la tolerancia a la insulina. En ambos modelos los animales recibirán una dieta suplementada con EC o QC purificadas.

3. Objetivos específicos

Estudio 1.

Estudiar los efectos de (-)-epicatequina sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

- a) Determinación de la acción antihipertensiva de (-)-epicatequina.
- b) Evaluación de indicadores de estrés oxidativo del tejido cardíaco.
- c) Evaluación de factores determinantes de los niveles de NO: actividad de NOS, fosforilación de eNOS y expresión de iNOS.

- d) Determinación de la producción de anión superóxido y de la expresión de distintas subunidades regulatorias de NOX.
- e) Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.
- f) Indicadores de hipertrofia y remodelación cardíaca.

Estudio 2.

Estudiar los efectos de quercetina sobre el metabolismo de NO y anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

- a) Determinación de la acción antihipertensiva de quercetina.
- b) Evaluación de indicadores de estrés oxidativo del tejido cardíaco.
- c) Evaluación de factores determinantes de los niveles de NO: actividad de NOS, fosforilación de eNOS y expresión de eNOS, nNOS e iNOS.
- d) Determinación de la producción de anión superóxido y de la expresión de p47^{phox} de NOX.
- e) Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.
- f) Indicadores de hipertrofia cardíaca.

Estudio 3.

Estudiar los efectos de (-)-epicatequina sobre el metabolismo de NO y anión superóxido en tejido cardíaco en ratas con sobrecarga de fructosa.

- a) Determinación del estado metabólico general de los animales.
- b) Determinación de la acción antihipertensiva de (-)-epicatequina.
- c) Evaluación de indicadores de estrés oxidativo del tejido cardíaco.
- d) Evaluación de factores determinantes de los niveles de NO: actividad de NOS, fosforilación de eNOS y expresión de eNOS, nNOS e iNOS.

- e) Determinación de la producción de anión superóxido y de la expresión de distintas subunidades regulatorias de NOX.
- f) Evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes.
- g) Indicadores de hipertrofia y remodelación cardíaca.

Materiales y Métodos



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

Los reactivos (-)-epicatequina, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), butilhidroxitolueno (BHT), catalasa (CAT), cloruro de calcio (CaCl_2), dinitrato de N,N'-dimetil-9,9'-biacridinio (lucigenina), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fluoruro de sodio (FNa), Folin Ciocalteau, fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), glucosa, glutatión oxidado (GSSG), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reducido (GSH), glutatión reductasa (GR), IGEPAL®, metil éster de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME), N-hidroxi-etil-piperazina-N-ácido etanosulfónico (HEPES), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), N ω -nitro-L-arginina (L-NNA), ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), quercetina, sal sódica de heparina, seroalbúmina bovina (BSA), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), superóxido dismutasa (SOD), xantina oxidasa (XO) y xantina se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EE. UU.).

Los reactivos glicerol, persulfato de amonio, Tritón® X-100 y Tween-20 se obtuvieron de Promega (Madison, Wisconsin, EE. UU.).

Los reactivos acrilamida, bis acrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida) y glicina se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, California, EE. UU.).

Los reactivos bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de sodio (NaCl), fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) y β -mercaptoetanol se obtuvieron de Merck Química Argentina S.A. (Carlos Spegazzini, Buenos Aires).

Los reactivos ácido perclórico (HClO_4) y cloruro de potasio (KCl) se obtuvieron de Mallinckrodt Pharmaceuticals (Hazelwood, Missouri, EE. UU.).

Los reactivos ácido clorhídrico (HCl), dimetilsulfóxido (DMSO) y dodecil sulfato de sodio (SDS) se obtuvieron de Anedra S.A. (San Fernando, Buenos Aires).

Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se obtuvieron de Amersham (GE Healthcare Life Science, Alemania).

Los reactivos ácido fosfotúngstico y N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) se obtuvieron de Fisher Scientific (Fair Lawn, Nueva Jersey, EE. UU.).

El butanol se obtuvo de Dorwil (Belgrano, Buenos Aires).

La [¹⁴C]L-arginina se obtuvo de PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, Massachusetts, EE. UU.).

La fructosa se obtuvo de Droguería Saporiti (Colegiales, Buenos Aires).

Los anticuerpos utilizados en los ensayos de western blot se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, EE. UU) y de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, California, EE. UU).

Los reactivos acetonitrilo, ácido acético glacial y metanol fueron calidad HPLC.

Para la preparación de reactivos se utilizó agua bidestilada obtenida utilizando el equipo Barnstead E-pure (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU).

2. Animales y tratamientos

El alojamiento, el manejo de los animales y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicado por el Instituto Nacional de Salud (Publicación N° 85-23, 1996, Bethesda, Maryland, EE. UU.). Los protocolos de experimentación fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA (N° nota CICUAL FFyB: 26102015-47, n° EXP-FFyB: 0069322/2015) y de la Universidad Nacional de Cuyo (CICUAL aval protocolo N° 36/2014).

2.1. **Estudio 1. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.**

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 130 g de peso provenientes del Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se alojaron en jaulas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (22-23°C), en ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Luego de una semana de adaptación a la dieta y a las condiciones de alojamiento, se procedió con el tratamiento mediante la administración de L-NAME en el agua de bebida (360 mg/L) y/o (-)-epicatequina agregada a una dieta control en una cantidad de 4 g/kg de dieta. Los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos (n = 8 para cada grupo):

- i. Grupo C: recibió agua como bebida y dieta control.
- ii. Grupo LN: recibió L-NAME en el agua de bebida y dieta control.
- iii. Grupo LN-EC: recibió L-NAME en el agua de bebida y dieta control suplementada con (-)-epicatequina (EC).

La dieta control se preparó como se describe en la Tabla 5 (Olin y col. 1995) y se suplementó con las cantidades de EC indicadas anteriormente a expensas de igual cantidad de dextrosa.

En todos los casos las dietas se prepararon 48 h antes de su uso. Los animales consumieron la dieta y la bebida *ad libitum* durante los 4 d de tratamiento. El peso corporal y el consumo de comida y bebida se midieron diariamente. Al final del tratamiento, los animales se pesaron y se procedió a la eutanasia utilizando una cámara con dióxido de carbono. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y se utilizó heparina sódica como anticoagulante. Se aisló el corazón para las distintas determinaciones.

Tabla 5. Composición de la dieta control

Componente	Cantidad (g/kg dieta)
Hidratos de carbono	595
Proteínas	210
Grasas	80
Mezcla de minerales	40
Mezcla de vitaminas	60
Fibras	15

2.2. Estudio 2. Efectos de quercetina (QC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 130 g de peso provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires. Las ratas se alojaron en jaulas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (22-23°C), en ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Luego de una semana de adaptación a la dieta y a las condiciones de alojamiento, se procedió con el tratamiento mediante la administración de L-NAME en el agua de bebida (360 mg/L) y/o quercetina agregada a una dieta control en una cantidad de 4 g/kg de dieta. Los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos (n=8 para cada grupo):

- i. Grupo C: recibió agua como bebida y dieta control.
- ii. Grupo QC: recibió agua como bebida y dieta control suplementada con quercetina (QC).
- iii. Grupo LN: recibió L-NAME en el agua de bebida y dieta control.
- iv. Grupo LN-QC: recibió L-NAME en el agua de bebida y dieta control suplementada con quercetina (QC).

La dieta control se preparó como se describe en la Tabla 5 (Olin y col. 1995) y se suplementó con las cantidades de QC indicadas anteriormente a expensas de igual cantidad de dextrosa.

En todos los casos las dietas se prepararon 48 h antes de su uso. Los animales consumieron la dieta y la bebida *ad libitum* durante los 4 d de tratamiento. El peso corporal y el consumo de comida y bebida se midieron diariamente. Al final del tratamiento, los animales se pesaron y se procedió a la eutanasia utilizando una cámara de dióxido de carbono. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y se utilizó heparina sódica como anticoagulante. Se aisló el corazón para las distintas determinaciones.

2.3. Estudio 3. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de ratas con sobrecarga de fructosa.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 100 g de peso provenientes del Bioterio del Departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza, Argentina). Las ratas se alojaron en jaulas metabólicas individuales bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (22-23°C), en ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Luego de una semana de adaptación a la dieta y a las condiciones de alojamiento, se procedió con el tratamiento mediante la administración de fructosa (10% p/v) en el agua de bebida y (-)-epicatequina agregada a una dieta control en una cantidad de 20 mg/kg/d que corresponde a 0,2 g/kg de dieta. Los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos (n=10 para cada grupo):

- i. Grupo C: recibió agua como bebida y dieta control.
- ii. Grupo F: recibió fructosa en el agua de bebida y dieta control.
- iii. Grupo F-EC: recibió fructosa en el agua de bebida y dieta control suplementada con (-)-epicatequina (EC).

La dieta utilizada para este estudio fue provista por GEPSA Feeds (Buenos Aires, Argentina) y su composición se indica en la Tabla 6. Las dietas se prepararon 48 h antes de su uso. Los animales consumieron la dieta y la bebida *ad libitum* y se midieron el consumo de comida y bebida dos veces por semana a lo largo de las 8 semanas de tratamiento. Al final del tratamiento se mantuvo a los animales en ayuno por 12 h, luego fueron pesados y anestesiados con ketamina (50 mg/kg) y acepromazina (1mg/kg). Se obtuvo sangre por punción cardíaca utilizando heparina sódica como anticoagulante y se aisló el corazón para las distintas determinaciones.

El tratamiento de los animales, la determinación de la presión arterial y las determinaciones de triglicéridos, colesterol y glucosa, se realizaron en el Departamento de Patología de la Facultad de Ciencias Médicas, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-CONICET, Universidad Nacional de Cuyo (Mendoza, Argentina).

Tabla 6. Composición de la dieta control.

Componente	Cantidad (g/kg dieta)
Hidratos de carbono	587
Proteínas	240
Grasas	60
Mezcla de minerales	70
Mezcla de vitaminas	21
Fibras	22

3. Determinación de la presión arterial

Se determinó la PA mediante el registro de la PA sistólica (PAS) en ratas conscientes y precondicionadas mediante el empleo de un pletismógrafo digital de cola (SC1000; Hatteras Instruments, Cary, Carolina del Norte, EE. UU.) para los *Estudios 1 y 2*. Para el *Estudio 3* se utilizó un polígrafo Grass (Modelo 7, Grass Instruments Co., Quincy, Massachusetts, EE. UU.). Para ello, las ratas fueron mantenidas en un ambiente termostatzado a 32°C durante 15 min. Luego se inmovilizó a las ratas en un cepo (con previo entrenamiento) y se les colocó en la cola el dispositivo para la determinación de la PAS conectado a un transductor de pulso. Los valores indicados corresponden al promedio de tres registros sucesivos para cada animal.

4. Obtención y procesamiento de muestras biológicas

Luego del sacrificio de los animales se extrajo sangre, la cual se centrifugó a 6000 g durante 1 min para la obtención de plasma para las determinaciones analíticas y bioquímicas.

Se extrajo el corazón, se sumergió en buffer Krebs (HEPES 20 mM; NaCl 118 mM; KCl 4,6 mM; MgSO₄·7H₂O 1mM; NaHCO₃ 5 mM; NaH₂PO₄ 0,4 mM; Na₂HPO₄ 0,15 mM; Cl₂Ca 1,2 mM; glucosa 5,5 mM) y se eliminó el exceso de sangre. Se cortaron secciones de ventrículo izquierdo de 1-2 mm de espesor para histología. Para la determinación de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y para la determinación del contenido de glutatión se separaron aproximadamente 100 mg de ventrículo izquierdo. El resto del corazón se conservó a -80°C para la realización de otros ensayos.

Se preparon homogeneizados según la determinación a realizar:

- i. Para evaluar la producción de anión superóxido dependiente de NADPH, se procesaron los corazones en un homogeneizador Potter-Elvehjem con vástago de teflón, en una relación 1 g tejido en 5 ml de buffer fosfato. Luego los

homogeneizados se centrifugaron a 600 g durante 10 min a 4°C y se descartaron los pellets conteniendo núcleos y restos celulares. Los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a 10000 g por 10 min a 4°C y los pellets conteniendo mitocondrias se descartaron. Los sobrenadantes correspondientes a la segunda centrifugación se utilizaron para efectuar las medidas.

- ii. Para evaluar la expresión de proteínas por western blot, los homogeneizados de corazón se prepararon en homogeneizador Potter-Elvehjem con vástago de teflón en una relación de 1 g tejido en 5 ml de buffer HEPES 50 mM conteniendo NaCl 150 mM, EDTA 0,5 mM, Tritón® X-100 1% (v/v), mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche, Basilea, Suiza), Na₃VO₄ 10 mM y FNa 50 mM. Luego los homogeneizados se centrifugaron a 600 g durante 10 min a 4°C y se descartaron los pellets conteniendo los núcleos y restos celulares y se conservaron los sobrenadantes con los cuales se efectuaron las medidas.

5. Determinación del contenido de proteínas

El análisis de la concentración de proteínas se realizó a partir de la técnica descrita por Bradford (Bradford 1976) o a partir de la técnica descrita por Lowry (Lowry y col. 1951). La lectura de absorbancia para ambos ensayos se realizó en un espectrofotómetro Jasco UV/Vis modelo 78500 (Tokio, Japón). Se utilizó seroalbúmina bovina como estándar.

6. Determinación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL

El contenido de glucosa se midió en sangre utilizando un glucómetro (Accu-Chek Performa, Roche, Buenos Aires, Argentina). La concentración de triglicéridos, colesterol total y colesterol-HDL en plasma se midió utilizando productos para análisis y detección comerciales provistos por GTLab (Buenos Aires, Argentina). La

concentración de colesterol-LDL se calculó por diferencia entre el colesterol total y el colesterol-HDL.

7. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en corazón

La determinación de TBARS en corazón se realizó en homogeneizados en buffer conteniendo fosfato de potasio 30 mM, KCl 120 mM a pH 7,4. A cada alícuota se le agregó 100 µl de BHT 4% (p/v), 500 µl de SDS 3% (p/v), 300 µl de ácido fosfotúngstico 10% (p/v) y 2 ml de HCl 0,1 M y se agitó la mezcla. Luego se agregó 1 ml de TBA 0,7 % (p/v) y se incubó a 100°C durante 45 min. El complejo formado con el TBA se extrajo con butanol y se midió la fluorescencia en el sobrenadante (λ_{ex} = 515 nm; λ_{em} = 555 nm) utilizando un espectrofluorómetro Hitachi F-3010 (Tokio, Japón). Los resultados se expresaron en equivalentes de MDA. El estándar de MDA se preparó a partir de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Lotito y col. 1998).

8. Determinación de glutatión total, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en corazón

Para la determinación de GSH y GSSG se homogeneizaron aproximadamente 100 mg de tejido en una proporción 1:5 con HClO₄ 1 M/EDTA 2 mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 16000 g por 20 min para precipitar las proteínas. Los sobrenadantes se centrifugaron a 16000 g por 2 min en filtros de microcentrífuga de 0,22 µm de poro. Las muestras filtradas se analizaron por HPLC en fase reversa utilizando una columna Supelcosil LC-18 (Supelco Analytical, Bellefonte, Pensilvania, EE. UU.). La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer Binary LC Pump 250, en condiciones isocráticas utilizando una fase móvil de fosfato de sodio 20 mM pH 2,7, con un flujo de 1,2 ml/min a temperatura ambiente. La detección simultánea de GSH y GSSG se llevó a cabo

electroquímicamente utilizando un detector ESA Coulochem II. Para la cuantificación de GSH y GSSG se utilizaron soluciones estándar de GSH y GSSG preparadas en fase móvil a partir de las cuales se realizaron curvas en el rango de 0,25 a 10 µg/ml obteniéndose las áreas bajo la curva (ABC) de los picos para cada concentración de estándar. Los resultados se expresaron como ng de GSH o GSSG por mg de tejido (Rodríguez-Ariza y col. 1994 con modificaciones).

El contenido de glutatión total en un tejido corresponde a la suma de GSH y GSSG. La relación entre el contenido de GSSG y GSH ($GSSG/GSH^2$) se utiliza como índice del estado de óxido-reducción de un tejido. Debido a que la estequiometría de la reacción entre el GSH y GSSG es 2:1, el valor del GSH se eleva al cuadrado (GSH^2). Se calculó el índice $GSSG/GSH^2$ según:

$$GSSG/GSH^2 = \frac{\text{ng GSSG/mg tejido}}{(\text{ng GSH/mg tejido})^2} \quad (24)$$

9. Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS)

Se determinó la actividad de NOS como la cantidad de [^{14}C]L-citrulina generada a partir de [^{14}C]L-arginina (Costa y col. 2004). Aproximadamente 100 mg de ventrículo izquierdo se incubaron en buffer Krebs gaseado con una mezcla de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono, durante 30 min, con [^{14}C]L-arginina-HCl 0,5 µCi/ml como sustrato de la NOS. Para determinar la conversión de [^{14}C]L-arginina a [^{14}C]L-citrulina, los tejidos se homogeneizaron en 0,5 ml de buffer HEPES 20 mM conteniendo EDTA 0,5 mM y EGTA 0,5 mM (pH 5,5) y luego se centrifugaron a 8000 g por 10 min. El sobrenadante se pasó por una columna conteniendo resina Dowex AG 50W-X8 (forma Na^+) previamente hidratada con el mismo buffer que se

utilizó para homogeneizar las muestras y luego se eluyeron las muestras con agua destilada. La cantidad de [^{14}C]L-citrulina generada se determinó con un contador de centelleo líquido (Wallac 1414 WinSpectral, Turku, Finlandia) y los resultados se expresaron como pmol/g tejido.min. Estas determinaciones se realizaron en la Cátedra de Fisiología, Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco (IQUIMEFA)-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

10. Determinación de la producción de anión superóxido

La producción de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) en homogeneizados de corazón (libres de mitocondrias) se realizó siguiendo la emisión de la señal quimioluminiscente de la lucigenina en presencia de NADPH. Para establecer las condiciones de medida primero se caracterizó el sistema experimental en términos de concentración de lucigenina, proteína, NADPH y SOD (Figura 17). Las condiciones óptimas de medida se establecieron utilizando 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína por muestra de homogeneizados libres de mitocondrias, NADPH 40 μM , lucigenina 25 μM y SOD 100 U/ml. La concentración de lucigenina seleccionada permitió obtener cuentas por segundo (cps) altas y sin evidencia de autooxidación de la misma evitando así una sobreestimación en la producción de anión superóxido (Figura 17).

En un ensayo típico, se colocaron alícuotas de homogeneizado de corazón libre de mitocondrias en viales conteniendo 100 μg de proteína en un volumen final de 1 ml en buffer Krebs a 37°C, en presencia o ausencia de SOD (100 U/ml). Se inició la reacción mediante el agregado de lucigenina 25 μM y NADPH 40 μM . La quimioluminiscencia se monitoreó durante 7 min y se calculó el ABC correspondiente a la señal quimioluminiscente inhibible por SOD obtenida restando al ABC en ausencia de SOD el ABC en presencia de SOD.

Se realizaron controles con tempol (mimético de SOD), indometacina (inhibidor de ciclooxigenasa), alopurinol (inhibidor de xantina oxidasa), L-NNA

(inhibidor de NOS) y difenilidonio (inhibidor de flavoproteínas) para evaluar la especificidad del ensayo.

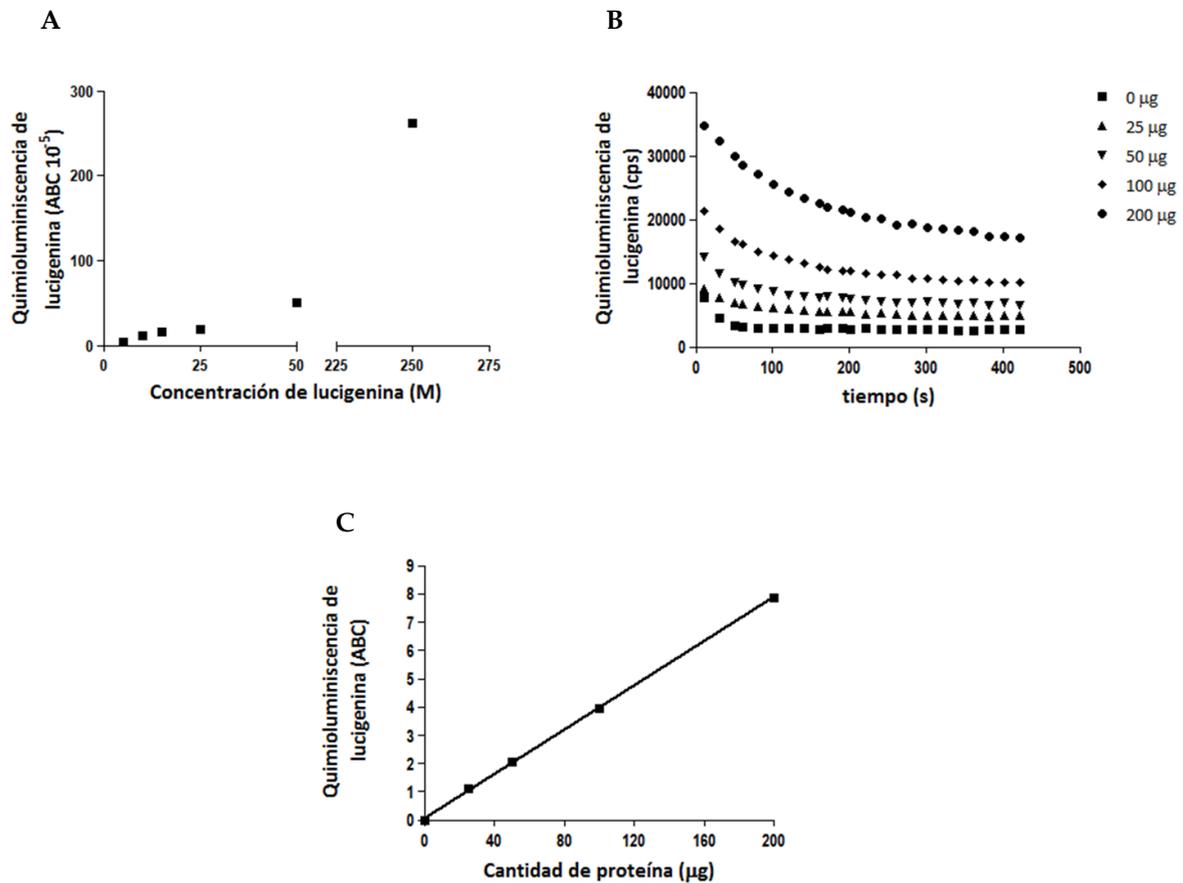


Figura 17. A) Quimioluminiscencia de lucigenina en ABC en función de concentraciones crecientes de lucigenina, en presencia de NADPH 40 μM y 100 μg de muestra. B) Quimioluminiscencia de lucigenina en cps en función del tiempo en homogeneizados de corazón libres de mitocondrias, en presencia de distintas cantidades de proteína, NADPH 40 μM y lucigenina 25 μM . C) Gráfico representativo de quimioluminiscencia de lucigenina expresado como ABC en función de la cantidad de proteína de homogeneizados de corazón.

11. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa

La enzima SOD cataliza la dismutación del anión superóxido a H_2O_2 y O_2 (Misra y Fridovich 1972), según la siguiente reacción:

SOD



El método para la determinación de SOD se basa en la inhibición de la autooxidación de adrenalina, en medio alcalino, dependiente del anión superóxido. La SOD presente en la muestra competirá por el anión superóxido producido por el sistema de detección. En medio alcalino, la oxidación de la adrenalina se convierte en una reacción en cadena, en la cual uno de los intermediarios es el anión superóxido y cuyo producto final es el adrenocromo. El adrenocromo es coloreado y puede detectarse espectrofotométricamente.

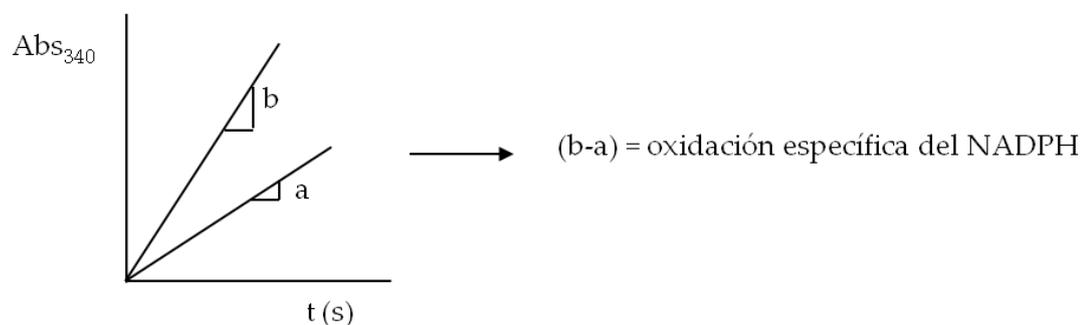
Para la determinación de la actividad de la SOD total (SOD total = CuZn-SOD + Mn-SOD) se monitoreó espectrofotométricamente la autooxidación de adrenalina, en un buffer conteniendo glicina 50 mM a pH 10,2 y a 30°C, en términos de la producción de adrenocromo en función del tiempo, el cual exhibe un máximo de absorción a 480 nm ($\epsilon = 4,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (modificado del método original de Misra y Fridovich 1972). Se determinó el cambio de absorbancia a 480 nm durante 2 min en ausencia o presencia de volúmenes variables de muestra y se calculó la pendiente $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ para cada caso.

Para expresar la actividad de SOD como unidades de SOD por mg proteína (U_{SOD}/mg proteína) se consideró 1 U_{SOD} al equivalente en mg de muestra que inhiben el 50% de la velocidad de formación de adrenocromo. Para determinar la actividad de Mn-SOD se realizó el mismo procedimiento que para la SOD total pero con el agregado de cianuro (2 mM) a la mezcla de reacción para inhibir la actividad de CuZn-SOD. Luego se calculó la actividad de la CuZn-SOD como la diferencia entre la actividad de la SOD total menos la actividad de Mn-SOD ($\text{CuZn-SOD} = \text{SOD total} - \text{Mn-SOD}$). Los resultados se expresaron como unidades de SOD/ mg proteína.

12. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa

La GPx, usando glutatión reducido (GSH) como cofactor, es la responsable de la detoxificación de H₂O₂. Durante esta reacción, el GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG), el cual luego es reducido por la enzima glutatión reductasa (GR), utilizando NADPH como cofactor para su reciclado.

La determinación de la actividad de GPx se realizó en homogeneizados de corazón midiendo el consumo de NADPH en la reacción de reducción del GSH por acción de la glutatión reductasa (GR) agregada exógenamente. Se monitoreó la desaparición de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), en un medio de reacción compuesto por GSH 1 mM, NADPH 0,15 mM, NaN₃ 1 mM, GR 0,25 U/ml, H₂O₂ 0,5 mM y fosfato de potasio 50 mM (pH 7,7) a 37°C (Gunzler y col. 1974). Se registró la variación de la absorbancia a 340 nm durante 1 min. A la variación en la absorbancia registrada en ausencia de muestra se la llamó *a*, y corresponde a la oxidación inespecífica del NADPH (ΔAbs inespecífica/min). Luego se agregó la muestra y se midió la variación en la absorbancia, a la cual se llamó *b*. Se calculó el valor de *b-a*, que corresponde a la oxidación específica del NADPH (ΔAbs específica/min) y se expresaron los resultados como U GPx/mg proteína según:



$$\text{U GPx/mg proteína} = \frac{2 \times [(\Delta\text{Abs específica/min})6,22] \times \text{vol final de reacción (ml)}}{\text{vol muestra (ml)} \times \text{mg/ml proteína de muestra}} \quad (25)$$

Una unidad de GPx se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de NADPH/min a 37 °C (Gunzler y col. 1974). Los resultados se expresaron como nmol NADPH/min.mg proteína.

13. Determinación de la actividad de catalasa

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del H_2O_2 en O_2 y H_2O , según:



El método para la detección de la actividad de catalasa se basa en la determinación de la velocidad de descomposición del H_2O_2 por la muestra en estudio.

La actividad de la catalasa se determinó en homogeneizados de corazón, siguiendo espectrofotométricamente la reducción de H_2O_2 ($\epsilon_{240\text{nm}} = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 240 nm en un medio de reacción compuesto por H_2O_2 10 mM y fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0) y calculando la constante de velocidad de pseudoprimer orden (k') de la disminución de la absorbancia del H_2O_2 como:

$$k' = k \cdot [\text{catalasa}]$$

donde $k = 4.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para catalasa (Aebi 1984) y $[\text{catalasa}]$ es la concentración de enzima presente en la muestra. Los resultados se expresaron como pmoles catalasa/mg proteína.

14. Determinación de la actividad de metaloproteasa de matriz extracelular tipo 9

La actividad de la metaloproteasa de matriz tipo 9, isoenzima encargada de degradar la matriz extracelular, se determinó en homogeneizados libres de mitocondrias. El método utilizado se modificó de Shimokawa y col. (2002). Las muestras se incubaron 10 min a temperatura ambiente en un buffer conteniendo glicerol 20% (v/v), SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) y Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) y luego se sembraron 100 μ g de proteína por muestra en un gel de poliacrilamida al 10% (p/v) conteniendo 0,1% (p/v) de gelatina.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis a 100 V (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, CA.) en condiciones no desnaturalizantes. Posteriormente, los geles se lavaron y se incubaron en buffer de renaturalización compuesto por Triton® X-100 al 2,5% (v/v) durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Luego se incubaron a 37°C, durante 20 h en buffer de revelado conteniendo NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, Igepal 0,02% (v/v) y Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). El gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue 0,5% (p/v) durante 30 min y luego se destiñó con una solución de ácido acético 10% (v/v) y metanol 50% (v/v). La actividad gelatinolítica se visualizó como bandas claras de proteólisis sobre el fondo azul del gel (Shimokawa Ki y col. 2002) (Figura 18). Los geles se fotografiaron con una cámara digital y luego se analizaron con el programa Image J (NHI, Bethesda, MD). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (U.A.).

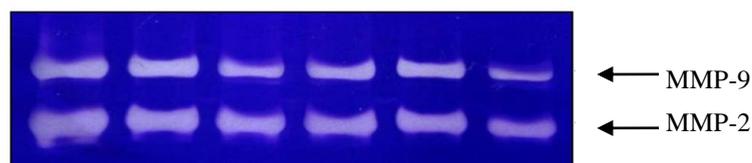


Figura 18. Gel representativo de la actividad de metaloproteasas determinadas mediante zimografía. Las bandas claras sobre fondo oscuro indican actividad gelatinolítica.

15. Determinación de la expresión de proteínas por Western Blot

Para evaluar la expresión de proteínas en homogeneizados de corazón de rata se llevaron a cabo ensayos de western blot. Inicialmente, las muestras se adicionaron con buffer Tris-HCl 200 mM (pH 6,8) conteniendo SDS 5% (p/v), glicerol 50% (v/v), β -mercaptoetanol 12,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v) y se incubaron durante 3 min a 100°C. Las proteínas (~40 μ g por muestra) se separaron por electroforesis (Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) en geles de poliacrilamida 7-10% (p/v) (según el peso molecular de la proteína a analizar) en condiciones desnaturalizantes. Estándares de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker-GE Healthcare, Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.) se corrieron simultáneamente. Luego de la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF utilizando una solución compuesta por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% (v/v) en un Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) a 110 V durante 90 min.

Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante 2 h en una solución conteniendo leche descremada 5% (p/v) en buffer fosfato salino (PBS) para impedir la unión inespecífica del anticuerpo a otras proteínas. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluído en una solución de leche descremada 1% (p/v) en PBS conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) durante 16 h a 4°C y en agitación. A continuación, se realizaron 3 ciclos de lavado de las membranas de 5 min con PBS-Tween y luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 90 min a temperatura ambiente y en agitación. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en la Tabla 7. Las bandas se revelaron usando un sistema de detección quimioluminiscente. Las placas se escanearon y el análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU.). La cantidad de proteína sembrada se normalizó por el contenido de β -actina o β -tubulina. La cantidad de proteína fosforilada se normalizó por el contenido de la

proteína total correspondiente. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de densidad óptica (U.A).

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para cada proteína evaluada por western blot.

Proteína a determinar	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
p-eNOS	Monoclonal de conejo, anti p-eNOS (Ser1177) (C9C3): 9570	Cabra anti IgG de conejo (sc-2030)
eNOS	Policlonal de conejo, anti eNOS (N-20): sc-654	Cabra anti IgG de conejo (sc-2030)
Nitrotirosinas	Monoclonal de ratón, anti nitrotirosina (HM11): sc-32731	Cabra anti IgG de ratón (sc-2005)
gp91^{phox}	Policlonal de cabra, anti gp-91-phox (K-15): sc-5826	Conejo anti IgG de cabra (sc-2768)
NOX4	Policlonal de cabra, anti NOX4 (N-15): sc-21860	Conejo anti IgG de cabra (sc-2768)
nNOS	Policlonal de conejo, anti NOS1 (R-20):sc-648	Cabra anti IgG de conejo (sc-2030)
iNOS	Monoclonal de ratón, anti NOS2 (C-11): sc-7271	Cabra anti IgG de ratón (sc-2005)
p-ERK	Monoclonal de ratón, anti p-ERK (E-4): sc-7383	Cabra anti IgG de ratón (sc-2005)
ERK	Policlonal de conejo, anti ERK1 (C-16): sc-93	Cabra anti IgG de conejo (sc-2030)
Mn-SOD	Monoclonal de ratón, anti SOD-2 (A-2): sc-133134	Cabra anti IgG de ratón (sc-2005)
β-actina	Monoclonal de ratón, anti β -actin (C-4): sc-47778	Cabra anti IgG de ratón (sc-2005)
β-tubulina	Policlonal de conejo, anti β -tubulina (H-235): SC-9104	Cabra anti IgG de conejo (sc-2030)

Los anticuerpos primarios se utilizaron en un rango de dilución de 1:750-1:1000. Los anticuerpos secundarios se utilizaron en un rango de dilución de 1:5000-1:10000.

16. Análisis histológico del corazón

Una porción de ventrículo izquierdo de corazón se fijó en formaldehído al 10% (v/v) en solución fosfato 0,1 M (pH 7,2) y luego se incluyó en parafina. El tejido fijado se cortó en secciones de 3 micrones los cuales se tiñeron con: i) hematoxilina-eosina (H-E) que tiñe estructuras ácidas como los núcleos en azul y componentes básicos como el citoplasma en rosa y ii) tricrómico de Masson, tinción que permite visualizar las fibras de colágeno tipo I las cuales se tiñen de color azul.

17. Métodos estadísticos

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianzas (ANOVA) utilizando el programa Graphpad Prism 4 (Graphpad software Inc., San Diego, California, EE. UU.) seguido del test de Bonferroni de comparaciones múltiples. Para examinar las diferencias entre la media de los grupos se consideró estadísticamente significativa una diferencia de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como el valor medio \pm ESM (error estándar de la media).

Resultados



Estudio 1

Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

RESULTADOS

Estudio 1

1. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

Se estudió el efecto de la administración de EC en la dieta sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en un modelo de HT por disminución de la producción de NO en ratas tratadas con L-NAME. Dicho compuesto es un análogo de la L-arginina y actúa como inhibidor competitivo de la actividad de NOS (Rees y col. 1990). Para este estudio se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 130 g de peso que recibieron un tratamiento con L-NAME (360 mg/L de agua de bebida) y/o EC (4 g/kg de dieta control) durante 4 días. Las ratas se dividieron al azar en tres grupos experimentales: i) Control (C), ii) L-NAME (LN) y iii) L-NAME + EC (LN-EC).

1.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante el tratamiento experimental

Los valores del peso corporal al inicio y al final del tratamiento y del consumo de bebida y alimento se muestran en la Tabla 8 y no fueron significativamente diferentes entre los grupos estudiados.

Tabla 8. Peso corporal inicial y final y consumo de bebida y alimento de los grupos experimentales a lo largo del tratamiento.

Parámetro	Grupos		
	C	LN	LN-EC
Peso corporal inicial (g)	137 ± 4	133 ± 5	126 ± 5
Peso corporal final (g)	154 ± 3	148 ± 4	141 ± 3
Consumo de bebida (ml/d)	29 ± 5	26 ± 3	30 ± 2
Consumo de alimento (g/d)	22 ± 1	22 ± 1	22 ± 2

Dado que el consumo de bebida fue similar en los grupos LN y LN-EC, la cantidad de L-NAME consumido no resultó significativamente diferente. Este resultado se corroboró, en un experimento paralelo, a través de la determinación de la concentración plasmática del metabolito del L-NAME, N ω -nitro-L-arginina (L-NNA), que no resultó significativamente diferente entre ambos grupos. Las ratas que no recibieron L-NAME en la bebida no presentaron niveles detectables de L-NNA en plasma (Tabla 9). Además, la cantidad de EC consumida por el grupo LN-EC fue de 304 ± 16 mg/kg peso corporal/d, que se asoció a una concentración plasmática de 6 μ M (correspondiente a la sumatoria de EC libre y sus metabolitos sulfatados y glucuronidados). Los grupos que no recibieron EC en la dieta (grupos C y LN), no mostraron niveles plasmáticos detectables de este flavonoide (Tabla 9). Con el propósito de evaluar posibles interacciones entre ambos compuestos se diseñó un protocolo con un grupo experimental adicional, que recibió agua como bebida y dieta suplementada con EC (4 g/kg de dieta control) (grupo EC). En este grupo, la concentración plasmática de EC al final del tratamiento resultó similar a la concentración medida en el grupo LN-EC (Tabla 9).

Tabla 9. Concentraciones plasmáticas de L-NNA y de (-)-epicatequina y cálculo de la cantidad consumida de L-NAME y de (-)-epicatequina de los distintos grupos experimentales.

Parámetro	Grupos			
	C	EC	LN	LN-EC
Cantidad consumida de L-NAME (mg/kg peso corporal/d)	-	-	39 ± 1	40 ± 1
L-NNA plasmático (μM)	nd	nd	39 ± 9	50 ± 7
Cantidad de EC consumida (mg/kg peso corporal/d)	-	364 ± 28	-	304 ± 16
EC plasmática (μM)	nd	9 ± 1	nd	$6,0 \pm 0,9$

Datos tomados de Litterio y col, 2012. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). nd: hace referencia a valores que se encuentran por debajo de los límites de detección en las condiciones ensayadas en cada determinación.

1.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco

La PAS determinada al comienzo del estudio fue similar en los tres grupos experimentales. Al día 2, la PAS del grupo LN fue significativamente mayor que en el grupo control y continuó aumentando a lo largo del tratamiento. Los animales que recibieron EC mostraron una PAS significativamente menor a partir del día 3 comparado con el grupo LN y siendo aún mayor la diferencia al finalizar el tratamiento (Figura 19). Los valores de las PAS finales fueron: C=127 ± 5; LN=159 ± 7* y LN-EC=140 ± 5 mmHg (*p<0,05 vs. C y LN-EC).

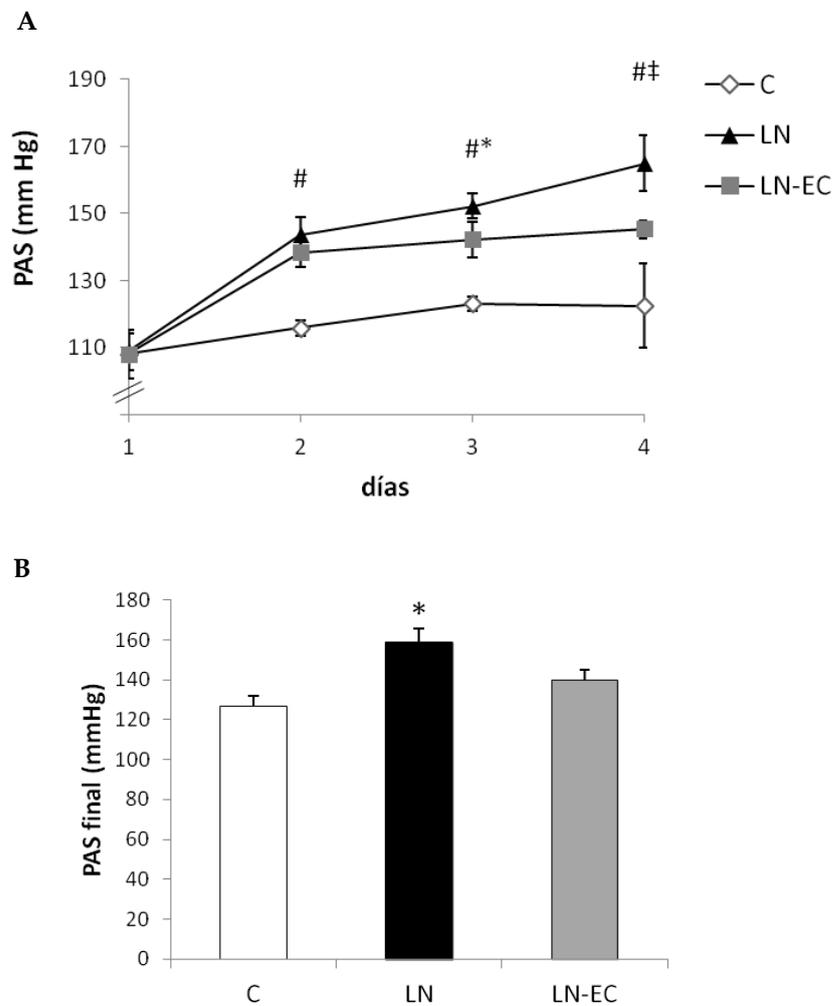


Figura 19. A) Evolución de la PAS a lo largo de los 4 días de tratamiento para los grupos C, LN y LN-EC (#p<0,001 vs. C; *p<0,05 vs. LN-EC; †p<0,01 vs. LN-EC). B) PAS final (día 4) para

los grupos C, LN y LN-EC (* $p < 0,05$ vs. C y LN-EC). Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8).

Se evaluó el peso del corazón y el índice cardíaco, determinado como el cociente entre el peso del corazón y el peso corporal, así como la actividad de la metaloproteasa de matriz tipo 9 (MMP-9), como indicadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros para los distintos grupos experimentales a pesar del aumento de la PAS observado en el grupo LN (Tabla 10).

Tabla 10. Peso del corazón, índice cardíaco y actividad de MMP-9 de los distintos grupos experimentales.

Parámetro	Grupos		
	C	LN	LN-EC
Peso corazón (g)	0,96 \pm 0,07	0,95 \pm 0,06	0,84 \pm 0,06
Índice cardíaco (10^{-3})	4,7 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	4,1 \pm 0,1
Actividad de MMP-9 (U.A.)	1,07 \pm 0,06	1,30 \pm 0,09	1,20 \pm 0,03

Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8).

1.3. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron los niveles de GSH y GSSG y el contenido de TBARS en corazón.

Los resultados muestran que en el grupo tratado simultáneamente con L-NAME y EC, se produjo un incremento de los niveles de GSH ($p < 0,05$) (Figura 20A). El aumento de GSH condujo a una disminución significativa del índice GSSG/GSH² en el mismo grupo, comparado con el grupo LN (~40%) (Figura 20B). En cuanto al contenido de TBARS se puede observar que tanto el L-NAME como la EC no afectaron la formación de TBARS en el tejido cardíaco (Figura 21).

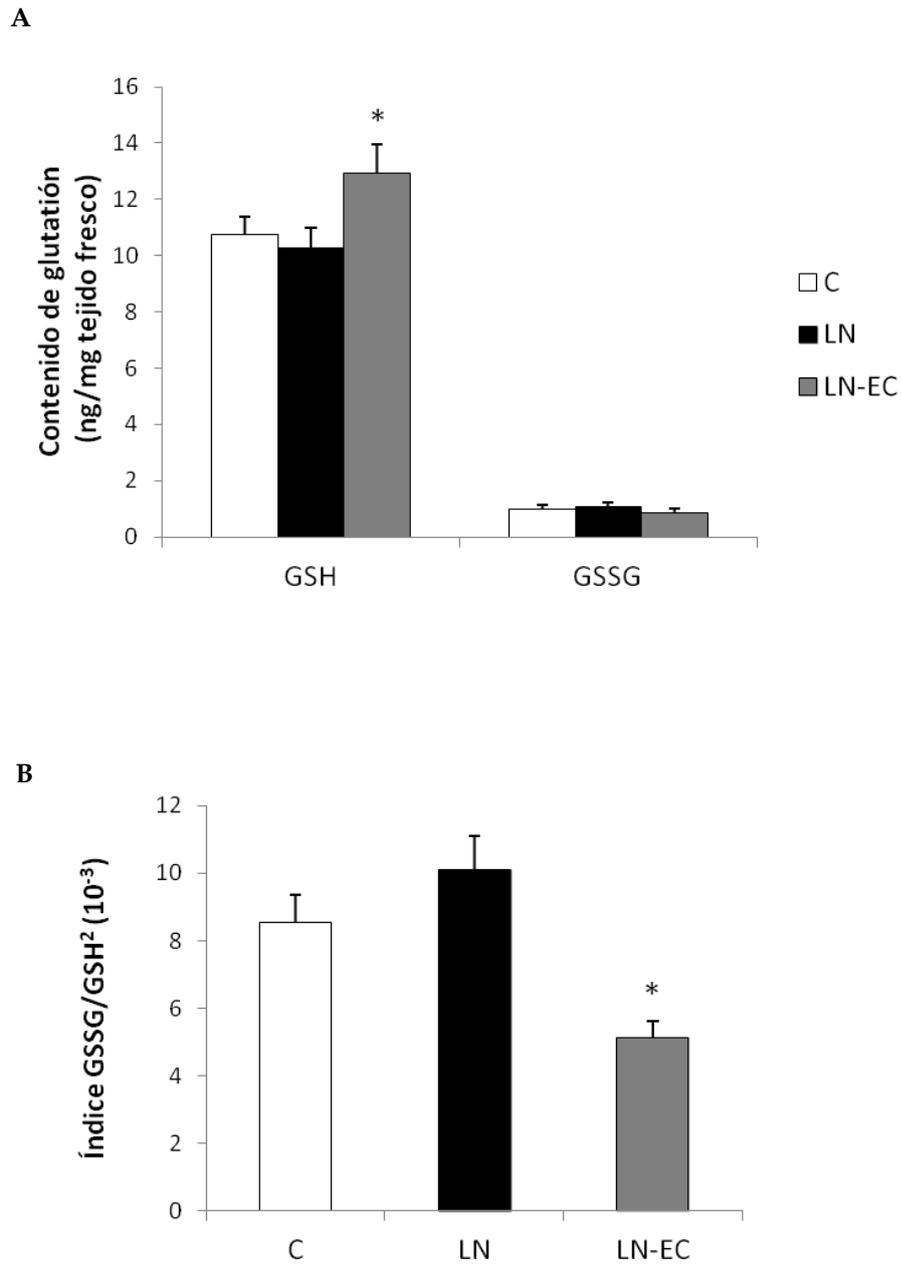


Figura 20. Efecto de (-)-epicatequina sobre A) el contenido de GSH y GSSG y B) el índice GSSG/GSH², en tejido cardíaco, para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio ± ESM (n = 8). *p<0,05 vs. LN.

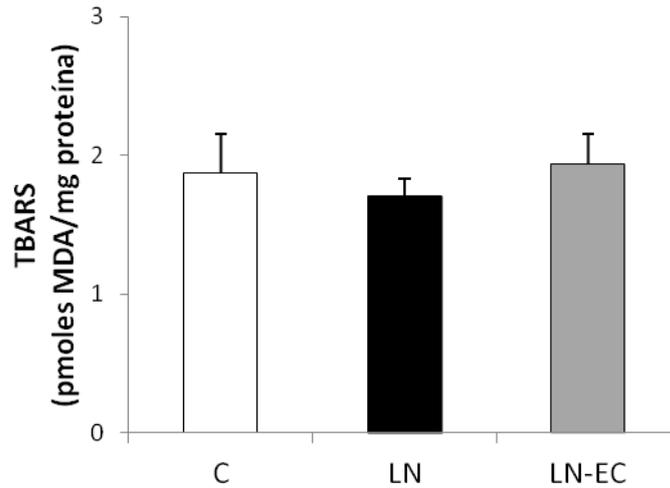


Figura 21. Contenido de TBARS, para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8).

1.4. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de iNOS

Para examinar el efecto de los tratamientos con L-NAME y/o EC sobre la producción de NO en corazón se midieron: i) la actividad de NOS en ventrículo izquierdo, ii) los niveles de fosforilación de eNOS y iii) la expresión de iNOS en homogeneizados de corazón.

Los resultados muestran que en el grupo LN la actividad de NOS fue significativamente menor que la de los grupos C y LN-EC. Además, el tratamiento con EC mostró una actividad de NOS significativamente mayor que el grupo C ($p < 0,05$) (Figura 22A). La administración de EC previno la disminución de los niveles de fosforilación de la eNOS provocada por el tratamiento con L-NAME, mostrando valores similares al control (Figura 22B). No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de iNOS entre los grupos experimentales (Figura 22C).

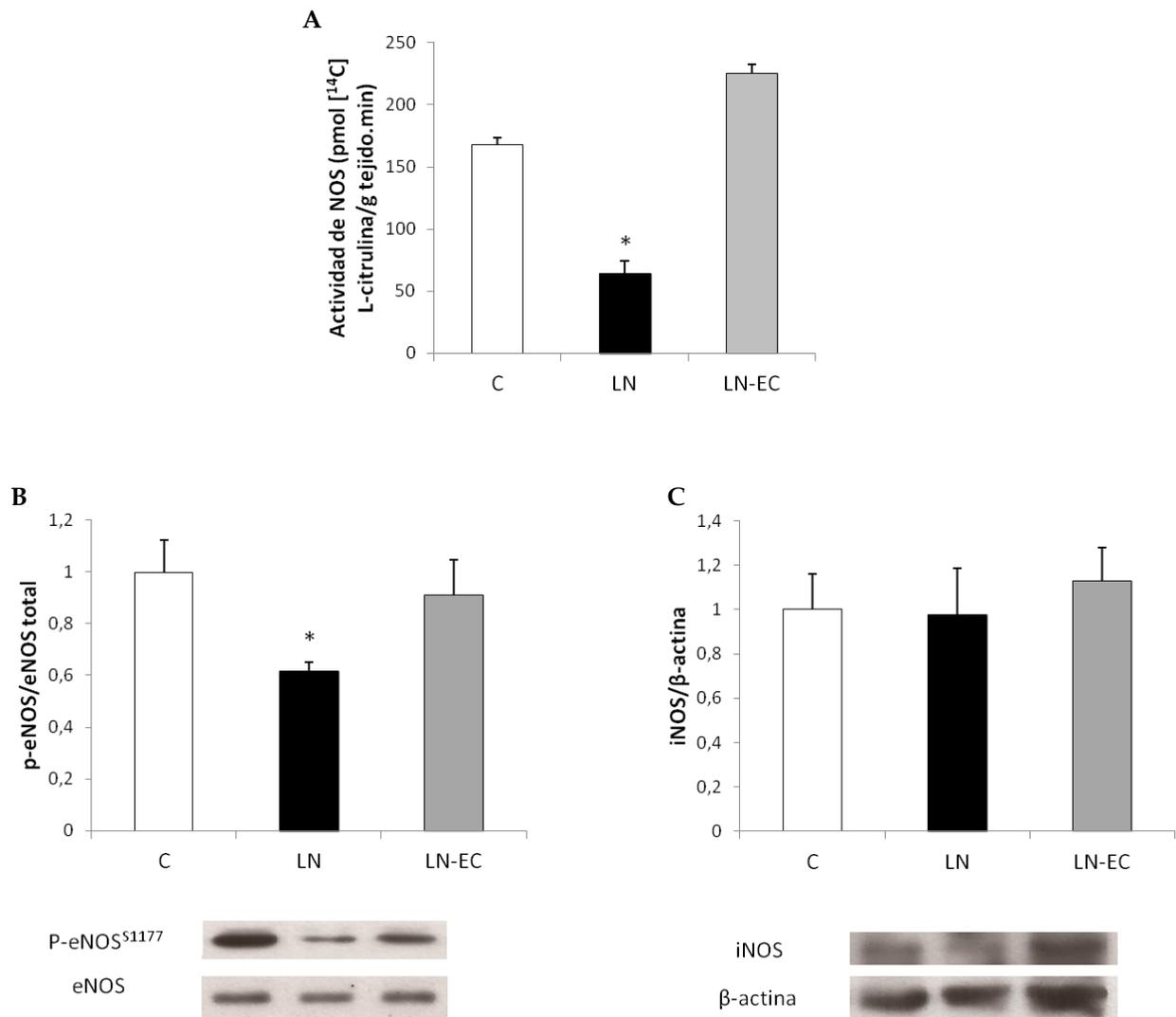


Figura 22. Efecto de (-)-epicatequina sobre A) la actividad de NOS, B) los niveles de fosforilación de eNOS y C) la expresión de iNOS, en tejido cardíaco para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). *p<0,05 vs. C y LN-EC.

1.5. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47^{phox}, gp91^{phox} y NOX4

Para estudiar la capacidad del tejido cardíaco de generar anión superóxido en este modelo se determinaron: i) la producción de anión superóxido en presencia de SOD y ii) la expresión de las subunidades gp91^{phox}, p47^{phox} y NOX4, en homogeneizados de corazón.

Los resultados muestran que la administración de EC previno el incremento en la producción de anión superóxido observado en el grupo LN ($p < 0,05$; Figura 23A). La disminución en la producción de anión superóxido en el grupo LN-EC se acompañó de una expresión de $p47^{phox}$ significativamente menor en el mismo grupo (Figura 23B). La expresión de $gp91^{phox}$ y NOX4 fue similar en los tres grupos estudiados (Figuras 23C y 23D).

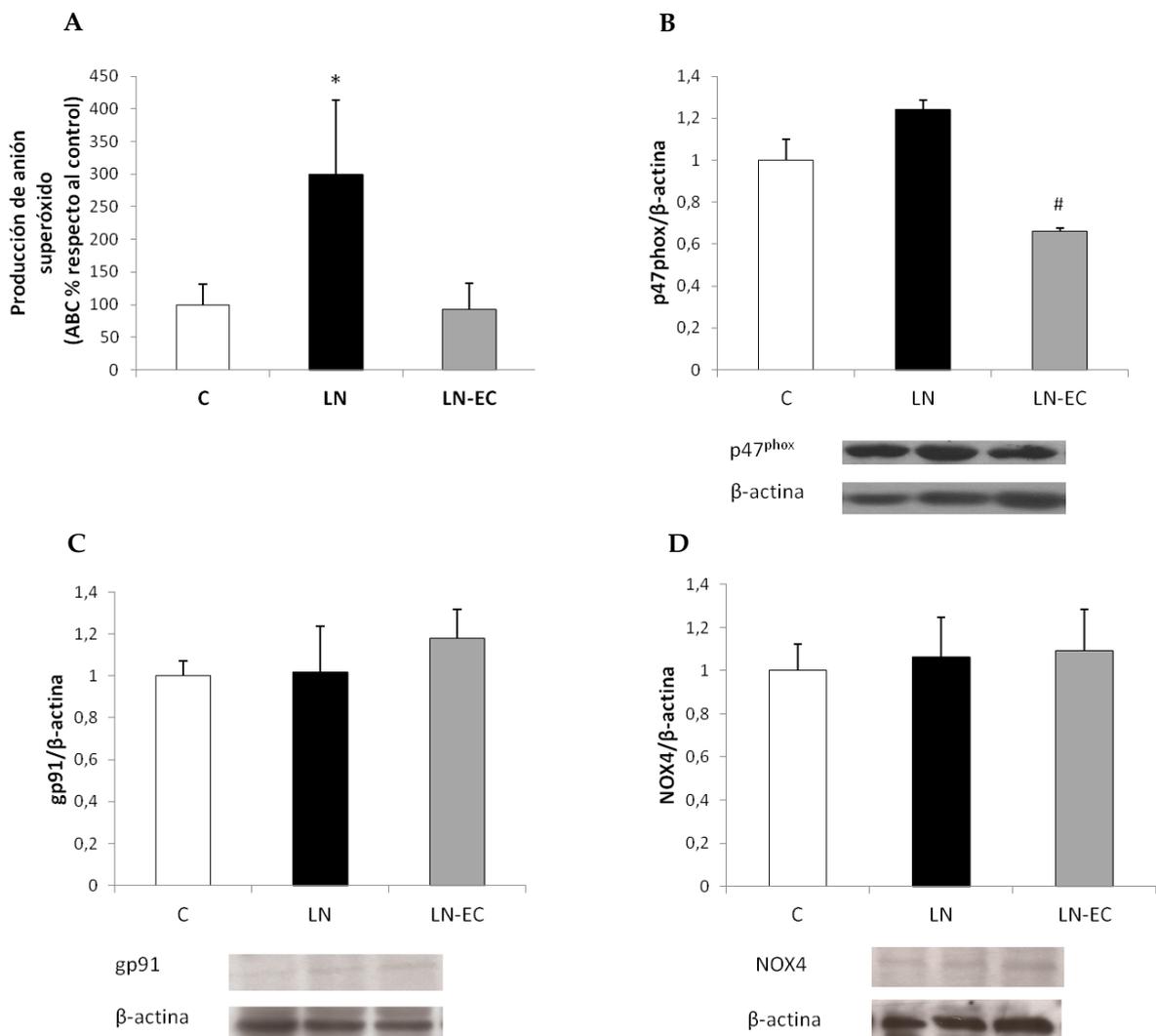


Figura 23. Efecto de (-)-epicatequina sobre A) la producción de anión superóxido y la expresión de la subunidades B) $p47^{phox}$, C) $gp9^{phox}$ y D) NOX4, en tejido cardíaco para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM ($n=8$). * $p < 0,05$ vs. C y LN-EC; # $p < 0,05$ vs. LN.

1.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa

Dado que el tratamiento con L-NAME generó un aumento del índice GSSG/GSH² y un incremento en la producción de anión superóxido, se decidió evaluar la actividad y la expresión de las enzimas antioxidantes encargadas de detoxificar el anión superóxido y el H₂O₂.

Los resultados muestran una actividad de SOD total y CuZn-SOD significativamente mayor en el grupo LN comparado con el grupo LN-EC en el día 4 de tratamiento (Figura 24). Para el caso de Mn-SOD, tanto la actividad como la expresión de la proteína fueron significativamente menores en el grupo LN con respecto a C ($p < 0,05$), y la administración de EC previno la disminución en la expresión de Mn-SOD, no así en su actividad ($p < 0,05$) (Figura 25).

En cuanto a la GPx, los resultados indican una actividad significativamente mayor en el grupo LN respecto al grupo C. Dicho aumento no se observó luego del tratamiento con EC ($p < 0,05$) (Figura 26A).

No se encontraron diferencias significativas para la actividad de catalasa entre los grupos estudiados (Figura 26B).

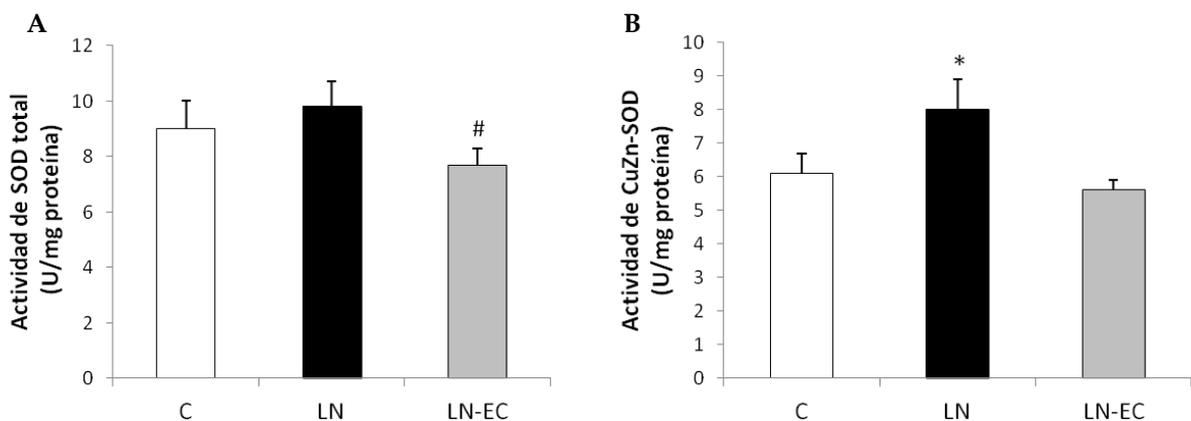


Figura 24. Efecto de (-)-epicatequina sobre la actividad de A) SOD total y B) CuZn-SOD, en tejido cardíaco para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM ($n=8$). # $p < 0,05$ vs. LN; * $p < 0,05$ vs. C y LN-EC.

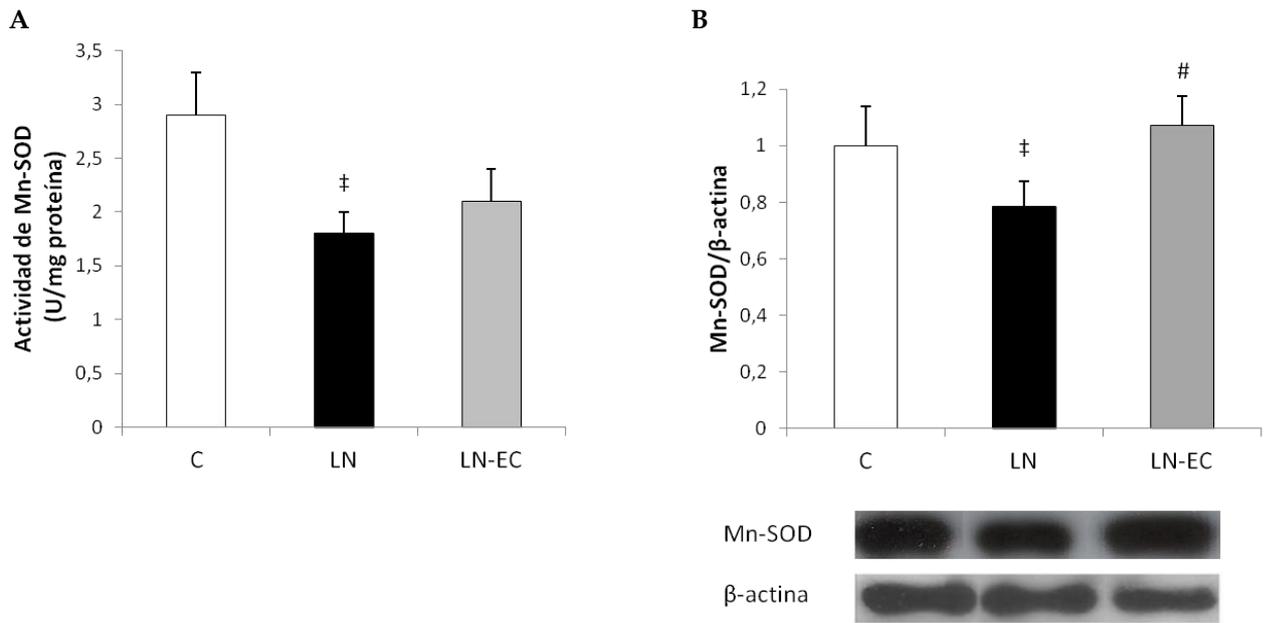


Figura 25. Efecto de (-)-epicatequina sobre la actividad de A) Mn-SOD y B) la expresión de Mn-SOD, en tejido cardíaco para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). $p^{\ddagger}<0,05$ vs. C; $\#p<0,05$ vs. LN.

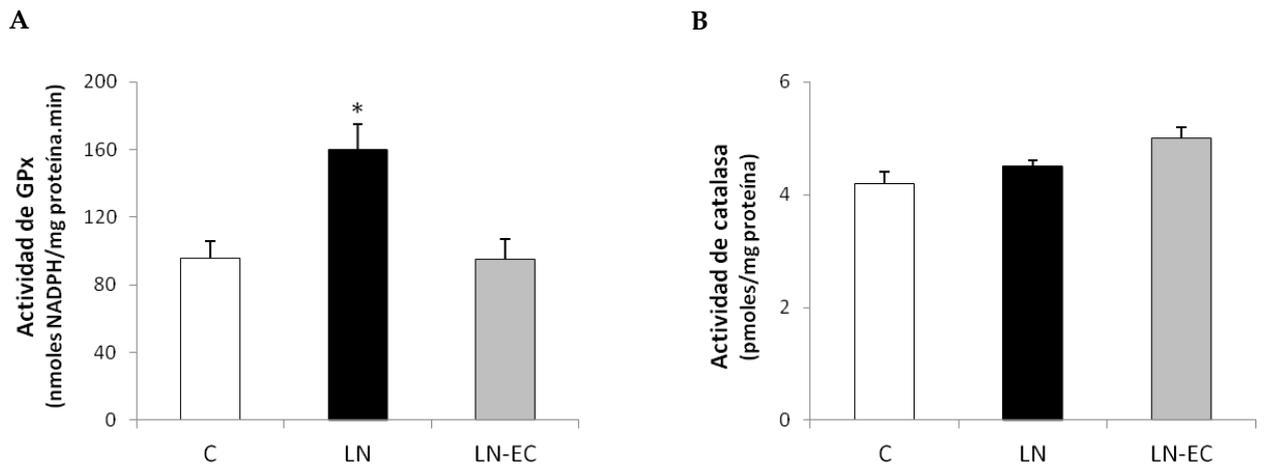


Figura 26. Efecto de (-)-epicatequina sobre la actividad enzimática de A) GPx y B) catalasa en tejido cardíaco para los grupos C, LN y LN-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). $*p<0,05$ vs. C y LN-EC.

Estudio 2

Efectos de quercetina (QC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.

Estudio 2**2. Efectos de quercetina (QC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de inhibición de NOS por tratamiento de ratas con L-NAME.**

Se estudió el efecto de la administración de QC en la dieta sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco, en un modelo de HT por disminución de la producción de NO en ratas tratadas con L-NAME. Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 130 g de peso que recibieron L-NAME (360 mg/L de agua de bebida) y/o QC (4 g/kg de dieta control) durante 4 días. Las ratas se dividieron al azar en cuatro grupos experimentales: i) Control (C), ii) quercetina (QC), iii) L-NAME (LN) y iv) L-NAME + quercetina (LN-QC).

2.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante el tratamiento experimental

Los valores del peso corporal al inicio y al final del tratamiento y del consumo de bebida y alimento se muestran en la Tabla 11 y no fueron significativamente diferentes entre los grupos estudiados.

Tabla 11. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de los grupos experimentales.

Parámetro	Grupos			
	C	QC	LN	LN-QC
Peso corporal inicial (g)	122 ± 5	133 ± 4	126 ± 3	136 ± 4
Peso corporal final (g)	140 ± 5	148 ± 5	144 ± 3	153 ± 5
Consumo de bebida (ml/d)	49 ± 6	40 ± 5	51 ± 5	53 ± 5
Consumo de alimento (g/d)	27 ± 2	25 ± 4	25 ± 4	29 ± 1

Los valores indican el promedio ± ESM (n = 8).

Dado que el consumo de alimento y bebida fue similar entre los grupos, la cantidad de L-NAME consumido así como la cantidad estimada de QC ingerida no resultó significativamente diferente.

2.2. Efectos de quercetina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia cardíaca

La PAS determinada al comienzo del estudio fue similar en todos los grupos experimentales. Al día 2, la PAS del grupo LN fue significativamente mayor que en el grupo control y continuó aumentando a lo largo del tratamiento (Figura 27A). Los animales que recibieron QC mostraron una PAS significativamente menor a partir del día 3 comparado con el grupo LN, siendo aún mayor la diferencia al finalizar el tratamiento (Figura 27B). Los valores de las PAS finales fueron: C = 102 ± 3 ; QC = 104 ± 5 ; LN = 145 ± 2 * y LN-QC = 111 ± 3 mmHg; * $p < 0,0001$ vs. C, QC y LN-QC.

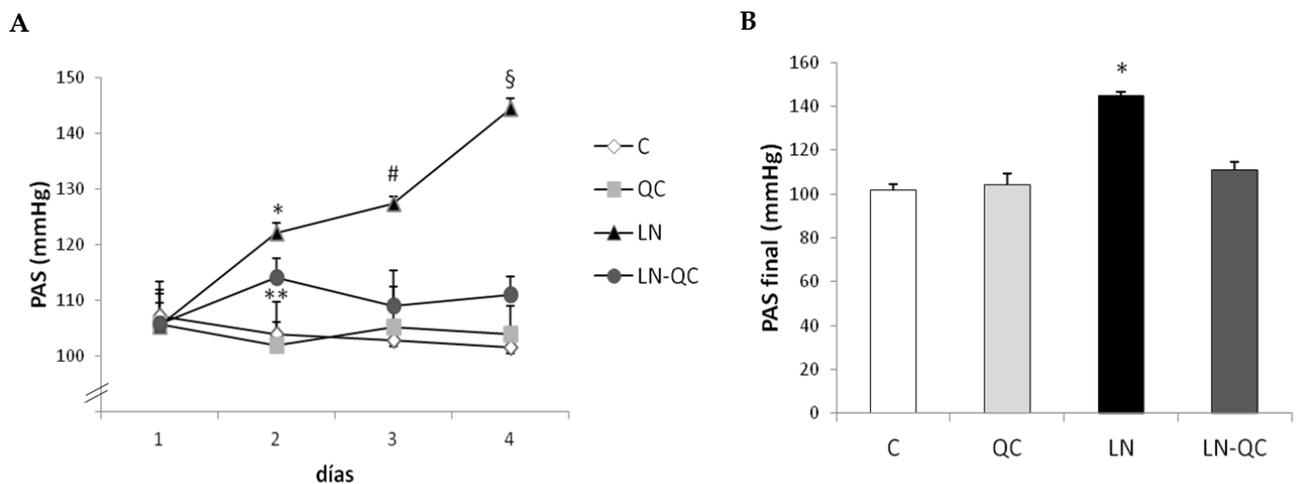


Figura 27. A) Evolución de la PAS a lo largo de los 4 días de tratamiento para los grupos C, QC, LN y LN-QC (* $p < 0,05$ LN vs. C y QC; ** $p < 0,05$ LN-QC vs. C y QC; # $p < 0,001$ LN vs. C, QC y LN-QC; § $p < 0,0001$ LN vs. C, QC y LN-QC). B) PAS final (día 4) para los grupos C, QC, LN y LN-QC (* $p < 0,0001$ vs. C, QC y LN-QC). Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8).

Se evaluaron como indicadores de hipertrofia, el peso del corazón y el índice cardíaco determinado como el cociente entre el peso del corazón y el peso corporal (Tabla 12). No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros para los distintos grupos experimentales a pesar del aumento de la PAS observado en el grupo LN.

Tabla 12. Peso del corazón e índice cardíaco de los distintos grupos experimentales.

Parámetro	Grupos			
	C	QC	LN	LN-QC
Peso del corazón (g)	0,65 ± 0,03	0,67 ± 0,04	0,60 ± 0,03	0,65 ± 0,03
Índice cardíaco (10⁻³)	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,1

Los valores indican el promedio ± ESM (n=8).

2.3. Efectos de quercetina sobre marcadores de estrés oxidativo

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) por HPLC y el nivel de nitrotirosinas en corazón. Los resultados mostraron que en los grupos QC y LN-QC el índice GSSG/GSH² fue significativamente menor que en el grupo LN (p<0,05). Esta disminución del cociente se produjo a expensas de una disminución en los niveles de GSSG en el grupo LN-QC (Figura 28). Los niveles de nitrotirosinas se determinaron en homogeneizados de corazón sin encontrar diferencias significativas entre los distintos grupos estudiados (Figura 29).

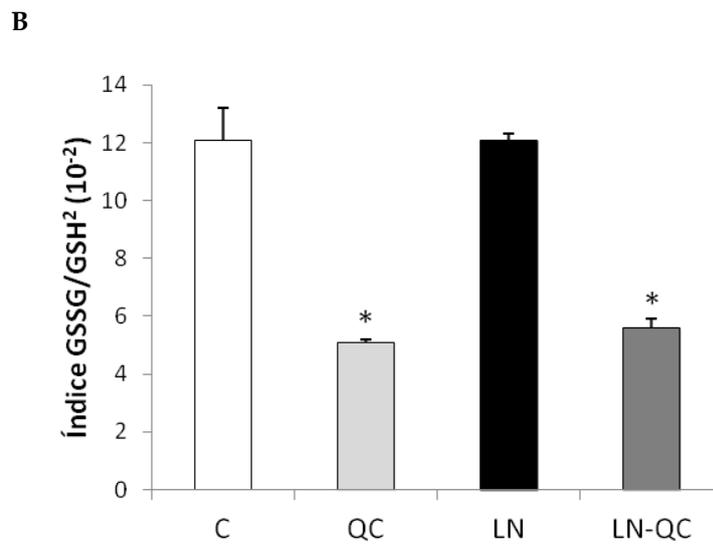
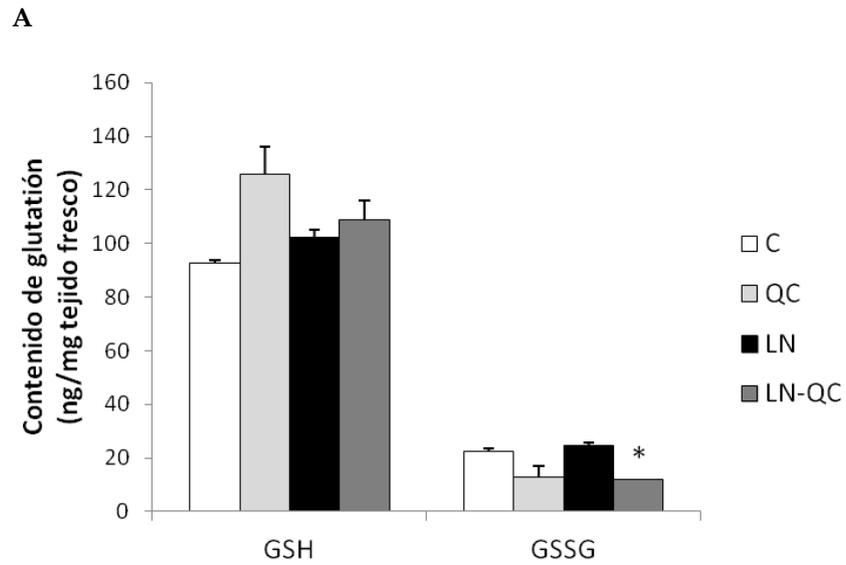


Figura 28. Efecto de quercetina sobre A) los niveles de GSH y GSSG (* $p < 0,05$ LN-QC vs. LN) y B) el índice GSSG/GSH² (* $p < 0,05$ Q y LN-QC vs. LN), en tejido cardíaco, para los grupos C, QC, LN y LN-QC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=4).

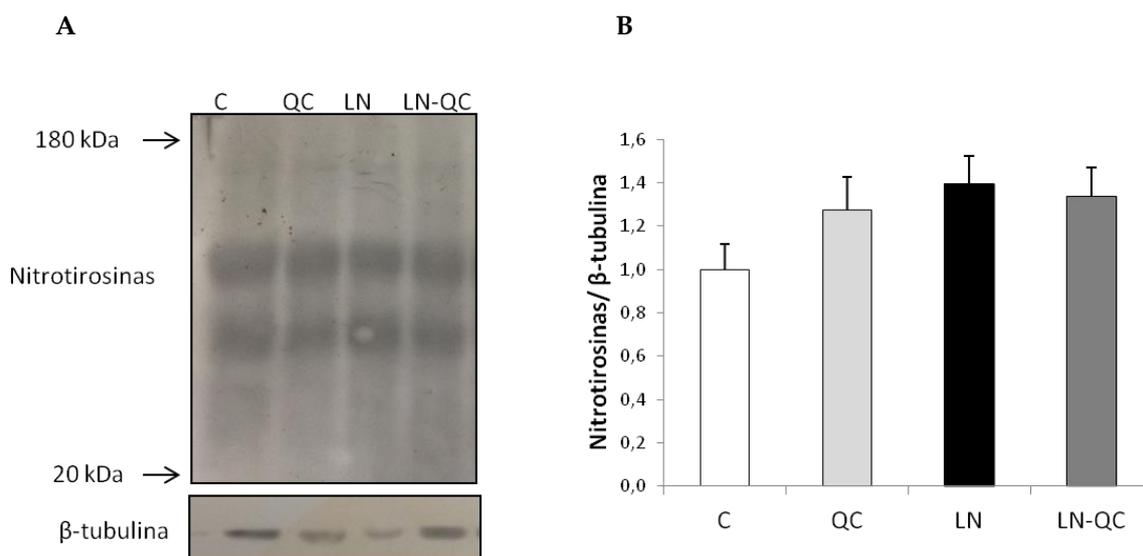


Figura 29. A) Imagen representativa del western blot para nitrotirosinas en homogeneizados de corazón y B) su cuantificación para los grupos C, QC, LN y LN-QC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=6).

2.4. Efectos de quercetina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de eNOS, nNOS e iNOS

Para examinar el efecto de los tratamientos con L-NAME y/o QC sobre la producción de NO en corazón se determinaron: i) la actividad de NOS en ventrículo izquierdo, ii) los niveles de fosforilación de eNOS y iii) la expresión de eNOS, nNOS e iNOS en homogeneizados de corazón.

Los resultados muestran que en el grupo LN la actividad de NOS fue significativamente menor que la de los grupos C y QC y que el tratamiento con QC no previno la disminución de la actividad de NOS observado en el grupo LN (Figura 30A). Los niveles de fosforilación de eNOS, así como la expresión de eNOS y nNOS, no mostraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figuras 30B, 30C y 3D, respectivamente). En cuanto a la expresión de iNOS, el grupo LN mostró una expresión significativamente mayor comparado con los otros grupos (Figura 30E).

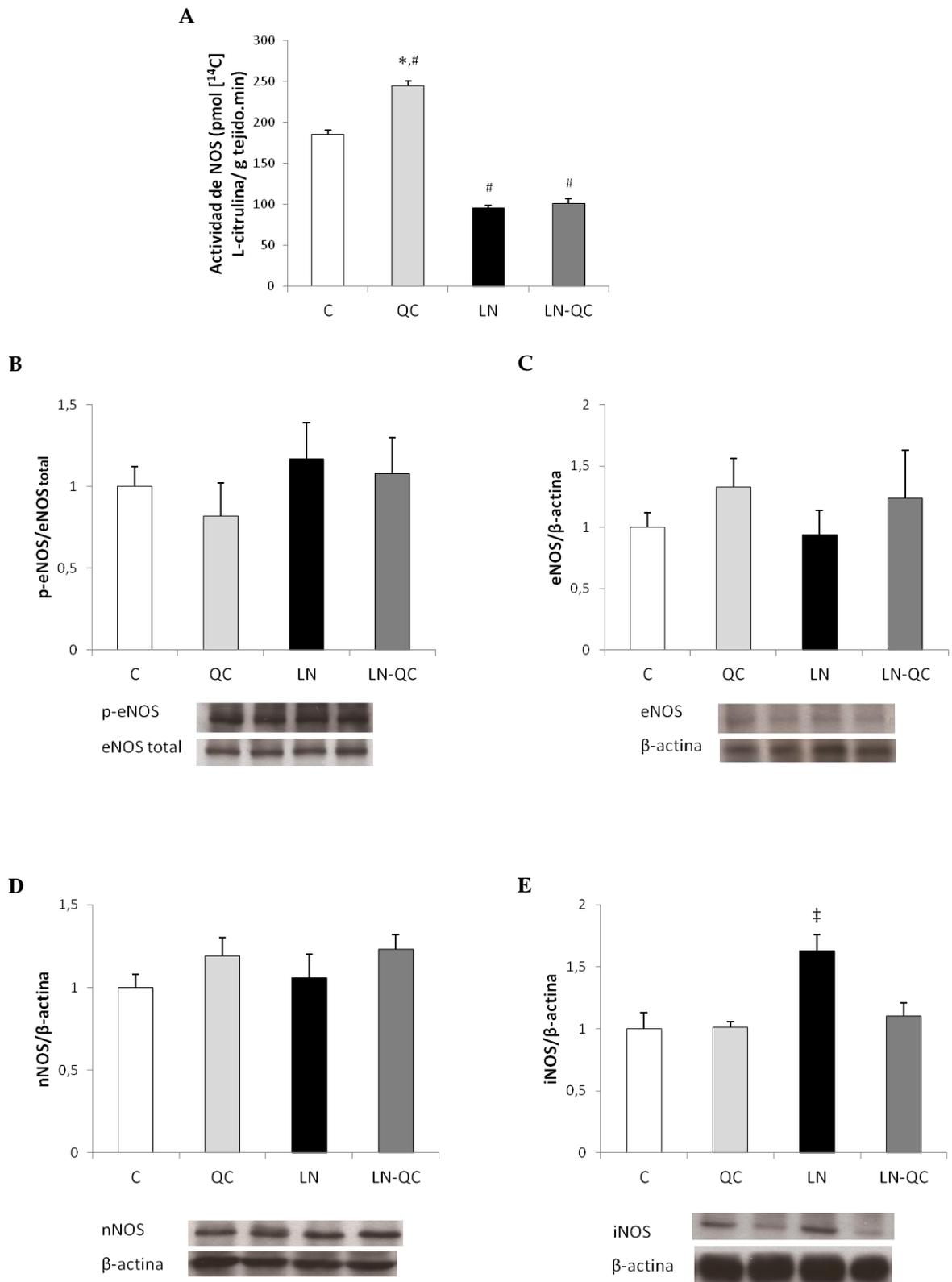


Figura 30. Efecto de quercetina sobre A) la actividad de NOS, B) los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de C) eNOS total, D) nNOS e E) iNOS, en tejido cardíaco para los grupos C, QC, LN y LN-QC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=6). *p<0,05 vs. C, LN y LN-QC; #p<0,05 vs C; ‡p<0,05 vs. C, QC y LN-QC.

2.5. Efectos de quercetina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47^{phox} y NOX4

Para estudiar la capacidad del tejido cardíaco de generar anión superóxido en este modelo se determinaron: i) la producción de anión superóxido en presencia de la enzima SOD y ii) la expresión mediante western blot de p47^{phox} y NOX4 en homogeneizados de corazón.

Los resultados muestran que la administración de QC previno el incremento de la producción de anión superóxido observado en el grupo LN ($p < 0,01$) (Figura 31A). En LN se observó un aumento de la expresión de p47^{phox} (* $p < 0,01$ LN vs. C y QC y # $p < 0,05$ LN vs. LN-QC) (Figura 31B). La disminución de la producción de anión superóxido en el grupo LN-QC fue acompañado por una expresión de p47^{phox} significativamente menor en el mismo grupo (Figura 30B). No se encontraron diferencias entre los grupos para la expresión de NOX4 (Figura 31C).

2.6. Efectos de quercetina sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)

Dado que el tratamiento con L-NAME generó un aumento del índice GSSG/GSH² y un incremento en la producción de anión superóxido, se decidió evaluar las enzimas antioxidantes encargadas de detoxificar el anión superóxido y el H₂O₂.

Los resultados muestran un aumento significativo de la actividad de SOD en el grupo LN comparado con los otros grupos, mientras que el consumo de QC previno dicho aumento (* $p < 0,05$ LN vs. LN-QC) (Figura 32A).

En cuanto a la enzima GPx los resultados indican una actividad significativamente mayor en el grupo LN respecto al grupo LN-QC (* $p < 0,05$) (Figura 32B).

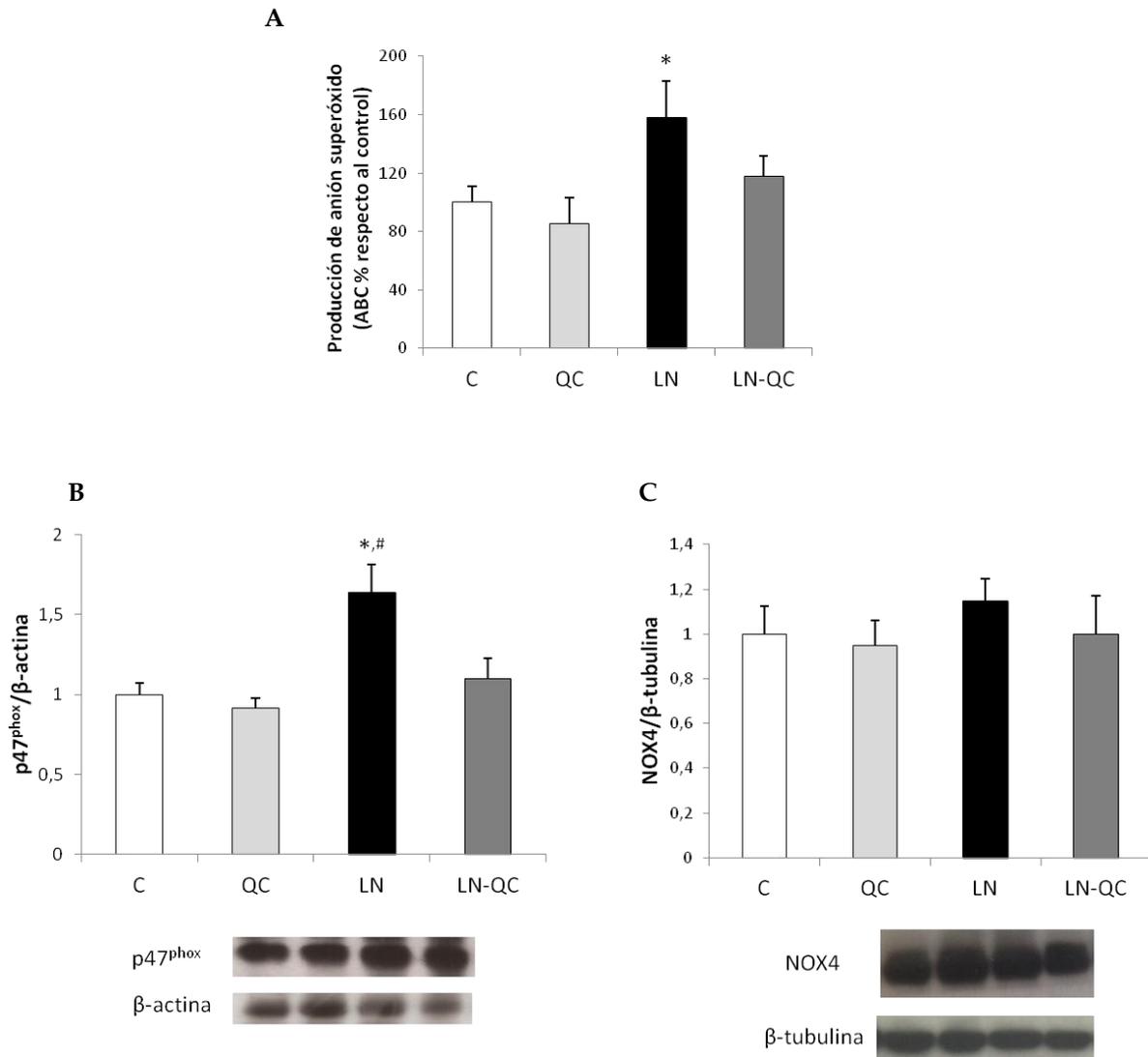


Figura 31. Efecto de quercetina sobre A) la producción de anión superóxido y la expresión de las subunidades B) p47^{phox} y C) NOX4, en tejido cardíaco para los grupos C, QC, LN y LN-QC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). *p<0,01 vs. C y QC; #p<0,05 vs. LN-QC.

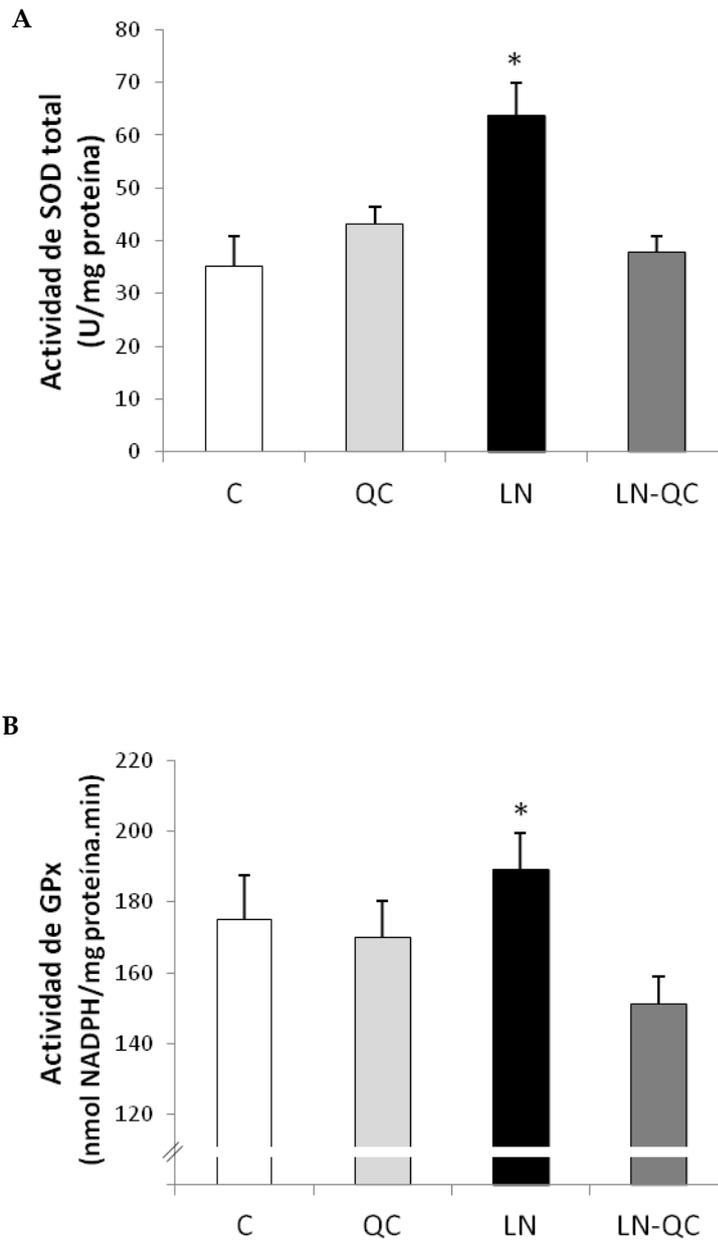


Figura 32. Efecto de quercetina sobre la actividad enzimática de A) SOD y B) GPx, en tejido cardíaco para los grupos C, QC, LN y LN-QC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8). *p<0,05 vs. LN-QC.

Estudio 3

Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de ratas sometidas a sobrecarga de fructosa.

Estudio 3**3. Efectos de (-)-epicatequina (EC) sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en tejido cardíaco en un modelo de ratas con sobrecarga de fructosa**

Se estudió el efecto de la administración de EC en la dieta sobre el metabolismo de NO y de anión superóxido en un modelo de ratas sometidas a sobrecarga de fructosa.

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley de aproximadamente 100 g de peso que recibieron un tratamiento con fructosa en el agua de bebida (10% p/v) y/o EC en la dieta (0,2 g/kg de dieta control) durante 8 semanas. Las ratas se dividieron al azar en tres grupos experimentales: i) Control (C), ii) Fructosa (F) y iii) Fructosa + EC (F-EC).

3.1. Peso corporal y consumo de bebida y alimento de las ratas durante el tratamiento experimental

El peso corporal, así como la cantidad de alimento y bebida ingerida a lo largo del tratamiento no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Tabla 13).

Tabla 13. Peso corporal inicial y final y consumo de alimento y bebida en los grupos C, F y F-EC a lo largo del tratamiento.

Parámetro	Grupos		
	C	F	F-EC
Peso corporal inicial (g)	97 ± 8	104 ± 12	99 ± 8
Peso corporal final (g)	334 ± 12	313 ± 11	325 ± 13
Consumo de bebida (ml/d)	45 ± 2	53 ± 4	57 ± 4
Consumo de alimento (g/d)	25 ± 2	20 ± 1	18 ± 1

Los valores indican el promedio ± ESM (n=10).

3.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre parámetros metabólicos

Para estudiar los efectos potenciales de EC en la prevención y/o atenuación de los parámetros metabólicos alterados por la sobrecarga de fructosa, se determinaron los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL y glucosa luego de las 8 semanas de tratamiento (Tabla 14). El grupo F presentó dislipidemia evidenciada por un mayor contenido plasmático de triglicéridos y de colesterol-LDL ($p < 0.05$ vs C y F-EC) que no se observó en el grupo F-EC. Con respecto a los niveles de colesterol total y el contenido de colesterol-HDL, no se encontraron diferencias entre los grupos C y F. Sin embargo, las ratas tratadas simultáneamente con fructosa y EC mostraron un menor nivel de colesterol total y un aumento en los niveles de colesterol-HDL comparado con los otros dos grupos ($p < 0.05$). En cuanto a los niveles plasmáticos de glucosa, los mismos no se vieron afectados por los distintos tratamientos.

Tabla 14. Parámetros metabólicos en los grupos C, F y F-EC luego de 8 semanas de tratamiento.

Parámetro	Grupos		
	C	F	F-EC
Glucosa (mg/dl)	88 ± 6	85 ± 11	86 ± 6
Triglicéridos (mg/dl)	46 ± 3	97 ± 7 *	75 ± 7
Colesterol total (mg/dl)	46 ± 2	51 ± 3	42 ± 3 **
Colesterol-HDL (mg/dl)	20 ± 1	16 ± 2	26 ± 6 #
Colesterol-LDL (mg/dl)	26 ± 2	35 ± 3 *	18 ± 2 †

* $p < 0.05$ vs. C y F-EC; ** $p < 0.05$ vs. F; # $p < 0.05$ vs. C y F; † $p < 0.05$ vs. C. Los valores indican el promedio ± ESM (n=10).

3.3. Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial y marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco

Se estudió el efecto de la administración de EC sobre la PAS en animales tratados con sobrecarga de fructosa. La PAS fue similar en los tres grupos al inicio del estudio (Figura 33A). La PAS del grupo F medida al finalizar el período experimental fue significativamente mayor respecto a los grupos C y F-EC; siendo los valores para los distintos grupos: C=127 ± 8; F=151 ± 12*; F-EC=136 ± 9 mmHg (*p<0,05 vs. C y F-EC) (Figura 33B).

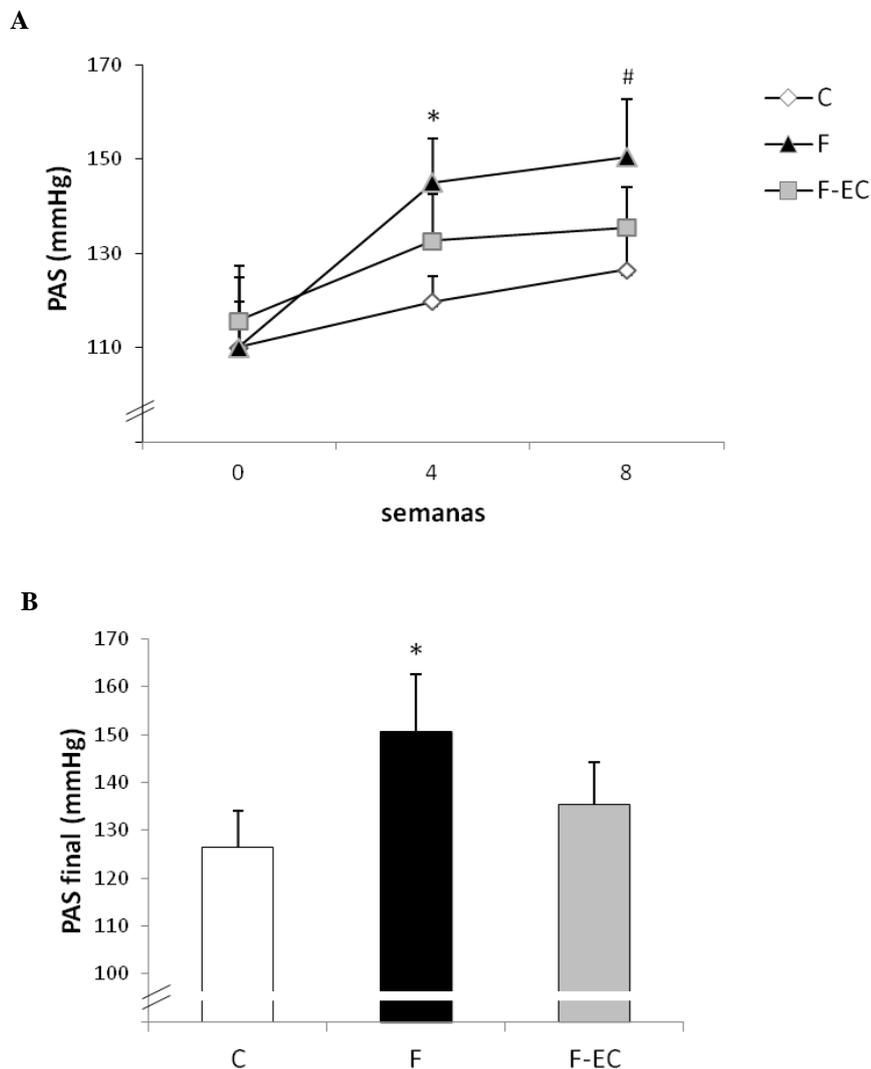


Figura 33. A) PAS en las semanas 0, 4 y 8 de tratamiento y B) PAS final (8 semanas), para los grupos C, F y F-EC. Los valores indican el promedio ± ESM (n=10). *p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. C y F-EC.

Como parámetros indicadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco se evaluaron: i) la histología del tejido, ii) el índice cardíaco determinado como el cociente entre el peso del corazón y el peso corporal, iii) los niveles de fosforilación de ERK1/2 y iv) la actividad de la metaloproteasa de matriz tipo 9 (MMP-9). Los resultados indican que ni el peso del corazón ni el índice cardíaco fueron significativamente diferentes entre los distintos grupos experimentales (Tabla 15). Además, los niveles de fosforilación de ERK1/2 en el sitio Thr¹⁸⁸ y la actividad de la MMP-9 no se encontraron afectados por los distintos tratamientos (Tabla 15; Figura 34). El análisis histológico del tejido cardíaco se realizó mediante 2 tinciones diferentes: hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson, que permiten visualizar la topología general del tejido y las fibras de colágeno tipo I, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la estructura del tejido ni en la cantidad de colágeno en los tres grupos experimentales, luego de 8 semanas de tratamiento (Figura 35).

Tabla 15. Peso del corazón, índice cardíaco y actividad de MMP-9, en los grupos C, F y F-EC luego de 8 semanas de tratamiento.

Parámetro	Grupos		
	C	F	F-EC
Peso del corazón (g)	1,1 ± 0,1	1,03 ± 0,04	1,13 ± 0,05
Índice cardíaco (10 ⁻³)	3,4 ± 0,1	3,30 ± 0,01	3,48 ± 0,05
Actividad de MMP-9 (U.A.)	2,5 ± 0,3	3,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2
p-ERK ^{thr188} /ERK (U.A.)	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Los valores indican el promedio ± ESM (n=10).

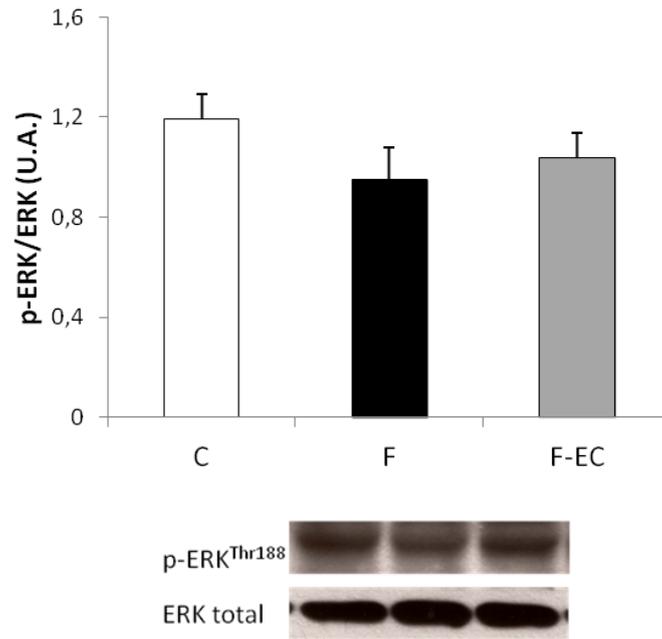
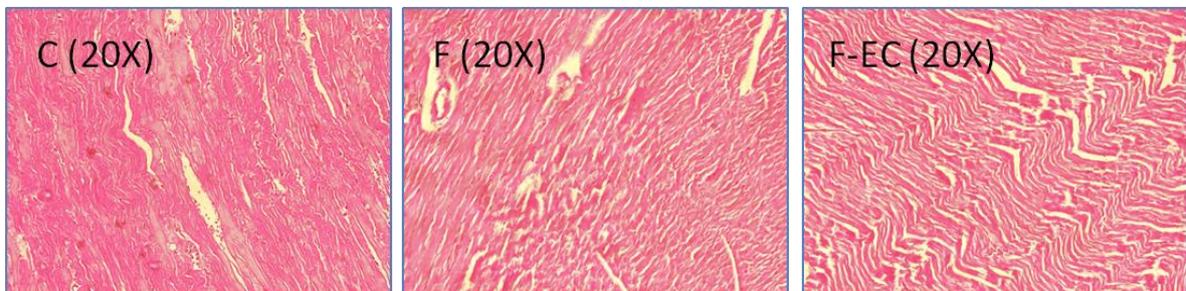


Figura 34. Efecto de (-)-epicatequina sobre los niveles de fosforilación de ERK en Thr¹⁸⁸ determinada mediante western blot para los grupos C, F y F-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=10).

A) Hematoxilina-Eosina



B) Tricrómico de Masson

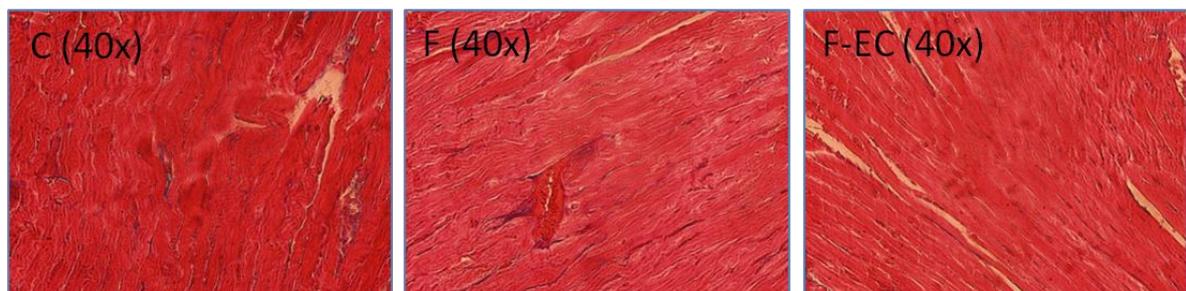


Figura 35. Microfotografía óptica del miocardio en los grupos C, F y F-EC. A) Tinción con hematoxilina-eosina (magnificación 20x) y B) tinción con tricrómico de Masson (magnificación 40x).

3.4. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo

Como marcadores de estrés oxidativo se determinaron los niveles de GSH, GSSG y el contenido de TBARS en corazón.

Se utilizó como índice del estado de óxido-reducción del tejido a la relación entre el contenido de GSSG y GSH ($GSSG/GSH^2$).

El grupo tratado con fructosa mostró un índice $GSSG/GSH^2$ significativamente mayor ($*p < 0,05$ F vs. C y F-EC) y la administración de EC en la dieta previno dicho incremento ($\#p < 0,05$ F-EC vs. C y F) (Figura 36).

En cuanto al contenido de TBARS en tejido cardíaco, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos C y F. Sin embargo, el grupo F-EC mostró una disminución de aproximadamente un 40% (Figura 37) en los niveles de TBARS.

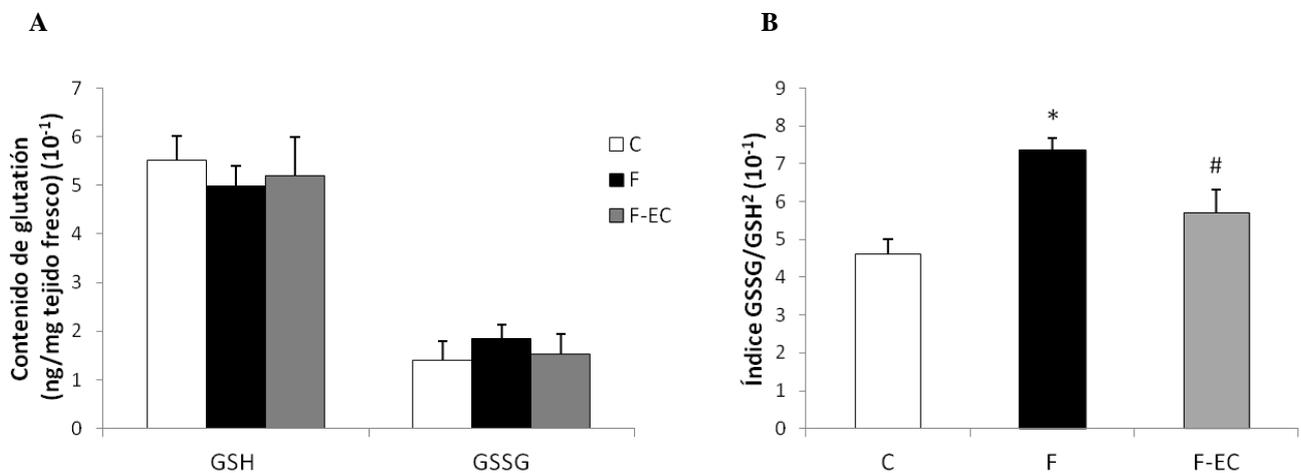


Figura 36. Efecto de (-)-epicatequina sobre A) el contenido de GSH y GSSG y B) el índice $GSSG/GSH^2$, para los grupos C, F y F-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=10). $*p < 0,05$ vs. C y F-EC; $\#p < 0,05$ vs. C y F.

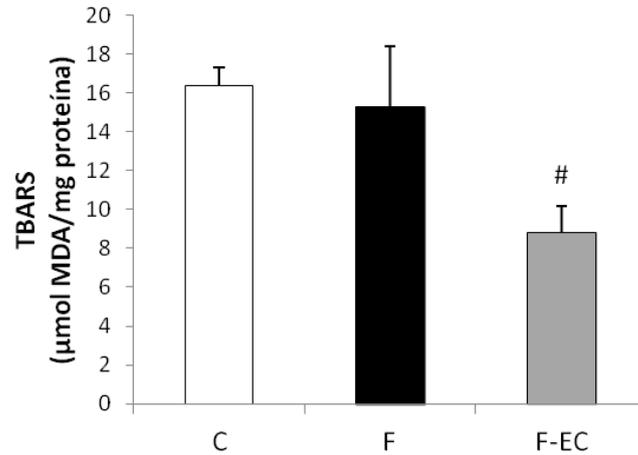


Figura 37. Efecto de (-)-epicatequina sobre el contenido de TBARS para los grupos C, F y F-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=10). #p<0,05 vs. C y F.

3.5. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de NOS, los niveles de fosforilación de eNOS y la expresión de eNOS, nNOS e iNOS

Para examinar el efecto de los tratamientos con fructosa y/o EC sobre la producción de NO en corazón se midieron: i) la actividad de NOS en ventrículo izquierdo, ii) los niveles relativos de fosforilación de eNOS y iii) la expresión de eNOS, nNOS e iNOS, en homogeneizados de corazón.

Los resultados muestran que en el grupo F la actividad de NOS es significativamente mayor que en el grupo C (37%, p<0,01). Más aún, el grupo F-EC fue el que presentó la mayor actividad de esta enzima (59% respecto a C, p<0,001; 16% respecto a F, p<0,05) (Figura 38A). Estos resultados no se correlacionaron con un incremento en la expresión de eNOS pero sí con un aumento del 19% en los niveles de fosforilación de eNOS en el sitio Ser¹¹⁷⁷ en los grupos F y F-EC comparados con el grupo C (p<0,05) (Figura 38B y 38C). Con respecto a la expresión de nNOS, la misma mostró un aumento del 65% en el grupo F con respecto a C (p<0,05) (Figura 38D) y en cuanto a iNOS, los grupos F y F-EC mostraron valores significativamente mayores en su expresión comparados con el grupo C (60%, p<0,05) (Figura 38E).

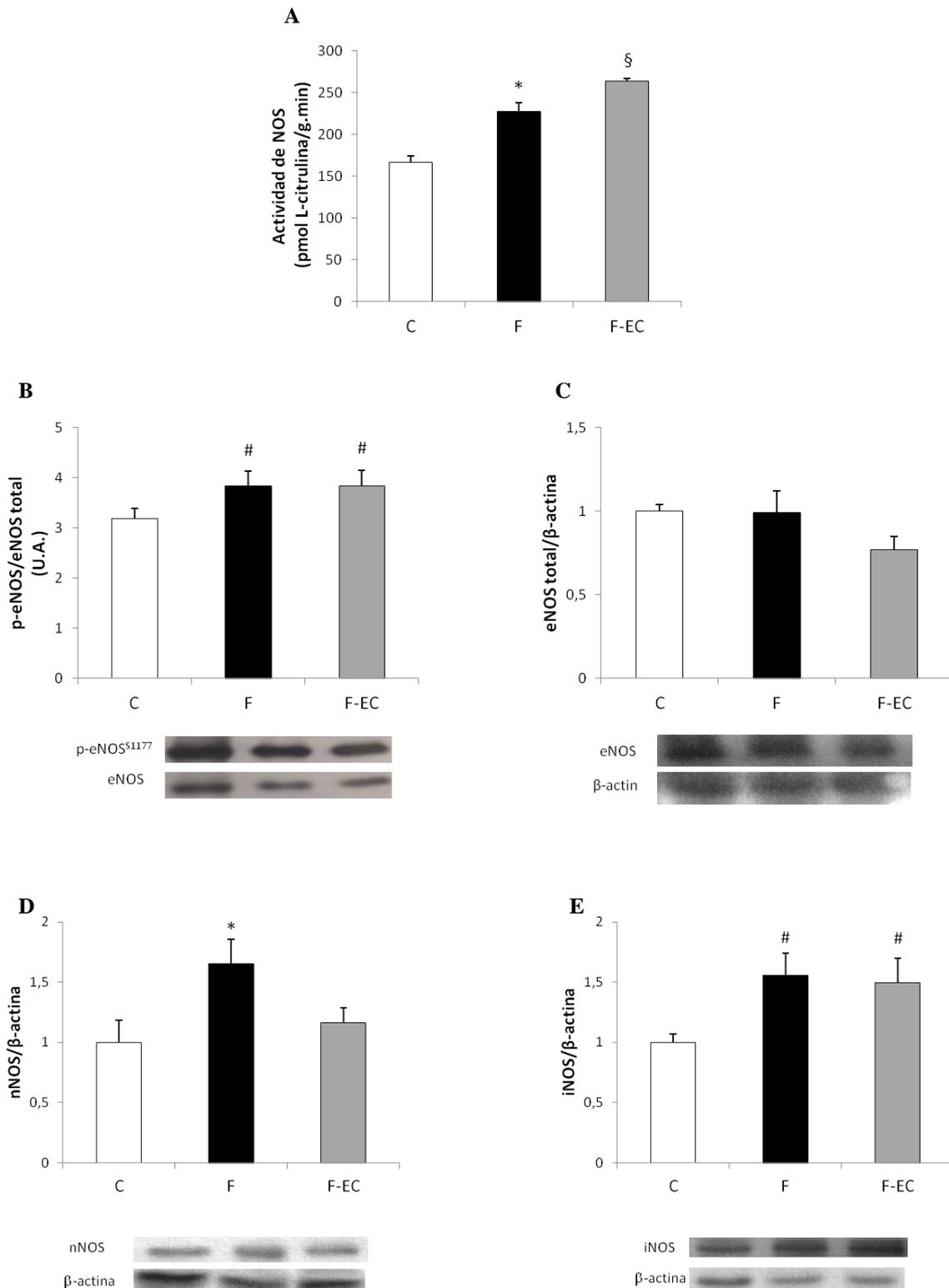


Figura 38. Efecto de (-)-epicatequina sobre NOS. A) Actividad de NOS, B) niveles de fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷, C) expresión de eNOS, expresión de D) nNOS y E) de iNOS, en los grupos C, F y F-EC. * $p < 0,05$ vs. C y F-EC; [§] $p < 0,001$ vs. C; [#] $p < 0,05$ vs. C. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=8).

3.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de p47^{phox} y NOX4

Para estudiar la capacidad del tejido cardíaco de generar anión superóxido en este modelo se determinaron: i) la producción de anión superóxido y ii) la expresión de las subunidades p47^{phox} (subunidad citosólica y regulatoria de NOX2) y NOX4.

La producción de anión superóxido fue mayor en el grupo F respecto a C y F-EC (26% y 43%, respectivamente, $p < 0,05$). Además, el grupo F-EC mostró valores aún menores que en C ($p < 0,05$) (Figura 39A). Estos resultados se pueden asociar con una mayor expresión de p47^{phox} en F comparado con C y F-EC (29% y 34%, respectivamente, $p < 0,05$) (Figura 39B). La expresión de NOX4 evaluada en F también resultó elevada con respecto a los valores encontrados en C y F-EC ($p < 0,05$) (Figura 39C).

3.7. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa

Para investigar posibles cambios en las enzimas involucradas en el metabolismo del anión superóxido y del H₂O₂ en tejido cardíaco, se evaluó la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa. Los resultados muestran que la actividad de SOD y GPx fueron significativamente menores en F respecto a C y F-EC (SOD: 41% y 34%, respectivamente; GPx: 48 y 46%, respectivamente) (Figuras 40A y 40B). No se encontraron diferencias significativas para la actividad de catalasa entre los grupos estudiados (Figura 40C).

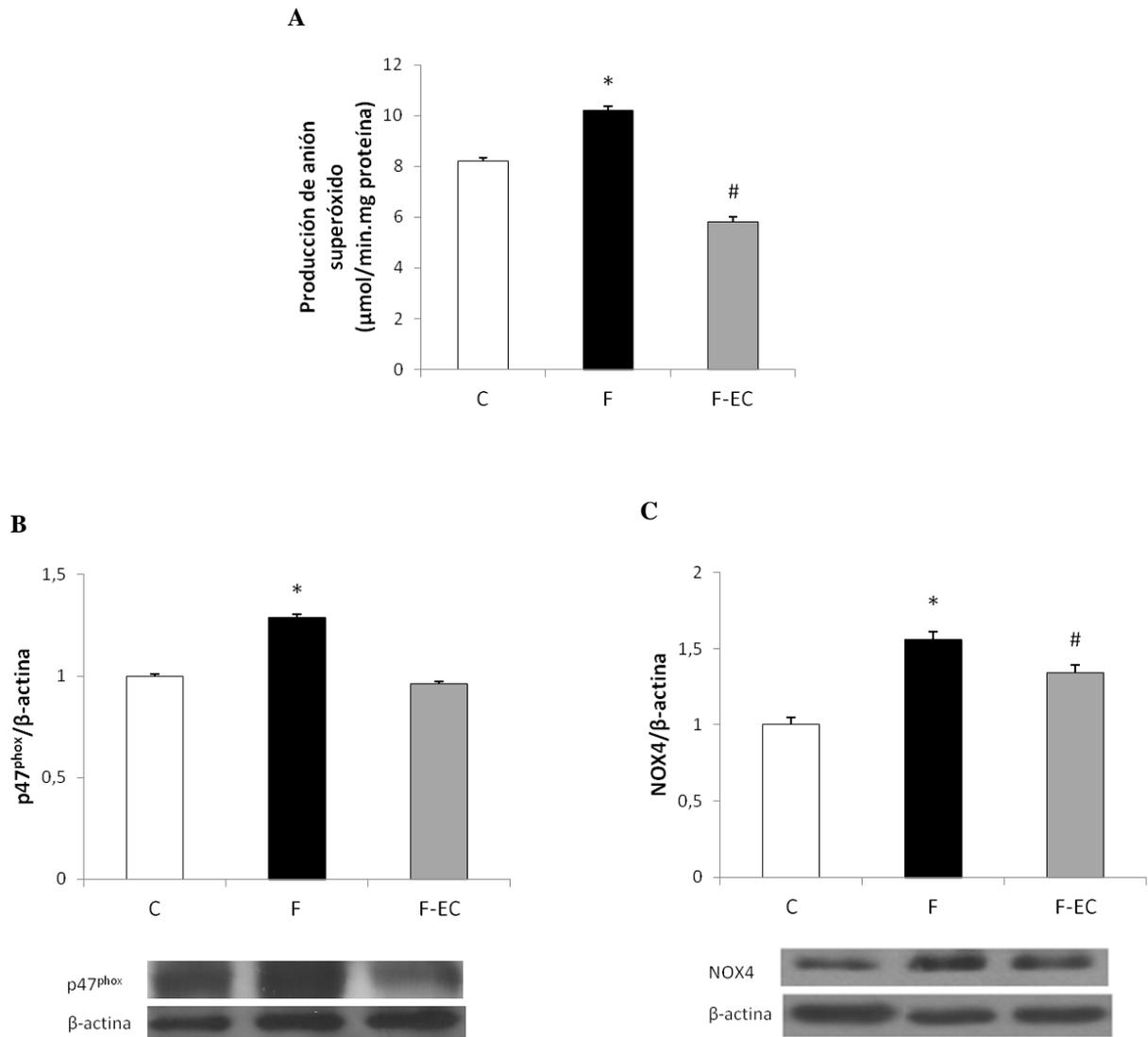


Figura 39. Efecto de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido y la expresión de las subunidades p47^{phox} y NOX4. A) producción de anión superóxido medido por quimioluminiscencia de lucigenina; expresión de B) p47^{phox} y C) NOX4 mediante western blot, para los grupos C, F y F-EC. *p<0,05 vs. C y F-EC; #p<0,05 vs. C. Los valores indican el promedio ± ESM (n=10).

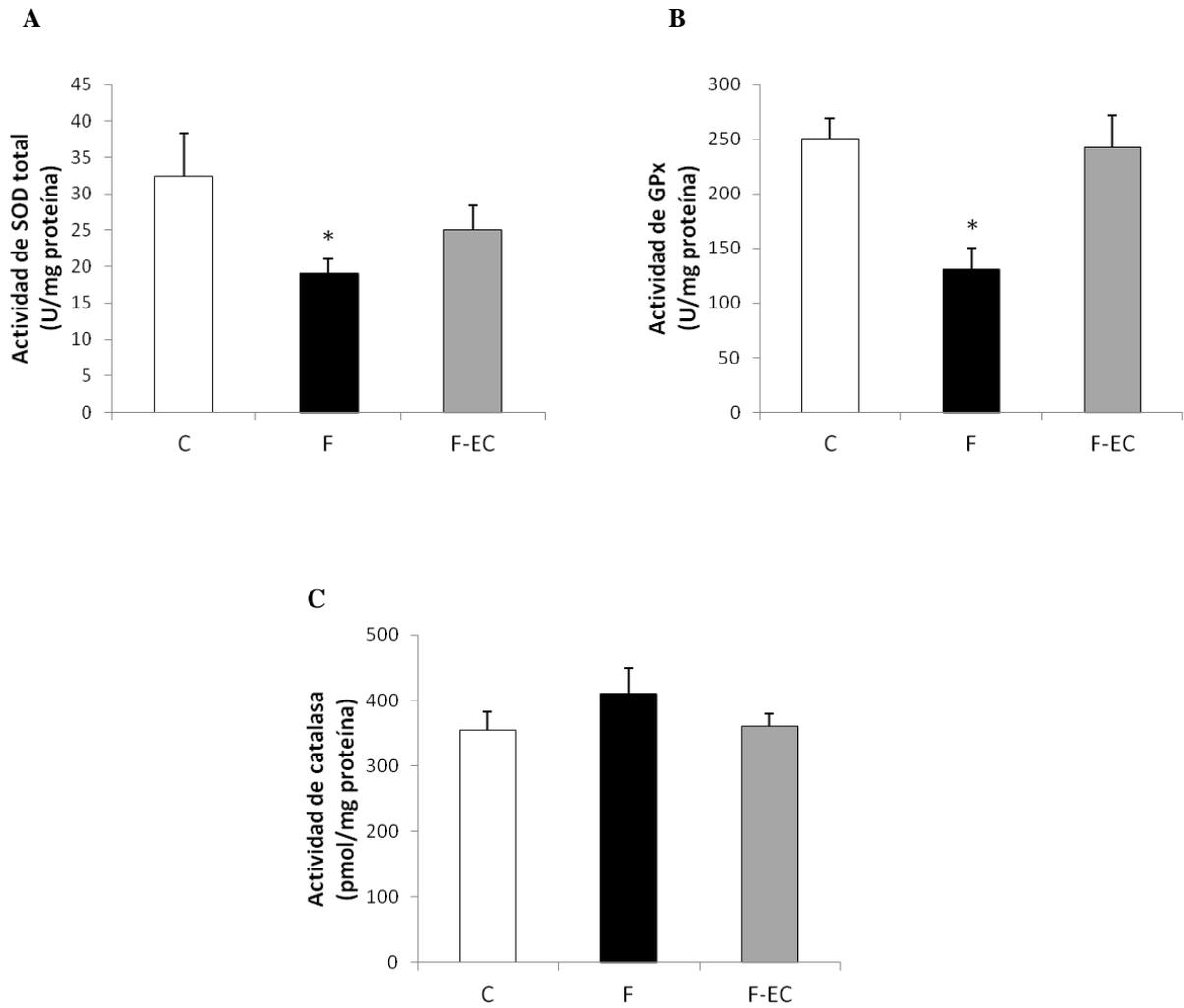


Figura 40. Efecto de EC sobre las enzimas A) SOD total, B) GPx y C) catalasa para los grupos C, F y F-EC. * $p < 0,05$ vs. C y F-EC. Los valores indican el promedio \pm ESM (n=10).

Discusión



DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis fue estudiar los efectos de los flavonoides EC y QC, incorporados a través de la dieta, sobre el metabolismo del NO y del anión superóxido y los posibles mecanismos de acción involucrados, en tejido cardíaco. Para relacionar dichos mecanismos *in vivo* con la prevención de alteraciones en el metabolismo del NO y anión superóxido, se seleccionaron dos modelos animales en donde se desarrolla un aumento de la PA y en los cuales se encuentra comprometida la biodisponibilidad de NO:

- i. Un modelo de inhibición de la producción de NO por tratamiento con L-NAME, un inhibidor de la NOS, cuya administración oral produce un aumento en la PA.
- ii. Un modelo crónico de sobrecarga de fructosa que produce alteraciones funcionales y metabólicas similares a los que presentan pacientes con síndrome metabólico. Dicho modelo se caracteriza por un aumento de la PA, dislipidemia y resistencia a la insulina.

Los resultados correspondientes a los *Estudios 1* y *2* se discutieron conjuntamente dado que se utilizó el mismo modelo experimental (L-NAME). Los resultados obtenidos en el *Estudio 3* (sobrecarga de fructosa) se discuten de manera separada. Finalmente, se realizó una discusión integrando los resultados de los tres estudios.

1. (-)-Epicatequina y quercetina: mecanismos de acción y análisis termodinámico

1.1. Mecanismos de acción directa e indirecta

Los polifenoles presentes en frutas y hortalizas comúnmente halladas en la dieta humana, son considerados responsables, al menos en parte, de los efectos beneficiosos sobre la salud. Esto se debe a que participan en una amplia variedad de

acciones biológicas potencialmente beneficiosas para la salud cardiovascular. Estas acciones biológicas involucran mecanismos tanto inespecíficos como específicos.

Los mecanismos de acción propuestos inicialmente para los polifenoles se basan en su capacidad de atrapar radicales libres o de secuestrar metales que poseen la capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción, lo que define una acción antioxidante directa (Rice-Evans 2001; Chang y col. 2007). Estos mecanismos requieren, para ser efectivos, una alta concentración de dichos compuestos en los tejidos. Sin embargo, dada la baja concentración de polifenoles alcanzada en los tejidos, así como la capacidad que tienen estos compuestos de interactuar con proteínas y otras moléculas (Galleano y col. 2010b), es posible proponer mecanismos alternativos de acción indirecta de mayor especificidad, que involucren o no una acción antioxidante. Dichos mecanismos serían compatibles con las concentraciones alcanzadas en los tejidos y podrían explicar los efectos observados *in vivo* (Fraga 2007).

La interacción de un determinado flavonoide con una proteína particular es un ejemplo de la acción específica de los flavonoides que resultará en un efecto biológico. Dicho efecto dependerá de la función que cumpla la proteína involucrada. Estos mecanismos incluirían la modificación de actividades enzimáticas, unión ligando-receptor y la activación de factores de transcripción, entre otros (Middleton y col. 2000; Mervaala y col. 2001; Mackenzie y col. 2004; Verstraeten y col. 2005; Erlejman y col. 2006; Sirk y col. 2009; Fraga y col. 2010).

1.2. Aspectos termodinámicos y cinéticos de (-)-epicatequina y quercetina como antioxidantes

Tanto EC como QC poseen un grupo catecol (hidroxilos en la posición 3' y 4' del anillo B), el cual es el mayor determinante de su capacidad de atrapar radicales libres (Figura 4) (Bors 1990).

Para analizar comparativamente desde un punto de vista teórico la factibilidad de las reacciones de atrapamiento de radicales libres por parte de EC o QC como mecanismos de acción *in vivo*, se utilizarán datos termodinámicos y cinéticos obtenidos de la literatura.

La termodinámica se puede utilizar como herramienta para estudiar si los reactivos poseen una tendencia espontánea a transformarse en productos. Esta tendencia está asociada a la disminución de la energía libre de Gibbs (G) del sistema. El criterio termodinámico para un cambio espontáneo a temperatura y presión constantes es $\Delta G < 0$. Para estudiar la espontaneidad de las reacciones de transferencia de electrones se puede calcular la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG°) en condiciones estándar (concentración 1 M y presión = 1 atm) según:

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ \quad (26)$$

siendo n el número de electrones transferidos desde el agente reductor (antioxidante) hacia el agente oxidante por mol, F la constante de Faraday y ΔE° la diferencia entre el potencial de reducción estándar de los pares de óxido-reducción involucrados. En la tabla 17 se muestran los potenciales de reducción para la reacción de EC y QC con OH^\bullet , RO^\bullet y ROO^\bullet . Bajo condiciones biológicas (concentración 1M, pH 7, 37°C), los valores negativos de ΔG° indican que estas reacciones son termodinámicamente favorables. La termodinámica sólo brindará información sobre si una determinada reacción tiene la tendencia a formar productos. Para establecer si esa reacción ocurre en una escala de tiempo biológicamente relevante es necesario hacer un análisis cinético.

Tabla 17. Potenciales de reducción estándar biológicos para compuestos antioxidantes y flavonoides y $\Delta G^{\circ'}$ para las reacciones entre esos compuestos y especies reactivas del oxígeno.

Compuesto (par redox)	$E^{\circ'}$ (mV)	$\Delta G^{\circ'}$ (kJ)		
		HO•/H ₂ O $E^{\circ'}=2310$ mV	RO•/ROH $E^{\circ'}=1600$ mV	ROO•/ROOH $E^{\circ'}=1000$ mV
α -tocoferol (α -TO•/ α -TOH)	500 ¹	-175	-106	-48
Ácido ascórbico (A•/AH)	282 ²	-196	-127	-69
(-)-Epicatequina (EC•/EC)	570 ³	-168	-99	-41
Quercetina (QC•/QH)	330 ⁴	-191	-123	-65

¹(Simic 1990); ²(Williams 1982); ³(Frei y col. 2003); ⁴(Jovanovic y col. 2000).

La tabla 18 muestra las constantes de velocidad de reacción relativas de distintos radicales libres para antioxidantes típicos (como el ácido ascórbico y el α -tocoferol) y para los flavonoides EC y QC. Dichos valores se calcularon tomando datos bibliográficos de concentraciones y constantes de velocidad (k). Estas últimas dependen de las características termodinámicas de las especies reaccionantes y son independientes de la concentración de las especies (Packer 1987; Erben-Russ y col. 1987; Bors 1990; Scott y col. 1993; Buettner 1996; Niki 1996; Rein y col. 2000; Pedrielli y col. 2001; Frei y col. 2003; Huisman y col. 2004; Fraga y col. 2005; Litterio 2015b).

Al observar los valores de las constantes de velocidad relativas mostrados en la tabla 18, se desprende la limitación apreciable que éstos proveen a la hipótesis de la acción antioxidante directa de los flavonoides, ya que las velocidades de atrapamiento de los radicales •OH, RO•, ROO• o anión superóxido por parte de EC o QC, son mucho menores que la velocidad de atrapamiento de dichos radicales por el

ácido ascórbico y el α -tocoferol. Esto indicaría que una actividad antioxidante directa por EC o QC es de escasa relevancia fisiológica.

Tabla 18. Constantes de velocidad de reacción relativa para las reacciones entre diferentes especies reactivas del oxígeno y EC o QC

Compuesto	Concentración (M)	Constante de velocidad de reacción relativa (s^{-1})			
		$v/[HO\bullet]^a$	$v/[RO\bullet]^b$	$v/[ROO\bullet]^{c,h}$	$v/[O_2\bullet]^g$
Ácido ascórbico	$50 \times 10^{-6}^d$	500000	80000	50	13,5
α -tocoferol	$28 \times 10^{-6}^e$	280000	2800	28	0,0144 ⁱ
(-)-Epicatequina	$0,3 \times 10^{-6}^f$	2000	40	2	0,48 ^j
	$1 \times 10^{-5}^j$	—	42 ^j	—	0,0066 ^g
	$2 \times 10^{-6}^f$	13000	270	15	—
Quercetina	$2,6 \times 10^{-8}^g$	112 ⁱ	—	0,011 ^h - 0,468 ⁱ	0,0234 ⁱ ; 0,0072 ^g

^{a,b,c}(Bors 1990; Buettner 1996; Niki 1996; Scott y col. 1993); ^d(Frei y col. 2003); ^e(Fraga y col. 2005); ^f(Rein y col. 2000); ^g(Huisman y col. 2004); ^h(Pedrielli y col. 2001); ⁱ(Erben-Russ y col. 1987); ^j(Litterio 2015).

Sumado a lo anterior, la baja concentración de flavonoides alcanzada en plasma, incluso luego de su ingesta, (Rein y col. 2000; Holt y col. 2002; Schroeter y col. 2006) lleva a una situación termodinamicamente desfavorable comparado con otros compuestos con capacidades similares de atrapar radicales libres. Aún, considerando la máxima concentración de flavonoides encontrada en plasma (~2 μ M, ver sección 1.2.2.), la constante de velocidad fisiológica de reacción con las especies reactivas del oxígeno más comunes, no sostiene la hipótesis del efecto *in vivo* de atrapamiento de radicales libres. Asumiendo que no hubiese una acumulación de flavonoides, se puede hacer una interpretación similar para otros tejidos ya que la presencia de flavonoides en ellos estará condicionada a su concentración en plasma.

Es así que las limitaciones arriba mencionadas sugieren la existencia de mecanismos alternativos compatibles con la concentración de flavonoides alcanzada en los tejidos que podrían explicar los efectos observados en células y tejidos, en términos de prevenir la oxidación de componentes celulares. Teniendo en cuenta estas consideraciones, un efecto directo de los flavonoides solo podría ocurrir en tejidos expuestos a altas concentraciones de estos compuestos (por ejemplo, el aparato gastrointestinal) pero sería poco probable en otros tejidos en donde los flavonoides están presentes en concentraciones del orden nanomolar.

2. Modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME

En los *Estudios 1* y *2* se evaluaron los efectos de la administración dietaria de EC y QC sobre el metabolismo de NO y anión superóxido, éstos últimos como determinantes de la biodisponibilidad de NO, en corazón. Para ello se utilizó un modelo de HT producida por inhibición de la producción de NO por tratamiento con L-NAME. Este compuesto se administra en su forma inactiva que al hidrolizarse intracelularmente genera N ω -nitro-L-arginina (L-NNA), que actúa como inhibidor de la NOS al competir reversiblemente con su sustrato: L-arginina (Mulsch y col. 1990; Rees y col. 1990; Moore y col. 1991; Klatt y col. 1994; Mayer y col. 2003). Este modelo es de uso generalizado para el estudio de la HT (Baylis y col. 1992; Dornas y col. 2011) y la dosis de L-NAME administrada en los estudios presentados en esta tesis (~40 mg L-NAME/kg peso corporal/d) se encuentra dentro del rango de las cantidades ensayadas en otros trabajos de investigación (Arnal y col. 1992; Kashiwagi y col. 2000; Bernatova y col. 2002; Paulis y col. 2010). La duración del tratamiento con L-NAME fue de 4 días. Este período fue seleccionado para asociar el aumento observado de la PA con la disminución temprana de la biodisponibilidad de NO y así estudiar la posible modulación de los niveles de NO por parte de EC y QC y los mecanismos involucrados. Además, este tratamiento de corta duración no presenta los efectos a largo plazo que pudieran producirse por un déficit sostenido

de NO, como por ejemplo la inflamación crónica, que pueden empeorar la función cardiovascular (De Caterina y col. 1995; Zeiher y col. 1995; Wang y col. 1996).

2.1. Cantidad administrada de (-)-epicatequina y quercetina

Varios trabajos han estudiado la biodisponibilidad de flavonoides luego de su administración a través de la dieta. Los datos obtenidos, tanto en humanos como en roedores, indican que la biodisponibilidad en sangre es relativamente baja ($\sim 2 \mu\text{M}$) (Baba y col. 2000; Rein y col. 2000; Holt y col. 2002), lo cual implicaría una concentración aún menor de flavonoides en los tejidos. Asumiendo que no se produce acumulación de flavonoides en los tejidos, se podría especular que estarán presentes en baja concentración y que participarían en procesos biológicos específicos.

Antes de alcanzar el sistema circulatorio, los flavonoides administrados por vía oral estarán sujetos a distintas condiciones fisiológicas del sistema digestivo que definirán su biodisponibilidad. La mayoría de los flavonoides presentes en las plantas se encuentran en su forma glicosilada y requieren de su deglicosilación para ser absorbidos por el intestino delgado (Scalbert y col. 2000). Este es el caso de la QC. La EC, a diferencia de la QC, se encuentra presente en su forma no glicosilada y puede ser absorbida directamente por los enterocitos. Una vez absorbidos, los flavonoides son metabolizados en diferentes órganos dando lugar a la formación de metabolitos glucuronidados, sulfatados u O-metilados (Fraga 2009; Actis-Goretta y col. 2012; Ottaviani y col. 2012; Cifuentes-Gomez y col. 2015).

Luego de la absorción de flavonoides en el intestino, el incremento en su concentración en sangre es de naturaleza transitoria, alcanzando generalmente un máximo entre las 2 a 4 h luego de su ingesta, para luego disminuir a niveles no detectables al cabo de 6 h (Rein y col. 2000; Holt y col. 2002; Schroeter y col. 2006). En cuanto a las concentraciones máximas alcanzadas, éstas dependen de la cantidad

ingerida, encontrándose en el rango 0,01 a 1,9 μM para una ingesta promedio correspondiente a una dieta en una población no vegetariana (Rein y col. 2000; Wang y col. 2000; Holt y col. 2002; Schroeter y col. 2006; Actis-Goretta y col. 2012; Ottaviani y col. 2012).

La cantidad de EC y de QC administrada en el modelo de L-NAME fue de 4 g/kg de dieta. Esta cantidad puede considerarse elevada si se la compara con el consumo promedio de una población no vegetariana; sin embargo la administración de dicha cantidad de EC se justifica por:

- i. El período experimental de 4 días implica un tratamiento agudo de corta duración, en donde resulta necesaria la administración de cantidades elevadas de EC y QC para poder obtener cambios significativos en los parámetros a determinar y poder asociar los efectos observados con aspectos mecanísticos.
- ii. La cantidad de EC ensayada produjo efectivamente una disminución de la PA en estudios preliminares de caracterización del modelo (Litterio y col. 2012).
- iii. La cantidad de EC y QC utilizada no mostró acciones tóxicas (Takami y col. 2008; Tamura y col. 2010; Ottaviani y col. 2015).

En relación al punto iii., estudios en humanos que evaluaron la seguridad y tolerancia así como posibles eventos adversos relacionados con un alto consumo de flavanoles, no encontraron efectos nocivos en dosis similares a las administradas en este trabajo (220 mg de EC/d, administrada en un extracto de cacao) durante 12 semanas de tratamiento (Ottaviani y col. 2015). Además, estudios sobre la toxicidad de otros flavonoides en roedores mostraron que la isoquercetina y catequinas de té verde, produjeron daño hepático sólo a partir de una administración de 10 g/kg de dieta (Takami y col. 2008; Tamura y col. 2010). Esto indica que las cantidades de EC y

QC administradas en el modelo de L-NAME (4 g/kg de dieta) no producirían efectos tóxicos en el tiempo en que se suministraron en los protocolos experimentales de los *Estudios 1 y 2*.

Para descartar una posible interacción entre la EC y el L-NAME, dado que su administración fue simultánea por vía oral, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de EC y L-NNA (metabolito de L-NAME). Como se muestra en la tabla 10, los resultados indican que no existió interacción entre ambos compuestos sugiriendo que la disminución de la PA no sería a causa de una menor biodisponibilidad de L-NAME por interacción con EC. De la misma manera, los efectos de EC no se verían afectados por la coadministración de L-NAME.

A diferencia del *Estudio 1* en donde se administró EC, en el *Estudio 2* se incorporó un grupo adicional que recibió QC en ausencia de L-NAME (grupo QC). Ello se debe a que, a diferencia de la QC, la EC es un flavonoide con el que se ha trabajado por muchos años en nuestro grupo de investigación y que no ha mostrado diferencias significativas en los diferentes estudios realizados entre animales controles y aquellos que recibieron solo EC (Litterio y col. 2012; Galleano y col. 2010). En el *Estudio 2* se agregó el grupo quercetina (QC) porque es la primera ocasión en que se trabajó con dicho flavonoide, lo que hacía necesaria la evaluación de posibles efectos de la QC sobre los parámetros determinados.

2.2. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la presión arterial

Estudios realizados en humanos demostraron una relación inversa entre el consumo de flavanoles y la HT (Yang y col. 2012). Además, se observó que el chocolate o productos derivados del cacao (que poseen una gran proporción de EC), disminuyeron la PA tanto en individuos normotensos como hipertensos, con distintas cantidades ingeridas de polifenoles y duración de los tratamientos (80-700 mg/d de polifenoles, 2 h a 18 semanas) (Taubert y col. 2003; Grassi y col. 2005a; Grassi y col. 2005b; Taubert y col. 2007).

A fin de estudiar el efecto de la administración dietaria de los flavonoides EC y QC sobre la PA en este modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME, se evaluó la modificación de la PAS durante los 4 días de tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que tanto EC como QC previenen el aumento de la PA inducida por el tratamiento de ratas con L-NAME, ya que en ambos casos la presencia del flavonoide en la dieta evitó el incremento significativo de la PA en el día 4 causado por la administración de L-NAME. Además, estos resultados coinciden con estudios previos de caracterización de este modelo realizados en nuestro laboratorio, donde se observó una asociación directamente proporcional entre la cantidad de EC administrada en la dieta y la magnitud del efecto antihipertensivo (Galleano y col. 2013). En este sentido, se comprobó que la presencia de EC es necesaria para prevenir la HT en ratas tratadas con L-NAME, ya que la remoción de EC de la dieta de ratas tratadas simultáneamente con L-NAME y EC, ocasionó una reversión del efecto del flavonoide produciendo un incremento de la PA en dichos animales (Litterio y col. 2012).

En relación a la QC, su efecto sobre la PA parece tener mayor relevancia en un contexto patológico, ya que la disminución de la PA se observó en los animales deficientes en NO (tratados con L-NAME) pero no hubo cambios en dicho parámetro para los animales que recibieron sólo QC.

Trabajos de otros autores en distintos modelos animales de HT se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos con respecto al efecto antihipertensivo de EC y QC en nuestro modelo. En un estudio realizado en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) se observó que la EC administrada en una cantidad de ~40 mg/kg/d, durante 2 a 6 días, produjo la disminución de la PA a partir del día 2 de tratamiento (Galleano y col. 2013). Gómez-Guzmán y colaboradores (2012) observaron que una dosis de 10 mg/kg/d de EC durante 4 semanas, previno el incremento de la PA en ratas DOCA-sal, otro modelo animal de HT inducida por tratamiento con 11-desoxicorticosterona acetato y dieta alta en sal. Sin embargo, los mismos autores no observaron cambios utilizando la misma cantidad y duración de

tratamiento con EC en ratas tratadas con L-NAME (75 mg/kg/d) (Gomez-Guzman y col. 2011).

Otros estudios realizados en ratas mostraron que la administración crónica de QC (de 4 a 6 semanas) en una dosis de 10 mg/kg/d en ratas hipertensas por tratamiento con L-NAME (75 mg/100 ml agua de bebida) (Duarte y col. 2002), ratas Dhal-sensibles (desarrollan HT con un dieta alta en sal) (Aoi y col. 2004; Mackraj y col. 2008) o ratas SHR (desarrollan espontáneamente HT) (Duarte y col. 2001*b*) previno el aumento de la PA observado en estos modelos animales. En otro trabajo donde se ensayaron cantidades de 0,2% a 0,5% de QC en la dieta (aproximadamente 30 y 75 mg/kg/d, respectivamente) durante 4 semanas, se observó un efecto antihipertensivo y dosis dependiente en ratas tratadas con una dieta alta en grasa y sacarosa (Yamamoto y col. 2006).

La asociación entre la ingesta de EC o QC y los cambios en la PA también fue estudiada en humanos. Se han realizado estudios de intervención en donde se suplementó con dichos flavonoides para evaluar su efecto sobre distintos parámetros fisiológicos y metabólicos. En relación a la PA, los resultados de los mismos sugieren que el efecto de EC y QC dependería del estado de salud del sujeto en estudio, ya que se observó una disminución de la PA en pacientes con sobrepeso e hipertensos, pero no se observaron cambios en la PA en pacientes sanos (Edwards y col. 2007; Egert y col. 2009; Dower y col. 2015*a*; Dower y col. 2015*b*). Estudios en sujetos que recibieron cápsulas conteniendo flavanoles del cacao (ricas en EC) mostraron que la administración de 1 g/d (aproximadamente 15 mg/kg/d para un sujeto que pesa 70 kg) produjo una disminución de la PA en adultos mayores (68-70 años) que se encontraban en condiciones saludables acorde a la edad, pero no produjo modificaciones en el mismo parámetro en los adultos (35-55 años) sanos (Mastroiacovo y col. 2015; Ottaviani y col. 2015). Por otro lado, en dos metanálisis en donde se estudió el impacto de la dosis de EC ingerida a través del consumo de productos derivados del cacao, sobre los cambios en la PA, se observó una

disminución de la PA que estaría influenciada por la cantidad ingerida de EC en sujetos con sobrepeso, obesos o hipertensos (Ellinger y col. 2012; Hooper y col. 2012).

En relación a la QC, un metanálisis realizado a partir de estudios de intervención mostró un efecto de la suplementación con QC sobre la reducción de la PA en sujetos normotensos tratados con QC que resultó mayor con dosis superiores a 10 mg/kg/d y con un periodo de tratamiento mayor a 8 semanas (Serban y col. 2016).

Pudimos comprobar que en el modelo de L-NAME tanto la EC como la QC tienen un efecto antihipertensivo y la magnitud de dicho efecto es mayor en el caso de la suplementación con QC (Δ PA entre los grupos LN y LN-EC o LN-QC: ~19 y ~34 mmHg para EC y QC, respectivamente) pero de eficacia similar en cuanto al restablecimiento a los valores control.

2.3. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre marcadores de estrés oxidativo

Existe extensa evidencia sobre la participación de las especies reactivas del oxígeno y el estrés oxidativo en el desarrollo de la HT y la ECV (Touyz 2003a; Touyz 2003b; Ward y col. 2006; Grossman 2008; Brown, D. I. y col. 2009; Montezano y col. 2015; Siti y col. 2015). La administración de L-NAME a largo plazo ha sido asociada con el desarrollo de estrés oxidativo en varios tejidos (Saravanakumar y col. 2011; Cardoso y col. 2013), incluyendo el corazón (Husain y col. 2002).

A fin de evaluar estrés oxidativo en el modelo de L-NAME y la participación de EC y QC en un contexto de alteración de marcadores de estrés oxidativo en animales a los que se les inhibió la producción de NO, se estudió el estado *redox* del corazón y el daño oxidativo a lípidos y proteínas mediante tres medidas diferentes: los niveles de oxidación del glutatión, el contenido de TBARS y los niveles de nitrotirosinas, en tejido cardíaco.

Los resultados obtenidos mostraron que la coadministración tanto de EC como de QC a las ratas tratadas con L-NAME, aumentó los niveles de GSH en tejido cardíaco, lo cual resultó en una disminución significativa del índice $GSSG/GSH^2$ respecto al grupo que recibió solo L-NAME. Estos resultados sugieren que tanto la EC como la QC modulan el estado *redox* del tejido cardíaco favoreciendo un estado más reducido del glutatión. Estudios realizados en nuestro laboratorio, utilizando este mismo modelo, mostraron que el índice $GSSG/GSH^2$ plasmático se encontró aumentado por el tratamiento con L-NAME y prevenido en presencia de EC, en las mismas condiciones experimentales (Litterio y col. 2012). Esto indica un efecto de EC y QC como moduladores del estado *redox* tanto a nivel sistémico como en tejido cardíaco.

Al evaluar un posible daño oxidativo a lípidos y/o proteínas a causa del tratamiento con L-NAME y el efecto de EC y QC suplementadas en la dieta sobre los mismos, se observó que el tratamiento con L-NAME, así como la administración simultánea de L-NAME y EC o QC, no afectaron la formación endógena de TBARS ni los niveles de nitrotirosinas, respectivamente, medidas en tejido cardíaco.

Una de las posibles razones por las cuales no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales para el contenido de TBARS, puede deberse a que la oxidación del glutatión es un evento temprano que ocurre asociado a estrés oxidativo. En ese punto, las defensas antioxidantes actuarían previniendo la acumulación de productos de oxidación lipídica, de tal forma que no serían detectadas como TBARS.

Entre los marcadores de estrés oxidativo, los niveles de nitrotirosinas proteicas se consideran indicadores de la formación de peroxinitrito. La nitración de proteínas puede causar cambios en la función cardíaca y celular y son dependientes de los niveles de NO y de las modificaciones en la producción de anión superóxido (Radi y col. 1991; Radi y col. 2002; Murphy y col. 2012).

Resultados previos de nuestro laboratorio en el mismo modelo mostraron un aumento de los niveles de nitrotirosinas en proteínas plasmáticas y valores similares al control luego del tratamiento con EC (Litterio y col. 2012). A pesar de ello, en tejido cardíaco no se detectaron modificaciones en la nitración de proteínas. La ausencia de aumento de nitrotirosinas en corazón de ratas tratadas con L-NAME, puede deberse a una prevención temprana del aumento en la formación de peroxinitrito en tejido cardíaco (por parte de las defensas antioxidantes) o bien puede sugerir que el efecto observado a nivel sistémico no se vería reflejado en el corazón en las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis.

Otros estudios realizados con EC reportaron una disminución de marcadores sistémicos de estrés oxidativo como TBARS e iso-prostaglandina F2 (iso-PGF₂) urinario por tratamiento con dicho flavanol en ratas DOCA-sal o deficientes en NO (Gomez-Guzman y col. 2011; Gomez-Guzman y col. 2012). Además, trabajos realizados con suplementación de QC reportaron una disminución en los niveles de TBARS en corazón y plasma de ratas DOCA-sal (Galisteo y col. 2004) y en hígado y plasma de ratas SHR o tratadas con L-NAME (Duarte y col. 2001a; Duarte y col. 2002), luego del tratamiento con dicho flavonoide. También se reportó que el tratamiento con QC favoreció el aumento de los niveles de GSH en miocardio de ratas sometidas a isquemia-reperfusión (Liu y col. 2014) y una prevención del aumento de TBARS en ratas alimentadas con sobrecarga de sal (Olaleye y col. 2014).

Estos resultados permiten concluir que la EC y la QC atenúan el estrés oxidativo previniendo el desplazamiento del estado *redox* del tejido cardíaco hacia un entorno más oxidante, evidenciado principalmente por un aumento en los niveles de GSH.

2.4. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la biodisponibilidad de NO en corazón

Se estudió el efecto de EC sobre la producción de NO y de anión superóxido como principales determinantes de la biodisponibilidad de NO, en el tejido cardíaco de ratas tratadas con L-NAME.

Más allá de sus efectos vasculares, el NO regula la función cardíaca controlando la contractibilidad de los cardiomiocitos, la trombogenicidad, angiogénesis, la respiración mitocondrial, entre otras funciones (Arnal y col. 1992; Massion y col. 2003; Seddon y col. 2007).

La biodisponibilidad de NO puede asociarse con el estrés oxidativo principalmente como resultado de su reacción con el anión superóxido, que da lugar a la formación de peroxinitrito, una especie oxidante capaz de producir daño oxidativo a macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN). Es así que la relación entre dichas especies determinará la concentración de NO en las células, como se explicó en la sección 9 de la introducción. Para evaluar los potenciales efectos de EC y QC como moduladores de los niveles de NO en este modelo, se estudiaron los principales determinantes de la biodisponibilidad de NO, los cuales se muestran en la Figura 41.

2.4.1. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la producción de NO

2.4.1.1. Efectos de (-)-epicatequina

En concordancia con el efecto inhibitorio del L-NAME, en los *Estudios 1 y 2* se observó una disminución significativa de la actividad de NOS en tejido cardíaco de los animales tratados con L-NAME. Estos resultados están de acuerdo con reportes de otros autores (Duarte y col. 2002; Husain y col. 2002; Paulis y col. 2010). La disminución de la actividad de NOS observada en el grupo que recibió L-NAME no

se encontró en el grupo que recibió simultáneamente L-NAME y EC. La administración de EC restableció la actividad de NOS a valores control, lo que indica que la EC contribuiría en el aumento de la biodisponibilidad de NO.

La evaluación de la contribución de las isoformas eNOS e iNOS, mediante la determinación de los niveles de fosforilación de eNOS y el nivel de expresión de iNOS, permitió definir el aporte de dichas isoformas sobre la actividad enzimática en el grupo de ratas que recibió L-NAME y EC simultáneamente. Se observó un aumento de los niveles de fosforilación de eNOS en el sitio Ser¹¹⁷⁷ en el grupo de animales que recibió EC, previniendo la disminución de los niveles de fosforilación

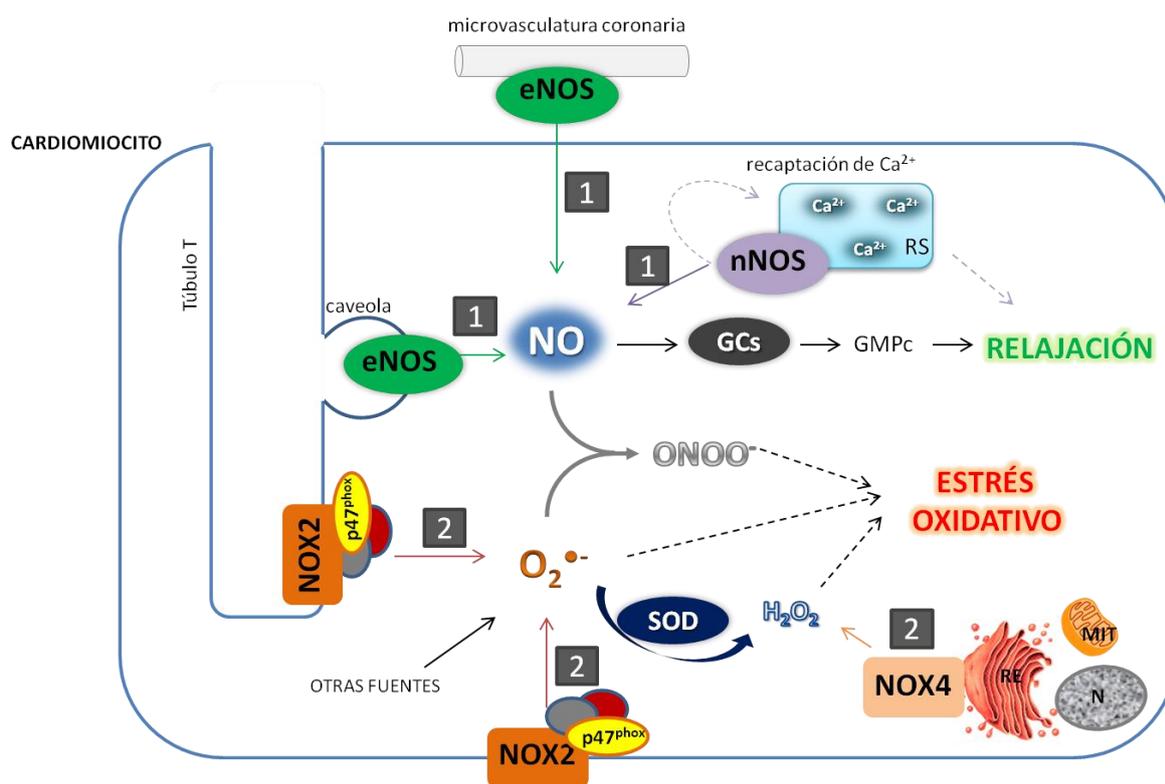


Figura 41. Principales determinantes de la biodisponibilidad de NO en cardiomiocitos. Los números indican: **1** actividad y/o expresión de NOS y/o fosforilación de eNOS; **2** actividad y/o expresión de distintas subunidades de NOX.

observados luego del tratamiento con L-NAME, restableciendo a los valores del grupo control. Dichos resultados coinciden con un trabajo realizado en cultivo de células HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical) en el cual se mostró que la EC indujo la producción de NO mediante la activación de eNOS (Ramirez-Sanchez y col. 2010). Estos resultados sugieren que la restitución de la actividad de NOS se debe, al menos en parte, a un efecto postraducciona sobre la eNOS mediado por EC.

Los resultados además indican que la isoforma iNOS no contribuiría al aumento de la actividad de NOS mediado por EC, ya que no se encontraron diferencias en los niveles de su expresión proteica en este modelo experimental. Además, dado que la iNOS está implicada en distintas enfermedades asociadas a procesos inflamatorios (Ferdinandy y col. 2000; Liu y col. 2005), los resultados obtenidos sugieren la ausencia de inflamación en nuestras condiciones experimentales.

2.4.1.2. Efectos de quercetina

En el *Estudio 2* realizado con QC, se observó un efecto per sé de este flavonoide, ya que los animales que recibieron QC en ausencia de L-NAME mostraron un aumento de la actividad de NOS. Por otro lado, al igual que en el *Estudio 1* en donde se administró EC, se detectó una menor actividad de NOS en tejido cardíaco en las ratas tratadas con L-NAME. Sin embargo, a diferencia de los efectos observados para EC, la QC no previno la disminución de la actividad de NOS, como tampoco se observaron modificaciones en los niveles de fosforilación de eNOS ni en la expresión proteica de eNOS y nNOS entre los grupos ensayados. En cambio, se hallaron diferencias en los niveles de expresión de iNOS en este estudio, los cuales se encontraron aumentados en los animales tratados con L-NAME, mientras que la administración de QC demostró una prevención de dicho aumento. A pesar de que el protocolo experimental con L-NAME fue el mismo, los resultados

en relación a la expresión de iNOS fueron diferentes al utilizar EC o QC. Los resultados sugieren un efecto antiinflamatorio de QC previniendo el aumento de la expresión de iNOS que no se observó luego de la suplementación con EC.

Trabajos previos en relación a la actividad y expresión de NOS realizados en presencia de QC, no son homogéneos. En concordancia con los resultados observados en esta tesis, Duarte y colaboradores (2002) encontraron, en aorta de ratas, que el tratamiento con 10 mg/kg/d de QC durante 6 semanas no revirtió la inhibición de la actividad de NOS inducida por L-NAME; tampoco encontraron diferencias en la expresión de eNOS e iNOS. Por otro lado, en tejido de aorta proveniente de ratas SHR, el tratamiento por 13 semanas con QC (10 mg/kg/día) restableció la actividad de NOS y disminuyó la expresión de eNOS, alcanzando valores similares al control; sin encontrar cambios en la actividad de NOS en los animales control (WKY) que recibieron QC (Sanchez y col. 2006). Cabe aclarar que los trabajos mencionados, difieren en la duración del tratamiento y las dosis administradas de L-NAME y QC con respecto a las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, siendo este hecho una posible causa de las diferencias encontradas en los distintos estudios.

El aumento en la expresión de iNOS hallado en esta tesis concuerda con lo reportado en un trabajo reciente utilizando el mismo modelo animal y donde la QC, luego de 3 semanas de tratamiento, previno el aumento en la expresión de iNOS que mostraron los animales tratados con L-NAME. No obstante, los mismos autores encontraron una disminución en la expresión de eNOS total en corazón y aorta (Bunbupha y col. 2015). La prevención del aumento de la expresión de iNOS por QC puede relacionarse con un efecto antiinflamatorio de dicho flavonoide, fenómeno que también se observó en distintos modelos animales y líneas celulares (Angeloni y col. 2012; Bharrhan y col. 2012; Liu y col. 2014; Li y col. 2015; Syed Hussain 2015). En un modelo de isquemia-reperfusión (IR) en conejos, la QC disminuyó los niveles de ARN mensajero y proteína de eNOS e iNOS en miocardio (Wan y col. 2009). También se observaron efectos similares con otros flavonoides, como ejemplo se

puede mencionar que la (-)-epigallocatequina galato (EGCG) atenuó las alteraciones en los marcadores de inflamación y disminuyó la expresión de iNOS en corazón de ratas (Gokulakrisnan y col. 2011).

Los resultados obtenidos para los animales tratados con L-NAME para la actividad de NOS y la expresión de sus distintas isoformas fueron diferentes según el compuesto estudiado. Existe evidencia de que distintos flavonoides poseen efectos biológicos diferentes y que ello dependería de su estructura química. Incluso flavonoides con estructuras químicas muy similares, como es el caso de los estereoisómeros EC y la (+)-catequina, mostraron distintos efectos sobre la producción de NO en cultivo de células endoteliales y sobre la intensidad de la relajación vascular (Ramirez-Sanchez y col. 2010; Ottaviani y col. 2011). Por lo tanto, es posible que los distintos efectos encontrados para EC y QC pudieran deberse a diferencias estructurales entre ellos y/o a la formación de metabolitos que podrían tener efectos biológicos diferentes.

2.4.2. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la producción de anión superóxido

Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en la modulación de las vías de señalización sensibles a cambios en el estado *redox* (Sirker y col. 2011) y pueden alterar las vías de señalización del NO en estadios tempranos de la ECV (Brandes y col. 2014a). Dado que las diferentes isoformas de NOX son consideradas una de las principales fuentes de producción de anión superóxido y H₂O₂ en el sistema cardiovascular, se ha postulado la participación de dichas enzimas en la fisiopatología de la ECV, como se explicó en la sección 5.2 de la introducción.

A fin de establecer el papel de las NOX en la regulación de la PA, se utilizaron atrapadores de especies reactivas del oxígeno o inhibidores específicos de distintas NOX (Lassegue y col. 2012). A su vez, para el estudio de la patogénesis de la HT se desarrollaron animales transgénicos *knock out* o que sobreexpresan distintas

isoformas o subunidades regulatorias de NOX (Wang y col. 2001; Landmesser y col. 2002; Murdoch y col. 2011). Dichos estudios demostraron que las isoformas de NOX ejercen funciones distintas y están distribuidas en diferentes tejidos (You y col. 2013; Dikalov y col. 2014; Drummond y col. 2014).

Distintos trabajos apoyan la hipótesis de que el aumento en la producción de anión superóxido podría ser responsable del desarrollo de estrés oxidativo observado en distintos modelos animales de HT, entre los cuales se puede mencionar a aquellos que utilizan ratas SHR (Akasaki y col. 2006; Lopez-Sepulveda y col. 2008), ratas sometidas a IR (Liu y col. 2014), ratas que recibieron dieta alta en sal (Olaleye y col. 2014), ratas DOCA-sal (Gomez-Guzman y col. 2012) y Dahl-sensibles (Nishiyama y col. 2004).

Es por ello que se evaluó la actividad y expresión de las principales isoformas de NOX presentes en tejido cardíaco (NOX2 y NOX4) y la participación de EC y QC como potenciales moduladores de la actividad y/o expresión de estas enzimas, en ratas deficientes en NO.

Los resultados encontrados en los *Estudios 1 y 2*, muestran que el tratamiento con L-NAME generó una mayor producción de anión superóxido en corazón y tanto el tratamiento con EC como con QC previnieron dicho aumento. Estos resultados, sumado al incremento del índice de oxidación de glutatión (relación GSSG/GSH²), nos permitió comprobar el desarrollo de estrés oxidativo a nivel cardíaco en las ratas deficientes en NO y la prevención de esta condición al suplementar la dieta con EC y QC. Así, las alteraciones observadas en el estado *redox* del tejido cardíaco luego del tratamiento con L-NAME en ambos estudios, parecen estar relacionadas con una mayor producción de anión superóxido como resultado de un aumento de la actividad de NOX, lo cual también se observó en otros trabajos que estudiaron aorta y corazón, entre otros tejidos (Usui y col. 1999; Paravicini y col. 2004; Gomez-Guzman y col. 2011; Gomez-Guzman y col. 2012).

Tanto la EC como la QC tienen la capacidad de atrapar al anión superóxido en forma directa y se ha demostrado que pueden regular la actividad de NOX *in vitro*

(Sanchez y col. 2006; Sarr y col. 2006; Jimenez y col. 2007; Sanchez y col. 2007; Lopez-Sepulveda y col. 2008; Galleano y col. 2010a). Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales, la concentración de EC y QC en tejido cardíaco no alcanzaría los niveles necesarios para actuar como atrapadores de radicales libres (ver sección 1.2 de la discusión) (Fraga y col. 2010). A pesar de ello, tanto la EC como la QC previnieron el aumento de la producción de anión superóxido observada en los animales tratados con L-NAME. La disminución de la producción de anión superóxido observada por tratamiento con EC o QC, coincide con lo reportado en cultivos de células endoteliales y en otros modelos animales de HT (Akasaki y col. 2006; Sanchez y col. 2006; Sanchez y col. 2007; Steffen y col. 2007).

Debido a que la NOX es un complejo enzimático conformado por distintas subunidades regulatorias, se estudió una posible alteración en la expresión proteica de las subunidades NOX2 (gp91^{phox}), p47^{phox} y NOX4 en ratas tratadas con L-NAME y su posible modulación por parte de EC y QC.

Los efectos de L-NAME observados en los *Estudio 1* y *2* de esta tesis parecen estar principalmente asociados con la regulación de NOX a través de cambios en la expresión de la subunidad regulatoria p47^{phox}. Los resultados mostraron que tanto el aumento de la producción de anión superóxido como de la expresión de p47^{phox} asociados al tratamiento con L-NAME, no ocurrieron en las ratas que recibieron EC o QC simultáneamente con el L-NAME. Dado que p47^{phox} es una subunidad regulatoria indispensable para la organización del complejo enzimático de la NOX2, los resultados sugieren que EC y QC pueden modular la actividad de NOX2 a través de modificaciones en el ensamblado y de esa manera regular su actividad enzimática. Además, los efectos de L-NAME, EC y QC parecen no estar asociados a modificaciones en los niveles de expresión de las subunidades catalíticas, NOX2 (gp91^{phox}) y NOX4, estudiadas en tejido cardíaco, ya que no se encontraron cambios en su expresión en los grupos experimentales estudiados.

Estudios de otros autores mostraron una modulación de la expresión génica de p22^{phox} por EC en aorta de ratas DOCA-sal (Jimenez y col. 2007; Gomez-Guzman y

col. 2012). La QC por su parte, restableció los niveles de expresión de p47^{phox} en aorta de ratas SHR o con HT inducida por Ang II, así como los niveles de ARN mensajero y proteína de la subunidad catalítica NOX2 en miocardio de conejos sometidos a IR (Sanchez y col. 2006; Sanchez y col. 2007; Wan y col. 2009).

2.5. Efectos de (-)-epicatequina y quercetina sobre la actividad de enzimas antioxidantes

Se estudiaron los efectos del tratamiento con L-NAME y la suplementación con EC o QC, sobre la actividad de las enzimas SOD, GPx y catalasa, responsables de la detoxificación de anión superóxido y H₂O₂. La actividad de dichas enzimas se evaluó debido a los cambios observados en el estado *redox* y en la producción de anión superóxido en tejido cardíaco de ratas tratadas con L-NAME y la mejora observada en dichos parámetros en presencia de EC y QC.

En la literatura se encontraron distintos reportes acerca del efecto sobre las actividades enzimáticas de GPx, SOD y catalasa en distintos modelos animales de HT o en animales que recibieron alimentos ricos en polifenoles. Estudios realizados en ratas tratadas con L-NAME (75 mg/100 ml en el agua de bebida) o con una dieta alta en sal, mostraron que la administración de QC revirtió la disminución en la actividad de GPx observada en ratas tratadas por 6 semanas (Duarte y col. 2002). En otro modelo de ratas hipertensas, el té y extractos de té revirtieron la disminución de SOD y GPx en tejido cardíaco (Mao y col. 2008). En ratas DOCA-sal se encontró el mismo efecto sobre la actividad de SOD en corazón y plasma para un extracto de uva administrado por 4 semanas (Huang y col. 2015). Por otra parte, Simos y col. (2012) observaron una disminución de la actividad de GPx en plasma de ratas que recibieron una mezcla de EC y (+)-catequina durante 10 días, mientras que la actividad de SOD se encontraba aumentada.

Los resultados obtenidos en los *Estudios 1 y 2* muestran un aumento de la actividad de GPx y SOD luego del tratamiento con L-NAME, tal como había sido

reportado previamente por otros autores (Sainz y col. 2005). El incremento en la actividad de dichas enzimas puede deberse a una respuesta adaptativa frente al aumento de la producción de anión superóxido y de H_2O_2 en las ratas deficientes en NO. A su vez, el incremento de la actividad de GPx podría estar asociado con un aumento inicial de la producción de anión superóxido, el cual genera a su vez peróxido de hidrógeno que es luego detoxificado por la GPx. Además, en estos dos estudios, no se encontraron cambios para la actividad de catalasa en ninguno de los grupos experimentales, a diferencia de otros trabajos donde se observó un aumento de la actividad de catalasa por tratamiento con L-NAME (Sainz y col. 2005) y una disminución de su actividad en ratas DOCA-sal, la cual fue prevenida en presencia del flavonoide diosmina (Silambarasan y col. 2012).

En los grupos experimentales que recibieron simultáneamente L-NAME y EC o QC no se observó el aumento en la actividad de GPx ni de SOD, siendo sus valores similares al control. Dada la ausencia de un incremento en la actividad de GPx y SOD luego del tratamiento con EC o QC, los resultados obtenidos para el modelo L-NAME sugieren que el efecto de estos flavonoides se debe a la presencia de una actividad de NOX cercana a las condiciones fisiológicas. Esto favorece el mantenimiento de niveles de anión superóxido fisiológicos, no requiriendo de un aumento de la actividad de enzimas detoxificantes de dicha especie o de H_2O_2 ; lo que facilitaría a su vez un menor consumo de NO y consecuentemente un aumento de su biodisponibilidad.

2.6. Modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME: integración de resultados

A partir de los resultados obtenidos en los *Estudios 1 y 2* se comprobó que la administración de EC o de QC en la dieta previno el aumento tanto de la PA como del estrés oxidativo observado luego del tratamiento con L-NAME. EC y QC también previnieron los cambios en el metabolismo del NO (en el caso de EC) y del anión

superóxido (para ambos flavonoides). De esta manera la presencia de EC y QC favorecería el restablecimiento de la biodisponibilidad de NO a sus niveles fisiológicos a través de los siguientes mecanismos: i) un aumento de la actividad de NOS y de los niveles de fosforilación de eNOS en presencia de EC, ii) la prevención del estrés oxidativo como consecuencia de una menor producción de anión superóxido, asociada a una menor expresión de la subunidad p47^{phox} de la NOX, en presencia de EC y QC. En conjunto, estos mecanismos conducen a un menor consumo de NO por su reacción con el anión superóxido y al consecuente aumento de su biodisponibilidad en tejido cardíaco (Figuras 42 y 43).

Los distintos resultados encontrados para EC y QC podrían radicar en las diferencias en la estructura química que presentan estos compuestos y sus metabolitos. En este sentido, una estructura química específica de un flavonoide particular toma relevancia cuando se trata de un mecanismo de acción específico (Fraga y col. 2010). Así, las diferencias estructurales entre EC y QC, dadas únicamente por un grupo carbonilo y un doble enlace (en la posición 4 y en las posiciones 2 y 3 del anillo C, respectivamente) presentes en QC y ausentes en EC, podrían definir un efecto diferencial para dichos flavonoides.

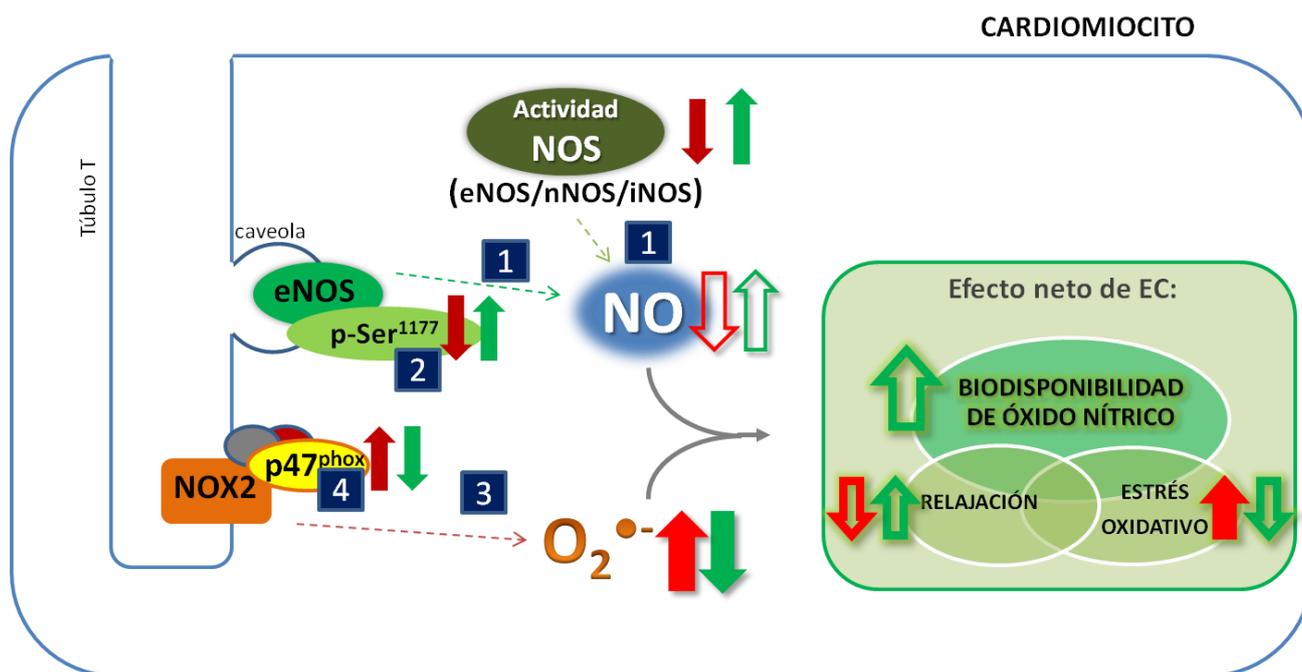


Figura 42. Cambios en los principales determinantes de la biodisponibilidad de NO en tejido cardíaco para el modelo L-NAME con EC. Las flechas rojas indican el sentido de la modificación en los grupos tratados con L-NAME comparado con el grupo control. Las flechas verdes indican el sentido de la modificación en el grupo tratado con L-NAME y EC comparado con el grupo tratado solo con L-NAME. Las flechas llenas corresponden a las variaciones en los parámetros medidos y las flechas vacías indican las variaciones supuestas en parámetros no determinados. Los números indican: **1** Actividad de NOS, **2** fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷, **3** producción de anión superóxido por parte de la NOX2, **4** expresión de la subunidad p47^{phox}.

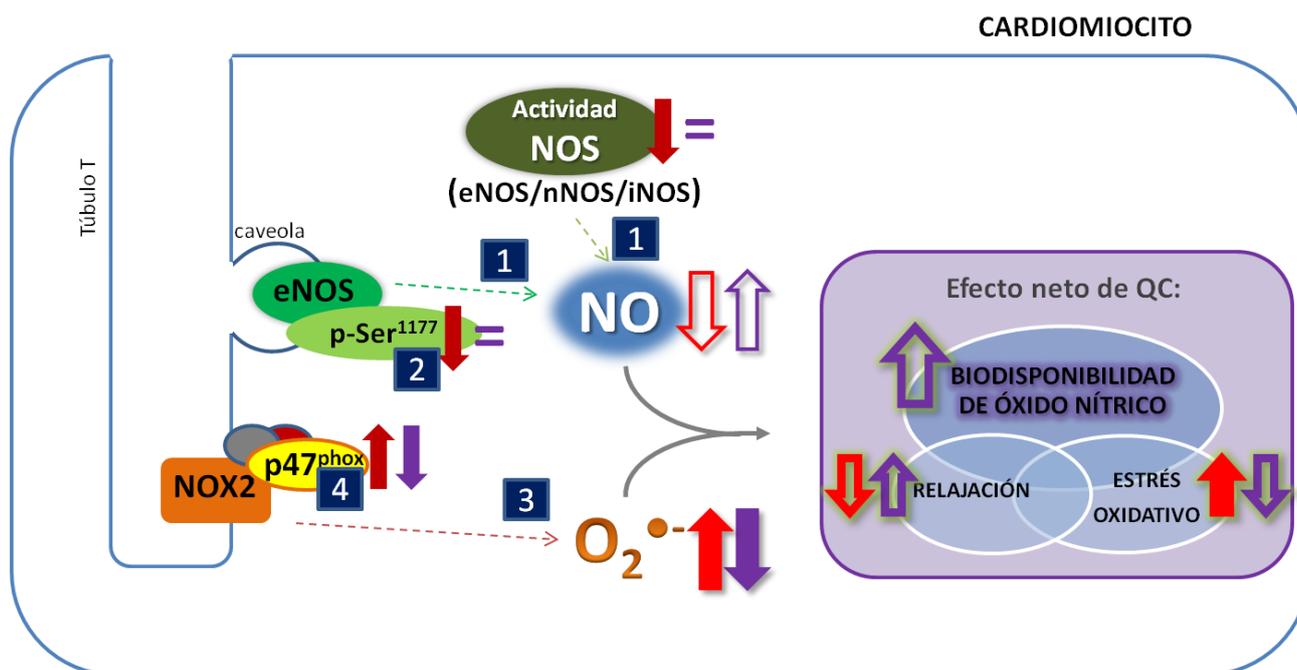


Figura 43. Cambios en los principales determinantes de la biodisponibilidad de NO en tejido cardíaco para el modelo L-NAME con QC. Las flechas rojas indican el sentido de la modificación en los grupos tratados con L-NAME comparado con el grupo control. Las flechas violetas indican el sentido de la modificación en el grupo tratado con L-NAME y QC comparado con el grupo tratado solo con L-NAME. Las flechas llenas corresponden a las variaciones en los parámetros medidos y las flechas vacías indican las variaciones supuestas en parámetros no determinados. Los números indican: **1** Actividad de NOS, **2** fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷, **3** producción de anión superóxido por parte de la NOX2, **4** expresión de la subunidad p47^{phox}.

3. Modelo de sobrecarga de fructosa

3.1 Efectos de (-)-epicatequina en ratas con sobrecarga de fructosa

El elevado consumo de fructosa a través de alimentos y bebidas endulzadas, ha sido asociado con varias condiciones de salud desfavorables, incluyendo el aumento de la PA y un mayor riesgo de desarrollar ECV (Malik y col. 2015).

El modelo animal de sobrecarga de fructosa se ha utilizado para promover desarreglos funcionales y metabólicos similares a los que se presentan en pacientes con SM (Martinez y col. 1994; Lehnen y col. 2013). Este modelo reproduce las modificaciones cardiovasculares del SM, aunque no represente en su totalidad las alteraciones definidas para el SM en humanos, como por ejemplo la obesidad (Martinez y col. 1994; Kamide y col. 2002; Wong y col. 2016).

Se ha mencionado a la menor biodisponibilidad de NO y el desarrollo de estrés oxidativo en el sistema cardiovascular, como condiciones que pueden estar relacionadas con los efectos perjudiciales de un consumo elevado de fructosa (Kamata y col. 1999; Delbosc y col. 2005; Xu y col. 2011; Leibowitz y col. 2013)

La evidencia epidemiológica sugiere que los flavonoides dietarios tienen la capacidad de prevenir o atenuar el desarrollo de enfermedades metabólicas. Para comprender los mecanismos involucrados en los efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular de la EC, se estudiaron los posibles efectos de dicho flavonoide sobre las modificaciones inducidas por la sobrecarga de fructosa en corazón de ratas, en términos de parámetros bioquímicos y del metabolismo de NO y del anión superóxido.

La administración de 10% (P/V) de fructosa en el agua de bebida, mostró alteraciones en distintos parámetros relacionados con los factores de riesgo de SM, incluyendo un aumento de la PA. En este modelo se asume que el incremento en la PA tiene un origen multifactorial semejante al de la HT esencial en humanos.

3.2 Cantidad administrada de (-)-epicatequina

La cantidad de EC utilizada en el modelo de fructosa se ajustó de manera tal que los animales consumieran 20 mg/kg/d de EC, lo que equivale a 0,2 g EC/kg de dieta.

En comparación con el modelo de L-NAME, la cantidad administrada en este caso es aproximadamente 15 veces menor. Dicha cantidad fue seleccionada en base a datos encontrados en bibliografía (Bettaieb y col. 2014) y permitió utilizar cantidades de EC más cercanas a las que podrían ser consumidas por los humanos. Teniendo en cuenta la diferencia metabólica entre las ratas y los humanos (Agency 2012), es posible estimar la equivalencia de la cantidad administrada de EC. Así, una cantidad de 20 mg/kg/d de EC en ratas resulta equivalente a 4 mg/kg/d de EC en humanos. Este último valor debería ser comparado con los datos de ingesta diaria humana de EC, que se estima en aproximadamente 0,21 mg/kg/d para una población no vegetariana que consume solo un tercio de las 5 porciones diarias recomendadas (Fogli-Cawley y col. 2007; Kesse-Guyot y col. 2011). La cantidad administrada en este modelo resulta entonces 19 veces mayor que el consumo promedio en humanos. Sin embargo, debe tenerse en consideración que la ingesta promedio en humanos se encuentra por debajo de la cantidad de porciones de frutas y hortalizas recomendadas y que la incidencia de enfermedades crónicas y desarreglos metabólicos en la población está en constante crecimiento (OMS Informe 2015; Hung y col. 2004; Iqbal y col. 2008). Además, los niveles de EC administrados podrían alcanzarse mediante distintas estrategias: i) adoptando las recomendaciones nutricionales de aumentar el consumo de frutas y hortalizas, ii) aumentando específicamente el consumo de frutas y hortalizas ricas en flavanoles o en EC y iii) suplementando la dieta con EC o con flavanoles puros.

3.3 Aspectos metabólicos generales

Los resultados obtenidos en el *Estudio 3* mostraron que las ratas tratadas con una sobrecarga de fructosa presentaron dislipidemia, evidenciado por un mayor contenido plasmático de TG y de colesterol-LDL. Estos resultados coinciden con varios trabajos realizados sobre el mismo modelo y revisados por Galleano y col. (2012). Las ratas que recibieron simultáneamente fructosa y EC mostraron una disminución de los niveles de los parámetros mencionados a valores similares a los animales control. Resultados similares reportados previamente, revelaron una disminución de la concentración plasmática de TG por EC (Bettaieb y col. 2014). Asimismo, si bien el tratamiento con fructosa no generó cambios en los niveles de colesterol total y en el contenido de colesterol-HDL, las ratas cotratadas con fructosa y EC mostraron una mejora en el perfil lipídico, ya que se observó un menor nivel de colesterol total y un mayor contenido de colesterol-HDL comparado con los otros grupos. Resultados similares fueron reportados previamente en otros trabajos (Bettaieb y col. 2014; Litterio y col. 2015; Prince y col. 2016).

Ciertos flavonoides o alimentos ricos en ellos, mostraron que pueden disminuir los niveles de TG y/o colesterol total y colesterol-LDL (o aumentar colesterol-HDL) en circulación tanto en sujetos con SM como en modelos animales de SM (Bose y col. 2008; Rivera y col. 2008; Yokozawa y col. 2008; Mulvihill y col. 2009; Egert y col. 2010; Mulvihill y col. 2010; Basu y col. 2012; Huang y col. 2012; Gutierrez-Salmean y col. 2014). Los mecanismos propuestos mediante los cuales los flavonoides mejorarían las dislipidemias incluyen la modulación de la absorción de lípidos, la regulación de la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo lipídico y de la expresión de factores de transcripción involucrados en la síntesis de TG y colesterol (Horton y col. 2002). Adicionalmente, estudios en donde se realiza una suplementación con EC pura en el mismo modelo animal utilizado en el *Estudio 3*, sugieren una participación de este flavonoide como regulador de la lipogénesis (Bettaieb y col. 2014).

Uno de los factores de riesgo que es criterio al momento de diagnosticar SM en humanos, es la glucosa plasmática elevada. En el *Estudio 3*, las ratas sometidas a una sobrecarga de fructosa no mostraron niveles plasmáticos elevados de glucosa. El tratamiento con EC tampoco modificó los niveles de glucemia basal.

Mientras que existen trabajos en donde se encontraron niveles de glucosa plasmática mayores a los fisiológicos (Kelley y col. 2004), otros, en concordancia con lo hallado en el *Estudio 3*, no reportaron variaciones en la concentración plasmática de glucosa (Hyakukoku y col. 2003; Zhao y col. 2009; Zakula y col. 2011) en animales con sobrecarga de fructosa. Por otro lado, en un trabajo reciente se ha informado que la EC disminuye la hiperglucemia desarrollada en ratas que recibieron una dieta rica en grasa (Gutierrez-Salmean y col. 2014). La variabilidad encontrada en cuanto a los efectos de la sobrecarga de fructosa sobre los niveles de glucemia basal, podrían deberse a las diferencias en la duración del tratamiento y la concentración de fructosa utilizada en cada caso.

3.4 Efectos de (-)-epicatequina sobre la presión arterial

Se han realizado varios estudios epidemiológicos para investigar el efecto del consumo de flavonoides, o alimentos ricos en ellos, sobre la PA en sujetos diagnosticados con SM o que presentan algunos de sus factores de riesgo (Buitrago-Lopez y col. 2011; Shrimel y col. 2011; Hooper y col. 2012; Osakabe 2013). En la mayoría de esos estudios se encontró una asociación entre el consumo de flavonoides y la reducción de distintos factores de riesgo del SM, entre ellos de la PA. Sujetos obesos o con sobrepeso que recibieron durante dos semanas chocolate amargo rico en flavonoides (0,5 - 1,0 g/d), mostraron una reducción significativa de su PA (Almoosawi y col. 2010). A su vez, en un estudio de intervención en pacientes obesos, el consumo de una bebida a base de cacao, conteniendo 900 mg de flavanoles, redujo la PA independientemente de la realización de ejercicio físico (Davison y col. 2008). Por otro lado, la administración de 100 g de chocolate negro

(que contiene 110 mg de EC y otros flavonoides), mejoró la sensibilidad a la insulina y redujo la PA en pacientes hipertensos (Grassi y col. 2008a).

En modelos animales de SM, la administración de flavonoides también mostró efectos de disminución de la PA. Ratas alimentadas con una dieta alta en grasa mostraron un aumento de su PA, el cual fue prevenido por el consumo de flavanoles extraídos de polvo de cacao (0,2% P/P en la dieta) (Osakabe y col. 2014). También se observó una disminución de la PA por la administración de un extracto rico en proantocianidinas (125 mg/kg/d por 14 semanas) y de vino tinto (10 mL/kg/d por 4 semanas) en ratas que recibieron una sobrecarga de fructosa (Tsai y col. 2008; Vazquez-Prieto y col. 2010). Además, en un modelo de ratas prediabéticas, la administración de catequina (30 mg/kg/d por 12 semanas) previno el aumento de la PA (Ihm y col. 2009). Otro modelo animal de SM mostró que la QC (0,8 g/kg de dieta por 8 semanas) evitó el aumento en la PA y las modificaciones en la estructura y función del corazón (Panchal y col. 2012).

En esta tesis, se midió la PAS de los animales a lo largo del periodo experimental, para evaluar si el tratamiento con fructosa produce un aumento de la PA y así estudiar el efecto de la suplementación con EC en la dieta. Los resultados obtenidos mostraron que la administración de EC en la dieta (0,2 g/kg de dieta) se asoció con la prevención del aumento de la PA observado en las ratas tratadas con fructosa. El aumento de la PA producido en las ratas que recibieron una sobrecarga de fructosa en el agua de bebida, podría ser el reflejo de alteraciones en los niveles de NO que alterarían su biodisponibilidad.

3.5 Marcadores de hipertrofia y remodelamiento cardíaco

A fin de evaluar un posible desarrollo de hipertrofia y remodelamiento cardíaco en los animales tratados con fructosa y en especial la participación de EC durante dichos procesos, se estudiaron distintos marcadores: el índice cardíaco, la

actividad de metaloproteasa de matriz tipo 9 (MMP-9), los niveles de fosforilación de ERK y la presencia/ausencia de fibrosis cardíaca.

A pesar del aumento de la PA observado en los animales con sobrecarga de fructosa en este estudio, el tratamiento con fructosa no estuvo asociado al desarrollo de hipertrofia ni remodelamiento cardíaco en ninguno de los grupos estudiados, ya que no se encontraron modificaciones en ninguno de los parámetros evaluados. En este aspecto debe tomarse en consideración que el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, en ratas sometidas a una sobrecarga de fructosa, depende de la cantidad de fructosa provista y de la duración del tratamiento. Por ejemplo, las dietas con un alto contenido de fructosa (60% P/V) administradas durante 8 semanas promovieron el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Cosenzi y col. 1999; Al-Awwadi y col. 2005; Bagul y col. 2015). Sin embargo, cuando la administración de la cantidad de fructosa fue menor, como en el caso del presente estudio (10% P/V), no se observaron evidencias de hipertrofia cardíaca, a pesar del aumento de la PA (Lou y col. 2014). La administración de fructosa al 10% (P/V) durante períodos más prolongados (8 meses) sí mostró la inducción de hipertrofia cardíaca en ratas (Xing y col. 2008).

Si bien los resultados de esta tesis no muestran cambios en marcadores de hipertrofia en ninguno de los grupos estudiados existe evidencia del efecto de EC frente a la hipertrofia. En un modelo de HT inducido por la administración de L-NAME, la EC logró prevenir la hipertrofia cardíaca y las lesiones en el parenquima renal así como la proteinuria, aún sin disminuir la PA (Gomez-Guzman y col. 2011).

3.6. Efectos de (-)-epicatequina sobre marcadores de estrés oxidativo

El SM ha sido asociado con un aumento del estrés oxidativo en varios tejidos (Girard y col. 2006; Nair y col. 2014; Lubrano y col. 2015; Spanidis y col. 2016), incluyendo el corazón (Mahmood y col. 2013; Conti y col. 2014; Bradley y col. 2015). En el *Estudio 3*, se evaluó la presencia de estrés oxidativo mediante dos

metodologías: el contenido de TBARS y el estado de oxidación del glutatión expresado como el índice GSSG/GSH².

El aumento de los niveles de anión superóxido como consecuencia de la sobrecarga de fructosa podría ser el responsable del establecimiento de estrés oxidativo en el corazón y de una disminución en la biodisponibilidad de NO. La administración de EC a las ratas con sobrecarga de fructosa aumentó los niveles de GSH y disminuyó los de GSSG en tejido cardíaco, lo que llevó a una disminución significativa del índice GSSG/GSH² que retornó a los valores similares a los mostrados por el grupo control.

El mismo efecto de EC sobre el estado *redox* del glutatión fue informado en otros tejidos y tipos celulares (cultivo de astrocitos corticales y eritrocitos humanos) (Rizvi y col. 2001; Bahia y col. 2008; Cordero-Herrera y col. 2015). Resultados previos de nuestro laboratorio, mostraron que la EC mejoró el estado *redox* del glutatión plasmático en el modelo de inhibición de NOS por tratamiento con L-NAME (Litterio y col. 2012).

Es importante observar que, a pesar de que las ratas del grupo control y las ratas que recibieron fructosa mostraron niveles similares de TBARS, el grupo que recibió EC junto con la fructosa mostró una disminución significativa de aproximadamente el 50% en este indicador de estrés oxidativo. Otros autores también observaron una reducción en el contenido de TBARS en plasma y distintos tejidos incluyendo el corazón, luego de la administración de flavonoides en modelos animales de síndrome metabólico (Yamamoto y col. 2006; Chung y col. 2013; Abo-Youssef 2015).

Los resultados obtenidos sugieren que la EC puede prevenir los cambios en el estado *redox* del tejido cardíaco producidos por el tratamiento con fructosa y de esa forma proteger al tejido contra la peroxidación lipídica, lo que fue demostrado por un menor índice de GSSG/GSH² y contenido de TBARS, respectivamente. El mismo efecto de EC se observó en el riñón de ratas en el mismo modelo animal (Prince y col. 2016).

3.7. Efectos de (-)-epicatequina sobre la biodisponibilidad de NO en corazón

Se estudió el efecto de EC sobre la producción de NO y de anión superóxido como principales determinantes de la biodisponibilidad de NO, en tejido cardíaco de ratas con sobrecarga de fructosa (Figura 40).

3.7.1. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de NO

Varios estudios en modelos animales de SM, han asociado la disminución de la PA con una mejora en la función cardiovascular y un aumento de la biodisponibilidad de NO como consecuencia de un aumento en la producción de NO o una disminución de su degradación (Tsai y col. 2008; Yokozawa y col. 2008; Ihm y col. 2009; Vazquez-Prieto y col. 2010).

En el *Estudio 3* se evaluó el efecto de la suplementación de la dieta con EC sobre la actividad y expresión de distintas isoformas de la enzima NOS, con el fin de estudiar el posible efecto modulador de EC sobre los niveles de NO.

Estudios realizados en modelos animales de sobrecarga de fructosa muestran resultados contrapuestos al estudiar la actividad y expresión de NOS. En corazón y aorta de ratas que recibieron una dieta o bebida suplementada con fructosa al 10% (P/V) (en protocolos con una duración desde 9 a 24 semanas) se observó una disminución en la actividad y en niveles de expresión de proteína y/o ARN mensajero de eNOS (Miatello y col. 2001; Vazquez-Prieto y col. 2010; Pektas y col. 2015; Senaphan y col. 2015; Medeiros y col. 2016). Otro trabajo reportó una disminución en los niveles de fosforilación de eNOS luego del tratamiento con fructosa 10% (P/V) durante 9 semanas (Stanisic y col. 2016). Por otro lado, Miatello y col. (2005) observaron una disminución en la actividad de NOS en tejido mesentérico vascular de ratas tratadas por 45 días con fructosa al 10% (P/V) pero no hallaron cambios para la misma determinación en corazón. Además, el tratamiento por 8 semanas con una dieta con cantidades mayores de fructosa (60%), produjo una

disminución en los niveles de proteína y ARN mensajero de eNOS en aorta y corazón (Nyby y col. 2005).

En el modelo de fructosa de esta tesis, la actividad de NOS se encontró aumentada en el corazón de ratas sometidas a una sobrecarga de fructosa. El aumento de la actividad de NOS, en este modelo, fue independiente de la presencia de EC, ya que tanto el grupo F como F-EC mostraron una mayor actividad de la enzima. Sin embargo, el grupo que recibió simultáneamente fructosa y EC presentó una actividad de NOS significativamente mayor que el grupo tratado sólo con fructosa. Dicho efecto de EC aumentando la actividad de NOS, también se observó en el mismo modelo tanto en aorta como en riñón (Litterio y col. 2015; Prince y col. 2016). El aumento de la actividad de NOS en las ratas tratadas con fructosa podría atribuirse a un mecanismo compensatorio para aumentar la producción de NO como respuesta a los niveles aumentados de anión superóxido y mantener así la biodisponibilidad de NO en niveles fisiológicos. Se describió un mecanismo compensatorio semejante en ratas SHR (Costa y col. 2010).

La respuesta general en la actividad de NOS en presencia de EC se asoció con la activación de eNOS, evidenciada por el incremento en los niveles de su fosforilación en Ser¹¹⁷⁷, con un mayor nivel de expresión de iNOS y sin cambios en la expresión de nNOS respecto al control.

En función de dichos resultados, los efectos positivos de la EC previniendo el desarrollo del aumento de la PA y de otros parámetros metabólicos, no puede asociarse directamente a un efecto de EC como estimulador de la generación de NO. Esta inferencia se debe a que en el grupo tratado sólo con fructosa también se observó un aumento de la actividad de NOS y de la fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷. Sin embargo, la presencia de EC parece contribuir con la producción de NO, dado que los mayores niveles de actividad de NOS se observaron en el grupo que recibió EC en la dieta, contribuyendo a aumentar aún más la biodisponibilidad de NO.

3.7.2. Efectos de (-)-epicatequina sobre la producción de anión superóxido

La hipótesis de que los flavonoides actúan a través de la reducción de la degradación del NO se apoya en numerosos estudios en distintos modelos animales. En ratas obesas (OLETF), la administración crónica de (+)-catequina redujo el incremento de la PA y previno la disfunción endotelial en asociación con una menor actividad de NOX y una menor expresión de las subunidades p47^{phox} y p22^{phox} en aorta (Ihm y col. 2009). En un modelo de ratas con sobrecarga de fructosa, la administración de vino tinto redujo la actividad de NOX en aorta y la expresión de NOX4 en tejido adiposo mesentérico (Vazquez-Prieto y col. 2010; Vazquez-Prieto y col. 2011). En otro trabajo, la administración de extractos enriquecidos en polifenoles previnieron el aumento de los niveles de expresión de NOX2 (gp91^{phox}) en aorta y corazón de ratas con sobrecarga de fructosa (Al-Awwadi y col. 2005).

En el *Estudio 3* de esta tesis, se observó que la capacidad de producir NO es similar tanto en presencia como en ausencia de EC. En este escenario, los niveles de anión superóxido resultan un factor clave para definir la biodisponibilidad de NO. La sobrecarga de fructosa produjo una condición de aumento de la producción de anión superóxido y una disminución de la actividad de SOD en el corazón, lo cual resultaría en un aumento de la concentración en estado estacionario de anión superóxido. La administración de EC previno el aumento en la producción de anión superóxido así como la disminución de la actividad de SOD, cambios que contribuirían a la normalización en la biodisponibilidad de NO.

Los cambios en la producción de anión superóxido en el corazón, observados en el *Estudio 3*, estuvieron acompañados por modificaciones en la expresión de p47^{phox} (subunidad regulatoria de NOX2) y de NOX4 (subunidad catalítica). Se observaron efectos similares en riñón y aorta de ratas tratadas con sobrecarga de fructosa, con L-NAME y en el modelo DOCA-sal, donde se encontró una disminución de los niveles de anión superóxido por modulación de subunidades de

NOX (incluyendo p47^{phox}) luego del tratamiento con EC (Gomez-Guzman y col. 2011; Gomez-Guzman y col. 2012; Litterio y col. 2015).

Tanto la actividad como la expresión de NOX2 y NOX4 se encontraron aumentadas en distintos modelos de HT (Wingler y col. 2001; Sirker y col. 2011). Mientras que existe un consenso en cuanto al papel de NOX2, la participación de NOX4 en la HT no es clara y presenta ciertas controversias. En general, el aumento de la actividad de NOX2 en distintos modelos correlaciona con el aumento de la PA. Además, ratones que sobreexpresan NOX2 en endotelio presentaron una mayor producción de especies oxidantes y una menor vasorelajación dependiente de acetilcolina comparado con los animales control (Murdoch y col. 2011). Por otro lado, ratones *knock out* para NOX2 mostraron una menor PA tanto en condiciones basales como frente a la estimulación por Ang II, comparado con los animales control (Wang y col. 2001). Se obtuvieron resultados similares utilizando ratones *knock out* para p47^{phox}, donde la ausencia de respuesta a la Ang II se asoció con una disminución de la producción de anión superóxido en células endoteliales y fibras musculares lisas (Landmesser y col. 2002).

En discordancia a los efectos de NOX2, estudios en animales con sobreexpresión de NOX4 mostraron un aumento de la relajación del endotelio dependiente de H₂O₂ y una menor PA comparado con los animales control (Ray y col. 2011). Los autores sugieren que el aumento de la actividad de NOX4 podría contrarrestar la HT inducida por Ang II y actuar en oposición a los efectos prohipertensivos de NOX1 y NOX2 (Sirker y col. 2011). Además, distintos autores informaron que la sobreexpresión de NOX4 en cardiomiocitos tendría efectos protectores contra la disfunción cardíaca inducida por la sobrecarga de presión (Zhang y col. 2010; Schroder y col. 2012). Sin embargo, trabajos realizados con ratones *knock out* para NOX4 en animales con sobrecarga de presión debida al aumento de la PA, mostraron en un caso la mejora de la función sistólica ventricular (Maejima y col. 2011) y en otro un desarrollo de hipertrofia más severa y alteraciones en la función contráctil (Zhang y col. 2010).

Es importante destacar que la NOX4 libera H_2O_2 en lugar de anión superóxido, lo que preservaría la biodisponibilidad de NO (Ray y col. 2011). Más aún, Yada y col. (2003) han propuesto que el H_2O_2 derivado de la NOX4 mediaría una vasorelajación compensatoria actuando como un factor hiperpolarizante de la membrana, en la HT y aterosclerosis. En contraposición con esta interpretación, ratas Dahl sensibles a la sal y *knock out* para NOX4 mostraron un menor aumento de la PA comparado con ratas Dahl control (Cowley y col. 2016).

En el *Estudio 3*, el aumento de la expresión de NOX4 que mostraron las ratas con sobrecarga de fructosa ocurre en paralelo al aumento de la PA. Además, el aumento de NOX4 fue significativamente menor en presencia de EC, ya que el grupo tratado con fructosa y EC también mostró una mayor expresión de NOX4 comparado con los animales control, aunque significativamente menor que el grupo que recibió solo fructosa. Teniendo en cuenta los resultados mencionados y considerando que en este modelo no se hallaron indicios de hipertrofia, no es posible atribuir un efecto de NOX4 como cardioprotector. No obstante, podríamos inferir que el H_2O_2 producto de la actividad de NOX4, actuaría como molécula señal asociada a la transducción de las señales *redox* dependientes en tejido cardíaco en este modelo. Sin embargo, los resultados obtenidos no brindan información suficiente para relacionar los cambios en la expresión de NOX4 con efectos negativos o positivos sobre la salud.

3.8. Efectos de (-)-epicatequina sobre la actividad de enzimas antioxidantes

Las enzimas SOD, GPx y catalasa son las responsables de metabolizar el anión superóxido y el H_2O_2 . La disminución de las actividades de SOD y GPx encontradas en las ratas que recibieron la sobrecarga de fructosa fue restablecida a valores control cuando se administró EC en la dieta, sugiriendo que la EC previene el déficit antioxidante que presentan las ratas tratadas con fructosa. Esto indica la

recuperación de la capacidad del corazón de hacer frente a niveles aumentados de anión superóxido y H_2O_2 .

La disminución de la actividad de SOD en el grupo tratado con fructosa se observa en paralelo a una mayor capacidad de producción de anión superóxido en el mismo grupo. Las ratas que recibieron simultáneamente fructosa y EC recuperaron la actividad de SOD casi por completo, lo que sugiere que la administración de EC contribuiría al mantenimiento del anión superóxido en niveles fisiológicos.

La GPx confiere protección a la membrana celular frente a la peroxidación lipídica. El restablecimiento de la actividad de GPx a los valores mostrados por el grupo control podría estar asociado con el menor índice de oxidación de glutatión observado en el grupo que recibió fructosa y EC, en un contexto de mejora del estado *redox* del tejido. El aumento de actividad de GPx junto con un menor nivel de TBARS en presencia de EC estarían sugiriendo una protección a los lípidos de membrana contra la peroxidación.

3.9. Modelo de sobrecarga de fructosa: integración de resultados

A partir de los resultados obtenidos, se comprobó que la administración de EC en la dieta fue eficaz para mejorar las alteraciones en los parámetros metabólicos producidas por la sobrecarga de fructosa y para prevenir el aumento de la PA y del estrés oxidativo. La EC también previno los cambios en el metabolismo del NO y del anión superóxido, modulando sus niveles y restableciendo así la biodisponibilidad de NO. Los mecanismos involucrados en ello serían: i) un aumento de la actividad de NOS asociado al aumento en los niveles de fosforilación de eNOS y sin cambios en la expresión total de la enzima, ii) la prevención del estrés oxidativo como consecuencia de una menor producción de anión superóxido, asociada a una menor expresión de la subunidad p47^{phox} de la NOX en presencia de EC. En conjunto, dichos eventos conducen a un menor consumo de NO por su reacción con el anión

superóxido y a un aumento de su biodisponibilidad en tejido cardíaco en este modelo experimental (Figura 43).

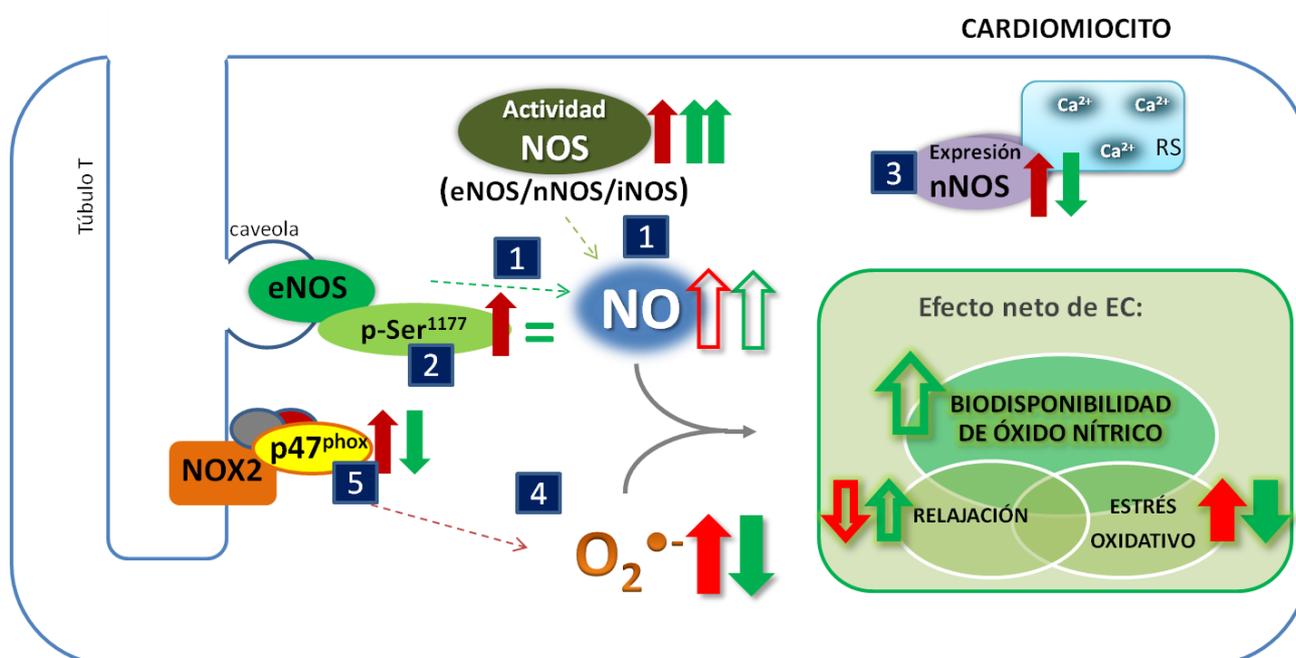


Figura 43. Cambios en los principales determinantes de la biodisponibilidad de NO en tejido cardíaco. Las flechas rojas indican el sentido de la modificación en los grupos tratados con fructosa comparado con el grupo control. Las flechas verdes indican el sentido de la modificación en el grupo tratado con fructosa y EC comparado con el grupo tratado solo con fructosa. Las flechas llenas corresponden a las variaciones en los parámetros medidos y las flechas vacías indican las variaciones supuestas en parámetros no medidos. Los números indican: **1** actividad de NOS, **2** fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷, **3** expresión de nNOS, **4** producción de anión superóxido por parte de la NOX2, **5** expresión de la subunidad p47^{phox}.

4. Efectos diferenciales de (-)-epicatequina y quercetina

En los *Estudios 1 y 2*, los efectos observados para EC y QC fueron similares para ciertos parámetros, como la producción de anión superóxido, en donde se

observó que ambos compuestos previnieron su incremento luego del tratamiento con L-NAME. Sin embargo, para otras determinaciones, como por ejemplo la actividad de NOS, los resultados fueron diferentes según el flavonoide administrado. Los distintos efectos observados en esta tesis y en la literatura (Ramirez-Sanchez y col. 2010; Ottaviani y col. 2011; Najmanova y col. 2014) podrían radicar en las diferencias en la estructura química y en la presencia de distintos metabolitos tanto de EC como de QC que podrían interactuar de manera diferencial con distintas proteínas y desencadenar efectos biológicos diferentes.

Se ha sugerido que la diferencia estructural entre distintos flavonoides, incluso cuando se trata de tan solo la orientación de un grupo •OH, implicaría efectos biológicos diferentes. Este es el caso de los experimentos realizados por Ramirez Sanchez y col. (2010), en donde se observó que la producción de NO por células endoteliales incubadas con EC fue mayor que la detectada al incubar las mismas células con su estereoisómero (+)-catequina. También se observó que la dilatación *in vivo* de la arteria femoral humana fue mayor luego del tratamiento con EC comparado con (+)-catequina (Ottaviani y col. 2011). Un trabajo realizado con distintos metabolitos de QC mostró efectos diferenciales para cada uno de ellos en cuanto a su potencia vasorelajante sobre anillos de aorta de ratas (Najmanova y col. 2014).

Como ya se mencionó, la biodisponibilidad de NO puede asociarse con el estrés oxidativo como resultado de la reacción entre el NO y el anión superóxido. Sin embargo, deben ser tomadas en consideración otras posibilidades de regulación de NOS y NOX, que si bien no fueron determinadas en esta tesis no pueden dejar de mencionarse.

Se acepta que los flavonoides son metabolizados luego de su absorción. Existen estudios en donde se demostró que al incubar células endoteliales de cordón umbilical HUVEC con 3'-O-metil(-)-epicatequina o 4'-O-metil(-)-epicatequina, dichos metabolitos de EC ejercieron efectos inhibitorios específicos sobre la NOX (Steffen y col. 2007). Se explica este efecto por la similitud estructural que existe entre

dichos metabolitos de EC y la apocinina, reconocido inhibidor de la actividad de NOX.

Por otro lado, podría existir un desacoplamiento de NOS mediado por el anión superóxido, lo que generaría un ciclo de retroalimentación donde la NOS produce anión superóxido en lugar de NO (Dikalova y col. 2010; Lobysheva y col. 2011; Youn y col. 2012). En otro trabajo, Qian y col. (2012) han propuesto una regulación negativa directa del NO sobre la NOX5 mediante la S-nitrosilación de NOX en sitios específicos. La S-nitrosilación es una modificación reversible y ejerce una modulación de la función enzimática que es análoga a la fosforilación. Este mecanismo de S-nitrosilación que ejercería el NO sobre NOX mantendría una baja tasa de producción de anión superóxido. Además, otros autores demostraron que el NO S-nitrosila subunidades de NOX2, lo que confiere un mecanismo adicional para la regulación de los niveles de NO y anión superóxido (Selemidis y col. 2007).

5. Consideraciones finales

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en los distintos estudios de la presente tesis, podemos inferir que la EC y la QC podrían ser, al menos en parte, las responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular y la HT. La EC fue capaz de atenuar las modificaciones bioquímicas en el corazón inducidas por la sobrecarga de fructosa. Además, tanto la EC como la QC mostraron una modulación de la expresión y/o actividad de proteínas específicas, lo cual resultó en un desplazamiento del estado *redox* hacia un entorno más reductor, lo que aumentaría la biodisponibilidad de NO. Dado el importante papel del NO en el mantenimiento de una correcta función cardiovascular, los efectos observados de EC y QC parecen de gran relevancia. El hecho de que estos flavonoides se encuentren comúnmente presentes en la dieta humana, brinda una explicación razonable del efecto beneficioso asociado al consumo de una dieta rica en frutas y hortalizas.

Además, estos conocimientos abren la posibilidad de proponer un consumo preferencial de alimentos ricos en los flavonoides estudiados, o bien establecer, con fundamentación científica, una recomendación de dietas enriquecidas en EC y/o QC, considerándolo de utilidad como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles, donde se encuentra comprometida la biodisponibilidad de NO. Inclusive, los resultados obtenidos permitirían considerar el uso de dichos compuestos en forma pura como agentes farmacológicos, lo que ofrecería alternativas terapéuticas para este tipo de enfermedades.

Conclusiones



CONCLUSIONES

Conclusiones *Estudios 1 y 2*

1. En el modelo de incremento de la PA por inhibición de NOS, los flavonoides EC y QC previnieron el incremento de la PA producido por el tratamiento con L-NAME por 4 días.
2. El efecto antihipertensivo de EC ocurrió en paralelo con una mayor actividad de NOS en corazón y el mantenimiento de los niveles de fosforilación de eNOS en el sitio de activación Ser¹¹⁷⁷ similares al control.
3. El efecto antihipertensivo de QC ocurrió sin aumento de la actividad de NOS en corazón cuando las ratas recibieron simultáneamente QC y L-NAME y sin modificaciones en la fosforilación de eNOS, ni en la expresión de eNOS y nNOS. Sin embargo, la presencia de QC previno el incremento en la expresión de iNOS provocado por el tratamiento con L-NAME.
4. El efecto antihipertensivo de EC y QC ocurrió en paralelo con una menor producción de anión superóxido dependiente de NADPH y con una menor expresión de la subunidad p47^{phox}, sin cambios en los niveles de expresión de gp91^{phox} y NOX4.
5. Las ratas que recibieron EC o QC simultáneamente con L-NAME mostraron un menor índice de GSSG/GSH² como indicador de estrés oxidativo con respecto al grupo tratado sólo con L-NAME.
6. La suplementación con EC y QC previno las alteraciones en las actividades de las enzimas antioxidantes SOD y GPx provocadas por el tratamiento con L-NAME.

Conclusiones Estudio 3

1. La suplementación con EC atenuó el aumento en el contenido plasmático de TG y de colesterol-LDL, producidas por el tratamiento con fructosa. Además, las ratas que recibieron EC mostraron un menor nivel de colesterol total y un mayor contenido de colesterol-HDL.
2. En el modelo de de sobrecarga de fructosa, la administración dietaria de EC previno el incremento en la PA producido por el tratamiento con fructosa durante 8 semanas.
3. El efecto antihipertensivo de EC ocurrió en paralelo con una mayor actividad de NOS en corazón, con modificaciones en los niveles de fosforilación de eNOS en el sitio de activación Ser¹¹⁷⁷ y en la expresión de nNOS e iNOS; sin cambios en la expresión de eNOS.
4. El efecto antihipertensivo de EC ocurrió en paralelo con una menor producción de anión superóxido dependiente de NADPH y con una menor expresión de la subunidad p47^{phox} y NOX4.

Conclusiones generales

La EC y la QC presentaron un efecto antihipertensivo *in vivo* a través de la modulación de la actividad, expresión y modificaciones postraduccionales de proteínas específicas, resultando en un metabolismo controlado de las especies oxidantes, favoreciendo la biodisponibilidad de NO.

Los efectos de EC y QC resultan relevantes para la salud debido a la importancia del NO en la fisiología cardiovascular y la implicancia del estrés oxidativo en distintas situaciones patológicas como la hipertensión.

La EC y la QC serían responsables de los efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular y la hipertensión, asociados al consumo de frutas y hortalizas y productos derivados, observados en poblaciones humanas.

Los hallazgos descritos en esta tesis proporcionan nueva e importante información para diseñar dietas enriquecidas en dichos flavonoides y/o realizar estudios de intervención dirigidos a la prevención y/o tratamiento de enfermedades metabólicas y crónicas no transmisibles en las cuales la biodisponibilidad de NO se encuentre comprometida.

Por último, la información obtenida abre la posibilidad de estudiar otros compuestos químicamente relacionados (flavonoides y polifenoles) que pudieran compartir algunos de los efectos saludables observados.

Resumen



RESUMEN

Estudios epidemiológicos muestran una disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) y de hipertensión (HT) en sujetos que consumen regularmente una dieta rica en frutas y hortalizas. Estos estudios apoyan la idea de que los beneficios podrían estar causalmente relacionados con la presencia de ciertos flavonoides en las frutas y hortalizas.

Los flavonoides han sido ampliamente reconocidos por tener una acción antioxidante *in vitro* y por ello se les adjudicó su efecto beneficioso sobre la salud. Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado la evidencia acerca de otros posibles mecanismos de acción (interacción con membranas y receptores; regulación de actividades enzimáticas, entre otros efectos) que serían compatibles con los efectos observados *in vivo* y con la baja concentración de flavonoides presente en los tejidos

El óxido nítrico (NO) modula varios aspectos de la fisiología cardiovascular participando en la regulación de la presión arterial, la frecuencia y contractibilidad cardíaca, así como la vasorelajación.

La disminución de la biodisponibilidad de NO es considerado un marcador temprano de desarrollo de ECV. La concentración de NO en los tejidos dependerá tanto de su producción por parte de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) como de su metabolización. Una de las vías de metabolización del NO es su reacción con el anión superóxido. La enzima NADPH oxidasa es considerada una de las fuentes principales de producción de anión superóxido en el sistema cardiovascular y existe evidencia de su participación en el desarrollo de la ECV.

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue estudiar los efectos de dos flavonoides suplementados en la dieta, (-)-epicatequina (EC) y quercetina (QC), sobre el metabolismo del NO y del anión superóxido, y los posibles mecanismos de

acción involucrados, en tejido cardíaco. Para ello se seleccionaron dos modelos animales en donde se desarrolla un aumento de la PA y en los cuales se encuentra comprometida la biodisponibilidad de NO.

En el primer modelo se indujo el aumento de la PA por inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) con L-NAME. Este inhibidor se administró en el agua de bebida (360 mg/L) durante 4 días a un grupo de animales, mientras que a otros dos grupos se les coadministró EC o QC (4 g/kg de dieta). La administración de dichos compuestos fue efectiva en prevenir el aumento de la PA y del estrés oxidativo inducido por L-NAME, así como los cambios en el metabolismo del NO (en el caso de la EC) y del anión superóxido (para ambos compuestos). Así, tanto la EC como la QC fueron eficaces en prevenir la disminución de la biodisponibilidad de NO en corazón, siendo los mecanismos implicados en su restablecimiento a valores controles los siguientes: i) un aumento de la actividad de NOS y de los niveles de fosforilación de eNOS en presencia de EC, ii) una disminución de la producción de anión superóxido dependiente de NADPH oxidasa, asociada a una menor expresión de la subunidad regulatoria p47^{phox} en presencia de EC y QC. En conjunto, dichos eventos conducen a un menor consumo de NO a través de su reacción con el anión superóxido y a un aumento de su biodisponibilidad en tejido cardíaco en este modelo experimental.

En el segundo modelo se indujo el aumento de la PA por administración de fructosa en el agua de bebida, que promueve alteraciones funcionales y metabólicas similares al síndrome metabólico en humanos. La fructosa se administró en el agua de bebida (10% p/v) por 8 semanas y a un grupo de ratas se les coadministró EC (0,2 g/kg de dieta). La administración de EC en la dieta fue eficaz para prevenir el aumento de la PA y del estrés oxidativo y mejorar parámetros metabólicos alterados por la sobrecarga de fructosa. Así, la EC fue eficaz para prevenir la disminución de la biodisponibilidad de NO en corazón, siendo los mecanismos implicados en su restablecimiento a valores controles los siguientes: i) el aumento de la actividad de

NOS sin modificación en la expresión de eNOS, pero con incremento en la fosforilación de eNOS en Ser1177 y ii) la prevención del estrés oxidativo como consecuencia de una menor producción de anión superóxido dependiente de NADPH oxidasa, asociado a una menor expresión de la subunidad reguladora p47^{phox} en presencia de EC. En conjunto, dichos eventos conducen a un menor consumo de NO a través de su reacción con el anión superóxido y a un aumento de su biodisponibilidad en tejido cardíaco en este modelo experimental.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los distintos estudios de esta tesis, se puede concluir que el efecto antihipertensivo de la EC y la QC involucra un conjunto de mecanismos alternativos a una acción antioxidante clásica. Podemos inferir que los flavonoides estudiados serían los responsables, al menos en parte, de los efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular y la hipertensión.

Los hallazgos descritos en esta tesis proporcionan nueva e importante información para diseñar dietas enriquecidas en dichos compuestos y/o realizar estudios de intervención dirigidos a la prevención y/o tratamiento de enfermedades metabólicas y crónicas no transmisibles en las cuales la biodisponibilidad de NO esté comprometida.

Referencias



REFERENCIAS

- Abo-Youssef, A. M. (2015). "Protective effect of rosiglitazone, quercetin, and their combination on fructose-induced metabolic syndrome in rats." *Indian J Pharmacol* **47**(6): 620-626.
- Actis-Goretta, L., A. Leveques, F. Giuffrida, F. Romanov-Michailidis, F. Viton, D. Barron, M. Duenas-Paton, S. Gonzalez-Manzano, C. Santos-Buelga, G. Williamson y F. Dionisi (2012). "Elucidation of (-)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans." *Free Radic Biol Med* **53**(4): 787-795.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." *Methods Enzymol* **105**: 121-126.
- Agency, E. C. (2012). "Chapter R.8: Characterisation of dose [concentration]-response for human health. Version 2.1." (Guidance on information requirements and chemical safety assessment).
- Akasaki, T., Y. Ohya, J. Kuroda, K. Eto, I. Abe, H. Sumimoto y M. Iida (2006). "Increased expression of gp91phox homologues of NAD(P)H oxidase in the aortic media during chronic hypertension: involvement of the renin-angiotensin system." *Hypertens Res* **29**(10): 813-820.
- Al-Awwadi, N. A., C. Araiz, A. Bornet, S. Delbosc, J. P. Cristol, N. Linck, J. Azay, P. L. Teissedre y G. Cros (2005). "Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats." *J Agric Food Chem* **53**(1): 151-157.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper y R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Almoosawi, S., L. Fyfe, C. Ho y E. Al-Dujaili (2010). "The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects." *Br J Nutr* **103**(6): 842-850.
- Allen, R. R., L. Carson, C. Kwik-Urbe, E. M. Evans y J. W. Erdman, Jr. (2008). "Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol." *J Nutr* **138**(4): 725-731.
- Andrew, P. J. y B. Mayer (1999). "Enzymatic function of nitric oxide synthases." *Cardiovasc Res* **43**(3): 521-531.
- Andrews, A. M., D. Jaron, D. G. Buerk, P. L. Kirby y K. A. Barbee (2010). "Direct, real-time measurement of shear stress-induced nitric oxide produced from endothelial cells in vitro." *Nitric Oxide* **23**(4): 335-342.

- Angeloni, C. y S. Hrelia (2012). "Quercetin reduces inflammatory responses in LPS-stimulated cardiomyoblasts." *Oxid Med Cell Longev* **2012**: 837104.
- Aoi, W., N. Niisato, H. Miyazaki y Y. Marunaka (2004). "Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat." *Biochem Biophys Res Commun* **315**(4): 892-896.
- Arnal, J. F., L. Warin y J. B. Michel (1992). "Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase." *J Clin Invest* **90**(2): 647-652.
- Asrih, M., F. Mach, A. Nencioni, F. Dallegri, A. Quercioli y F. Montecucco (2013). "Role of mitogen-activated protein kinase pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with metabolic syndrome." *Mediators Inflamm* **2013**: 367245.
- Awad, A. E., V. Kandalam, S. Chakrabarti, X. Wang, J. M. Penninger, S. T. Davidge, G. Y. Oudit y Z. Kassiri (2010). "Tumor necrosis factor induces matrix metalloproteinases in cardiomyocytes and cardiofibroblasts differentially via superoxide production in a PI3Kgamma-dependent manner." *Am J Physiol Cell Physiol* **298**(3): C679-692.
- Baba, S., Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Takizawa, T., Nakamura, T., Terao, J. (2000). "Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers." *Free Radic Res* **33**(5): 635-41.
- Bae, S. W., H. S. Kim, Y. N. Cha, Y. S. Park, S. A. Jo y I. Jo (2003). "Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun* **306**(4): 981-987.
- Bagul, P. K., N. Deepthi, R. Sultana y S. K. Banerjee (2015). "Resveratrol ameliorates cardiac oxidative stress in diabetes through deacetylation of NFkB-p65 and histone 3." *J Nutr Biochem* **26**(11): 1298-1307.
- Bahia, P. K., M. Rattray y R. J. Williams (2008). "Dietary flavonoid (-)epicatechin stimulates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent anti-oxidant response element activity and up-regulates glutathione in cortical astrocytes." *J Neurochem* **106**(5): 2194-2204.
- Barouch, L. A., R. W. Harrison, M. W. Skaf, G. O. Rosas, T. P. Cappola, Z. A. Kobeissi, I. A. Hobai, C. A. Lemmon, A. L. Burnett, B. O'Rourke, E. R. Rodriguez, P. L. Huang, J. A. Lima, D. E. Berkowitz y J. M. Hare (2002). "Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms." *Nature* **416**(6878): 337-339.

- Basu, A. y T. J. Lyons (2012). "Strawberries, blueberries, and cranberries in the metabolic syndrome: clinical perspectives." *J Agric Food Chem* **60**(23): 5687-5692.
- Baylis, C., B. Mitruka y A. Deng (1992). "Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage." *J Clin Invest* **90**(1): 278-281.
- Bazzano, L. A., J. He, L. G. Ogden, C. M. Loria, S. Vupputuri, L. Myers y P. K. Whelton (2002). "Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study." *Am J Clin Nutr* **76**(1): 93-99.
- Beck, K. F. E., W; Frank, S; Huwiler, A; Messmer, U.K.; Muhl, H.; Pfeilschifter, J. (1999). "Inducible NO synthase: role in cellular signalling." *J. Exp. Biol.* **202**: 645-653.
- Beecher, G. R. (2003). "Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake." *J Nutr* **133**(10): 3248S-3254S.
- Bendall, J. K., T. Damy, P. Ratajczak, X. Loyer, V. Monceau, I. Marty, P. Milliez, E. Robidel, F. Marotte, J. L. Samuel y C. Heymes (2004). "Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in beta-adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat." *Circulation* **110**(16): 2368-2375.
- Bernatova, I., O. Pechanova, P. Babal, S. Kysela, S. Stvrtina y R. Andriantsitohaina (2002). "Wine polyphenols improve cardiovascular remodeling and vascular function in NO-deficient hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**(3): H942-948.
- Bettaieb, A., M. A. Vazquez Prieto, C. Rodriguez Lanzi, R. M. Miatello, F. G. Haj, C. G. Fraga y P. I. Oteiza (2014). "(-)-Epicatechin mitigates high-fructose-associated insulin resistance by modulating redox signaling and endoplasmic reticulum stress." *Free Radic Biol Med* **72**: 247-256.
- Bharrhan, S., K. Chopra, S. K. Arora, J. S. Toor y P. Rishi (2012). "Down-regulation of NF-kappaB signalling by polyphenolic compounds prevents endotoxin-induced liver injury in a rat model." *Innate Immun* **18**(1): 70-79.
- Bian, K., M. F. Doursout y F. Murad (2008). "Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases." *J Clin Hypertens (Greenwich)* **10**(4): 304-310.
- Blanco-Ayala, T., A. C. Anderica-Romero y J. Pedraza-Chaverri (2014). "New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity." *Free Radic Res* **48**(6): 623-640.

- Bogdan, C. (2015). "Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update." *Trends Immunol* **36**(3): 161-178.
- Bors, W. H. W. M., C.; Saran M. (1990). "Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies." *Methods Enzymol*(186): 343-355.
- Bose, M., J. D. Lambert, J. Ju, K. R. Reuhl, S. A. Shapses y C. S. Yang (2008). "The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice." *J Nutr* **138**(9): 1677-1683.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bradley, J. M., K. N. Islam, D. J. Polhemus, E. Donnarumma, L. P. Brewster, Y. X. Tao, T. T. Goodchild y D. J. Lefer (2015). "Sustained release nitrite therapy results in myocardial protection in a porcine model of metabolic syndrome with peripheral vascular disease." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**(2): H305-317.
- Brandes, R. P., N. Weissmann y K. Schroder (2014a). "Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases." *J Mol Cell Cardiol* **73**: 70-79.
- Brandes, R. P., N. Weissmann y K. Schroder (2014b). "Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation." *Free Radic Biol Med* **76**: 208-226.
- Brown, A. L., J. Lane, J. Coverly, J. Stocks, S. Jackson, A. Stephen, L. Bluck, A. Coward y H. Hendrickx (2009). "Effects of dietary supplementation with the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on insulin resistance and associated metabolic risk factors: randomized controlled trial." *Br J Nutr* **101**(6): 886-894.
- Brown, D. I. y K. K. Griendling (2009). "Nox proteins in signal transduction." *Free Radic Biol Med* **47**(9): 1239-1253.
- Brull, V., C. Burak, B. Stoffel-Wagner, S. Wolfram, G. Nickenig, C. Muller, P. Langguth, B. Alteheld, R. Fimmers, S. Naaf, B. F. Zimmermann, P. Stehle y S. Egert (2015). "Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-)hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial." *Br J Nutr* **114**(8): 1263-1277.
- Brutsaert, D. L. (2003). "Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity." *Physiol Rev* **83**(1): 59-115.

- Buettner, G. R. (1993). "The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate." *Arch Biochem Biophys* **300**(2): 535-543.
- Buettner, G. R. y J. B. A. (1996) "Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid." Ed. M. Dekker. **New York**, 91-115.
- Buijsse, B., E. J. Feskens, F. J. Kok y D. Kromhout (2006). "Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study." *Arch Intern Med* **166**(4): 411-417.
- Buitrago-Lopez, A., J. Sanderson, L. Johnson, S. Warnakula, A. Wood, E. Di Angelantonio y O. H. Franco (2011). "Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis." *BMJ* **343**: d4488.
- Bunbupha, S., P. Prachaney, U. Kukongviriyapan, V. Kukongviriyapan, J. U. Welbat y P. Pakdeechote (2015). "Asiatic acid alleviates cardiovascular remodelling in rats with L-NAME-induced hypertension." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **42**(11): 1189-1197.
- Burgoyne, J. R., H. Mongue-Din, P. Eaton y A. M. Shah (2012). "Redox signaling in cardiac physiology and pathology." *Circ Res* **111**(8): 1091-1106.
- Burkard, N., A. G. Rokita, S. G. Kaufmann, M. Hallhuber, R. Wu, K. Hu, U. Hofmann, A. Bonz, S. Frantz, E. J. Cartwright, L. Neyses, L. S. Maier, S. K. Maier, T. Renne, K. Schuh y O. Ritter (2007). "Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility." *Circ Res* **100**(3): e32-44.
- Buys, E. S., M. J. Raheer, S. L. Blake, T. G. Neilan, A. R. Graveline, J. J. Passeri, M. Llano, T. M. Perez-Sanz, F. Ichinose, S. Janssens, W. M. Zapol, M. H. Picard, K. D. Bloch y M. Scherrer-Crosbie (2007). "Cardiomyocyte-restricted restoration of nitric oxide synthase 3 attenuates left ventricular remodeling after chronic pressure overload." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**(1): H620-627.
- Byrne, J. A., D. J. Grieve, J. K. Bendall, J. M. Li, C. Gove, J. D. Lambeth, A. C. Cave y A. M. Shah (2003). "Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy." *Circ Res* **93**(9): 802-805.
- Cardoso, A. M., C. C. Martins, S. Fiorin Fda, R. Schmatz, F. H. Abdalla, J. Gutierrez, D. Zanini, A. M. Fiorenza, N. Stefanello, J. D. Serres, F. Carvalho, V. P. Castro, C. M. Mazzanti, L. F. Royes, A. Bello-Klein, J. F. Goularte, V. M. Morsch, M. D. Bagatini y M. R. Schetinger (2013). "Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats." *Cell Biochem Funct* **31**(2): 136-151.

- Carnicer, R., M. J. Crabtree, V. Sivakumaran, B. Casadei y D. A. Kass (2013). "Nitric oxide synthases in heart failure." *Antioxid Redox Signal* **18**(9): 1078-1099.
- Castro, E. F., C. T. Mostarda, B. Rodrigues, I. C. Moraes-Silva, D. J. Feriani, K. De Angelis y M. C. Irigoyen (2015). "Exercise training prevents increased intraocular pressure and sympathetic vascular modulation in an experimental model of metabolic syndrome." *Braz J Med Biol Res* **48**(4): 332-338.
- Cave, A., D. Grieve, S. Johar, M. Zhang y A. M. Shah (2005). "NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**(1464): 2327-2334.
- Cifuentes-Gomez, T., A. Rodriguez-Mateos, I. Gonzalez-Salvador, M. E. Alanon y J. P. Spencer (2015). "Factors Affecting the Absorption, Metabolism, and Excretion of Cocoa Flavanols in Humans." *J Agric Food Chem* **63**(35): 7615-7623.
- Conti, F. F., O. Brito Jde, N. Bernardes, S. Dias Dda, I. C. Sanches, C. Malfitano, S. F. Llesuy, M. C. Irigoyen y K. De Angelis (2014). "Cardiovascular autonomic dysfunction and oxidative stress induced by fructose overload in an experimental model of hypertension and menopause." *BMC Cardiovasc Disord* **14**: 185.
- Cordero-Herrera, I., M. A. Martin, L. Goya y S. Ramos (2015). "Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress: relevance of MAPKs." *Mol Nutr Food Res* **59**(4): 597-609.
- Cosenzi, A., E. Bernobich, N. Plazzotta, P. Seculin y G. Bellini (1999). "Bosentan reduces blood pressure and the target-organ damage induced by a high-fructose diet in rats." *J Hypertens* **17**(12 Pt 2): 1843-1848.
- Costa, M. A., R. Elesgaray, C. Caniffi, A. Fellet, M. Mac Laughlin y C. Arranz (2010). "Role of nitric oxide as a key mediator on cardiovascular actions of atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**(3): H778-786.
- Costa, M. A., A. Loria, R. Elesgaray, A. M. Balaszczuk y C. Arranz (2004). "Role of nitric oxide pathway in hypotensive and renal effects of furosemide during extracellular volume expansion." *J Hypertens* **22**(8): 1561-1569.
- Cowley, A. W., Jr., C. Yang, N. N. Zheleznova, A. Staruschenko, T. Kurth, L. Rein, V. Kumar, K. Sadovnikov, A. Dayton, M. Hoffman, R. P. Ryan, M. M. Skelton, F. Salehpour, M. Ranji y A. Geurts (2016). "Evidence of the Importance of Nox4 in Production of Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats." *Hypertension* **67**(2): 440-450.

- Crews, W. D., Jr., D. W. Harrison y J. W. Wright (2008). "A double-blind, placebo-controlled, randomized trial of the effects of dark chocolate and cocoa on variables associated with neuropsychological functioning and cardiovascular health: clinical findings from a sample of healthy, cognitively intact older adults." *Am J Clin Nutr* **87**(4): 872-880.
- Cucoranu, I., R. Clempus, A. Dikalova, P. J. Phelan, S. Ariyan, S. Dikalov y D. Sorescu (2005). "NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts." *Circ Res* **97**(9): 900-907.
- Chang, W. T., Z. H. Shao, J. J. Yin, S. Mehendale, C. Z. Wang, Y. Qin, J. Li, W. J. Chen, C. T. Chien, L. B. Becker, T. L. Vanden Hoek y C. S. Yuan (2007). "Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes." *Eur J Pharmacol* **566**(1-3): 58-66.
- Chobanian, A. V. a, G. L. Bakris, H. R. Black, W. C. Cushman, L. A. Green, J. L. Izzo, Jr., D. W. Jones, B. J. Materson, S. Oparil, J. T. Wright, Jr. y E. J. Roccella (2003). "Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure." *Hypertension* **42**(6): 1206-1252.
- Chobanian, A. V. b, G. L. Bakris, H. R. Black, W. C. Cushman, L. A. Green, J. L. Izzo, Jr., D. W. Jones, B. J. Materson, S. Oparil, J. T. Wright, Jr. y E. J. Roccella (2003). "The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report." *JAMA* **289**(19): 2560-2572.
- Chong, M. F., R. Macdonald y J. A. Lovegrove (2010). "Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies." *Br J Nutr* **104 Suppl 3**: S28-39.
- Chung, S. W., S. G. Kang, J. S. Rho, H. N. Kim, I. S. Song, Y. A. Lee, S. J. Heo y S. W. Song (2013). "The Association between Oxidative Stress and Metabolic Syndrome in Adults." *Korean J Fam Med* **34**(6): 420-428.
- Damico, R., J. J. Zulueta y P. M. Hassoun (2012). "Pulmonary endothelial cell NOX." *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**(2): 129-139.
- Danson, E. J., J. K. Choate y D. J. Paterson (2005). "Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function." *Pharmacol Ther* **106**(1): 57-74.
- Davison, K., A. M. Coates, J. D. Buckley y P. R. Howe (2008). "Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects." *Int J Obes (Lond)* **32**(8): 1289-1296.
- De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone, Jr., W. S. Shin y J. K. Liao (1995). "Nitric oxide decreases cytokine-

- induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines." *J Clin Invest* **96**(1): 60-68.
- Delbosc, S., E. Paizanis, R. Magous, C. Araiz, T. Dimo, J. P. Cristol, G. Cros y J. Azay (2005). "Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat." *Atherosclerosis* **179**(1): 43-49.
- Desch, S., D. Kobler, J. Schmidt, M. Sonnabend, V. Adams, M. Sareban, I. Eitel, M. Bluher, G. Schuler y H. Thiele (2010). "Low vs. higher-dose dark chocolate and blood pressure in cardiovascular high-risk patients." *Am J Hypertens* **23**(6): 694-700.
- Desideri, G., C. Kwik-Uribe, D. Grassi, S. Necozone, L. Ghiadoni, D. Mastroiacovo, A. Raffaele, L. Ferri, R. Bocale, M. C. Lechiara, C. Marini y C. Ferri (2012). "Benefits in cognitive function, blood pressure, and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) study." *Hypertension* **60**(3): 794-801.
- Dikalov, S. I., A. E. Dikalova, A. T. Bikineyeva, H. H. Schmidt, D. G. Harrison y K. K. Griendling (2008). "Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production." *Free Radic Biol Med* **45**(9): 1340-1351.
- Dikalov, S. I., R. R. Nazarewicz, A. Bikineyeva, L. Hilenski, B. Lassegue, K. K. Griendling, D. G. Harrison y A. E. Dikalova (2014). "Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension." *Antioxid Redox Signal* **20**(2): 281-294.
- Dikalova, A. E., M. C. Gongora, D. G. Harrison, J. D. Lambeth, S. Dikalov y K. K. Griendling (2010). "Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**(3): H673-679.
- Dinauer, M. C. (2014). "Disorders of neutrophil function: an overview." *Methods Mol Biol* **1124**: 501-515.
- Dornas, W. C. y M. E. Silva (2011). "Animal models for the study of arterial hypertension." *J Biosci* **36**(4): 731-737.
- Dower, J. I. a, J.M. Geleijnse, L. Gijbbers, C. Schalkwijk, D. Kromhout y P.C. Hollman (2015). "Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in

- (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial." *J Nutr* **145**(7): 1459-1463.
- Dower, J. I. b, J. M. Geleijnse, L. Gijsbers, P. L. Zock, D. Kromhout y P. C. Hollman (2015). "Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial." *Am J Clin Nutr* **101**(5): 914-921.
- Drummond, G. R., S. Selemidis, K. K. Griendling y C. G. Sobey (2011). "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets." *Nat Rev Drug Discov* **10**(6): 453-471.
- Drummond, G. R. y C. G. Sobey (2014). "Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?" *Trends Endocrinol Metab* **25**(9): 452-463.
- Duarte, J., M. Galisteo, M. A. Ocete, F. Perez-Vizcaino, A. Zarzuelo y J. Tamargo (2001a). "Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats." *Mol Cell Biochem* **221**(1-2): 155-160.
- Duarte, J., R. Perez-Palencia, F. Vargas, M. A. Ocete, F. Perez-Vizcaino, A. Zarzuelo y J. Tamargo (2001b). "Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats." *Br J Pharmacol* **133**(1): 117-124.
- Duarte, J., R. Jimenez, F. O'Valle, M. Galisteo, R. Perez-Palencia, F. Vargas, F. Perez-Vizcaino, A. Zarzuelo y J. Tamargo (2002). "Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats." *J Hypertens* **20**(9): 1843-1854.
- Edwards, R. L., T. Lyon, S. E. Litwin, A. Rabovsky, J. D. Symons y T. Jalili (2007). "Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects." *J Nutr* **137**(11): 2405-2411.
- Egert, S., C. Boesch-Saadatmandi, S. Wolfram, G. Rimbach y M. J. Muller (2010). "Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype." *J Nutr* **140**(2): 278-284.
- Egert, S., A. Bosy-Westphal, J. Seiberl, C. Kurbitz, U. Settler, S. Plachta-Danielzik, A. E. Wagner, J. Frank, J. Schrezenmeir, G. Rimbach, S. Wolfram y M. J. Muller (2009). "Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study." *Br J Nutr* **102**(7): 1065-1074.
- Eisner, D. A., H. S. Choi, M. E. Diaz, S. C. O'Neill y A. W. Trafford (2000). "Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle." *Circ Res* **87**(12): 1087-1094.
- Elfering, S. L., T. M. Sarkela y C. Giulivi (2002). "Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem* **277**(41): 38079-38086.

- Ellinger, S., A. Reusch, P. Stehle y H. P. Helfrich (2012). "Epicatechin ingested via cocoa products reduces blood pressure in humans: a nonlinear regression model with a Bayesian approach." *Am J Clin Nutr* **95**(6): 1365-1377.
- Erben-Russ, M., W. Bors y M. Saran (1987). "Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study." *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **52**(3): 393-412.
- Erlejman, A. G., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2006). "Procyanidins protect Caco-2 cells from bile acid- and oxidant-induced damage." *Free Radic Biol Med* **41**(8): 1247-56.
- Erlejman, A. G., Jaggers, G., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2008). "TNF α -induced NF- κ B activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells." *Arch Biochem Biophys* **476**(2): 186-95.
- Erlund (2004). "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology." *Nutr. Res.* **24**: 851-874.
- European Society of Hypertension Guidelines (2003). "2003 European Society of Hypertension-European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension." *J Hypertens* **21**(6): 1011-1053.
- Fantini, M., M. Benvenuto, L. Masuelli, G. V. Frajese, I. Tresoldi, A. Modesti y R. Bei (2015). "In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment." *Int J Mol Sci* **16**(5): 9236-9282.
- Faridi, Z., V. Y. Njike, S. Dutta, A. Ali y D. L. Katz (2008). "Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial." *Am J Clin Nutr* **88**(1): 58-63.
- Ferdinandy, P., H. Danial, I. Ambrus, R. A. Rothery y R. Schulz (2000). "Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure." *Circ Res* **87**(3): 241-247.
- Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T. W. Smith, R. A. Kelly y T. Michel (1996). "Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells." *J Biol Chem* **271**(37): 22810-22814.
- Ferrer-Sueta, G. y R. Radi (2009). "Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals." *ACS Chem Biol* **4**(3): 161-177.
- Fogli-Cawley, J. J., J. T. Dwyer, E. Saltzman, M. L. McCullough, L. M. Troy, J. B. Meigs y P. F. Jacques (2007). "The 2005 Dietary Guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome." *Am J Clin Nutr* **86**(4): 1193-1201.

- Forstermann, U. (2010). "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease." *Pflügers Arch* **459**(6): 923-939.
- Forstermann, U. y W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." *Eur Heart J* **33**(7): 829-837, 837a-837d.
- Fraga, C. G., L. Actis-Goretti, J. I. Ottaviani, F. Carrasquedo, S. B. Lotito, S. Lazarus, H. H. Schmitz y C. L. Keen (2005a). "Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players." *Clin Dev Immunol* **12**(1): 11-17.
- Fraga, C. G. (2005b). "Cocoa, diabetes, and hypertension: should we eat more chocolate?" *Am J Clin Nutr* **81**(3): 541-542.
- Fraga, C. G. (2007). "Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions." *IUBMB Life* **59**(4-5): 308-315.
- Fraga, C. G. (2009). "Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology." Publisher: John Wiley and sons, Inc.: 593 pages.
- Fraga, C. G., M. Galleano, S. V. Verstraeten y P. I. Oteiza (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." *Mol Aspects Med* **31**(6): 435-445.
- Fraga, C. G., M. C. Litterio, P. D. Prince, V. Calabro, B. Piotrkowski y M. Galleano (2011). "Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure." *J Clin Biochem Nutr* **48**(1): 63-67.
- Frei, B. y J. V. Higdon (2003). "Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies." *J Nutr* **133**(10): 3275S-3284S.
- Fridovich, I. (1983). "Superoxide radical: an endogenous toxicant." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **23**: 239-257.
- Fulton, D., J. E. Church, L. Ruan, C. Li, S. G. Sood, B. E. Kemp, I. G. Jennings y R. C. Venema (2005). "Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83." *J Biol Chem* **280**(43): 35943-35952.
- Furchgott, R. F. y P. M. Vanhoutte (1989). "Endothelium-derived relaxing and contracting factors." *FASEB J* **3**(9): 2007-2018.
- Galisteo, M., M. F. Garcia-Saura, R. Jimenez, I. C. Villar, A. Zarzuelo, F. Vargas y J. Duarte (2004). "Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats." *Mol Cell Biochem* **259**(1-2): 91-99.
- Galleano, M., I. Bernatova, A. Puzserova, P. Balis, N. Sestakova, O. Pechanova y C. G. Fraga (2013). "(-)-Epicatechin reduces blood pressure and improves vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats by NO-mediated mechanism." *IUBMB Life* **65**(8): 710-715.

- Galleano, M., V. Calabro, P. D. Prince, M. C. Litterio, B. Piotrkowski, M. A. Vazquez-Prieto, R. M. Miatello, P. I. Oteiza y C. G. Fraga (2012). "Flavonoids and metabolic syndrome." *Ann N Y Acad Sci* **1259**: 87-94.
- Galleano, M. a, O. Pechanova y C. G. Fraga (2010). "Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols." *Curr Pharm Biotechnol* **11**(8): 837-848.
- Galleano, M. b, S. V. Verstraeten, P. I. Oteiza y C. G. Fraga (2010). "Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis." *Arch Biochem Biophys* **501**(1): 23-30.
- Gao, H., C. Chen, S. Huang y B. Li (2012). "Quercetin attenuates the progression of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." *J Biomed Res* **26**(2): 98-102.
- Garcia-Saura, M. F., M. Galisteo, I. C. Villar, A. Bermejo, A. Zarzuelo, F. Vargas y J. Duarte (2005). "Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension." *Mol Cell Biochem* **270**(1-2): 147-155.
- Geiszt, M., J. B. Kopp, P. Varnai y T. L. Leto (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 8010-8014.
- Girard, A., S. Madani, F. Boukourt, M. Cherkaoui-Malki, J. Belleville y J. Prost (2006). "Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats." *Nutrition* **22**(7-8): 758-766.
- Girard, A., S. Madani, E. S. El Boustani, J. Belleville y J. Prost (2005). "Changes in lipid metabolism and antioxidant defense status in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats fed a diet enriched with fructose and saturated fatty acids." *Nutrition* **21**(2): 240-248.
- Godecke, A., T. Heinicke, A. Kamkin, I. Kiseleva, R. H. Strasser, U. K. Decking, T. Stumpe, G. Isenberg y J. Schrader (2001). "Inotropic response to beta-adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts." *J Physiol* **532**(Pt 1): 195-204.
- Gokulakrisnan, A., B. Jayachandran Dare y C. Thirunavukkarasu (2011). "Attenuation of the cardiac inflammatory changes and lipid anomalies by (-)-epigallocatechin-gallate in cigarette smoke-exposed rats." *Mol Cell Biochem* **354**(1-2): 1-10.
- Gomez-Guzman, M., R. Jimenez, M. Sanchez, M. Romero, F. O'Valle, R. Lopez-Sepulveda, A. M. Quintela, P. Galindo, M. J. Zarzuelo, E. Bailon, E. Delpon, F. Perez-Vizcaino y J. Duarte (2011). "Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats." *Br J Nutr* **106**(9): 1337-1348.

- Gomez-Guzman, M., R. Jimenez, M. Sanchez, M. J. Zarzuelo, P. Galindo, A. M. Quintela, R. Lopez-Sepulveda, M. Romero, J. Tamargo, F. Vargas, F. Perez-Vizcaino y J. Duarte (2012). "Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension." *Free Radic Biol Med* **52**(1): 70-79.
- Gorlach, A., R. P. Brandes, K. Nguyen, M. Amidi, F. Dehghani y R. Busse (2000). "A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall." *Circ Res* **87**(1): 26-32.
- Grassi, D., A. Aggio, L. Onori, G. Croce, S. Tiberti, C. Ferri, L. Ferri y G. Desideri (2008a). "Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity." *J Nutr* **138**(8): 1554S-1560S.
- Grassi, D., G. Desideri, S. Necozione, C. Lippi, R. Casale, G. Properzi, J. B. Blumberg y C. Ferri (2008b). "Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate." *J Nutr* **138**(9): 1671-1676.
- Grassi, D. a, C. Lippi, S. Necozione, G. Desideri y C. Ferri (2005). "Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons." *Am J Clin Nutr* **81**(3): 611-614.
- Grassi, D. b, S. Necozione, C. Lippi, G. Croce, L. Valeri, P. Pasqualetti, G. Desideri, J. B. Blumberg y C. Ferri (2005). "Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives." *Hypertension* **46**(2): 398-405.
- Griendling, K. K., D. Sorescu y M. Ushio-Fukai (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." *Circ Res* **86**(5): 494-501.
- Grossman, E. (2008). "Does increased oxidative stress cause hypertension?" *Diabetes Care* **2**: S185-189.
- Gunzler, W. A., H. Kremers y L. Flohe (1974). "An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood." *Z Klin Chem Klin Biochem* **12**(10): 444-448.
- Gutierrez-Salmean, G., P. Ortiz-Vilchis, C. M. Vacaseydel, L. Garduno-Siciliano, G. Chamorro-Cevallos, E. Meaney, S. Villafana, F. Villarreal, G. Ceballos y I. Ramirez-Sanchez (2014). "Effects of (-)-epicatechin on a diet-induced rat model of cardiometabolic risk factors." *Eur J Pharmacol* **728**: 24-30.

- Gutteridge, J. M. y B. Halliwell (1989). "Iron toxicity and oxygen radicals." *Baillieres Clin Haematol* **2**(2): 195-256.
- Gyurko, R., P. Kuhlencordt, M. C. Fishman y P. L. Huang (2000). "Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**(3): H971-981.
- Hafstad, A. D., A. A. Nabeebaccus y A. M. Shah (2013). "Novel aspects of ROS signalling in heart failure." *Basic Res Cardiol* **108**(4): 359.
- Halliwell, B. (1989a). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." *Br J Exp Pathol* **70**(6): 737-757.
- Halliwell, B. y J. M. Gutteridge (1989b). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York, Oxford University Press.
- Halliwell, B., J. Rafter y A. Jenner (2005). "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?" *Am J Clin Nutr* **81**(1 Suppl): 268S-276S.
- Halliwell, B. (2007a). "Biochemistry of oxidative stress." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1147-1150.
- Halliwell, B. (2007b). "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" *Biochem J* **401**(1): 1-11.
- Hamilton, C. A., M. J. Brosnan, S. Al-Benna, G. Berg y A. F. Dominiczak (2002). "NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels." *Hypertension* **40**(5): 755-762.
- Harborne, J. B. y C. A. Williams (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**(6): 481-504.
- Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacol Ther* **96**(2-3): 67-202.
- Heinrich, T. A., R. S. da Silva, K. M. Miranda, C. H. Switzer, D. A. Wink y J. M. Fukuto (2013). "Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology." *Br J Pharmacol* **169**(7): 1417-1429.
- Heiss, C., A. Dejam, P. Kleinbongard, T. Schewe, H. Sies y M. Kelm (2003). "Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols." *JAMA* **290**(8): 1030-1031.
- Heiss, C., H. Schroeter, J. Balzer, P. Kleinbongard, S. Matern, H. Sies y M. Kelm (2006). "Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols." *J Cardiovasc Pharmacol* **47** **Suppl 2**: S128-135; discussion S172-126.
- Herrera, M. y J. L. Garvin (2005). "Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney." *Hypertension* **45**(6): 1062-1067.

- Hodgson, J. M., I. B. Puddey, V. Burke, L. J. Beilin y N. Jordan (1999). "Effects on blood pressure of drinking green and black tea." *J Hypertens* **17**(4): 457-463.
- Hodgson, J. M., I. B. Puddey, V. Burke, G. F. Watts y L. J. Beilin (2002). "Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function." *Clin Sci (Lond)* **102**(2): 195-201.
- Holt, R. R., S. A. Lazarus, M. C. Sullards, Q. Y. Zhu, D. D. Schramm, J. F. Hammerstone, C. G. Fraga, H. H. Schmitz y C. L. Keen (2002). "Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa." *Am J Clin Nutr* **76**(4): 798-804.
- Hollman, P. C. H. (2004). "Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids." *Pharmaceutical Biology* **42**: 74-83.
- Hooper, L., C. Kay, A. Abdelhamid, P. A. Kroon, J. S. Cohn, E. B. Rimm y A. Cassidy (2012). "Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials." *Am J Clin Nutr* **95**(3): 740-751.
- Hordijk, P. L. (2006). "Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins." *Circ Res* **98**(4): 453-462.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein y M. S. Brown (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." *J Clin Invest* **109**(9): 1125-1131.
- Houée-Lévi, C., Bobrowski, K., Horakova, L., Karademir, B., Schoneich, C., Davies, M. J., Spickett, C. M. (2015). "Exploring oxidative modifications of tyrosine: an update on mechanisms of formation, advances in analysis and biological consequences." *Free Radic Res* **49**(4): 347-73.
- Huang, H. C. y J. K. Lin (2012). "Pu-erh tea, green tea, and black tea suppresses hyperlipidemia, hyperleptinemia and fatty acid synthase through activating AMPK in rats fed a high-fructose diet." *Food Funct* **3**(2): 170-177.
- Huang, L. L., C. Pan, L. Wang, L. Ding, K. Guo, H. Z. Wang, A. M. Xu y S. Gao (2015). "Protective effects of grape seed proanthocyanidins on cardiovascular remodeling in DOCA-salt hypertension rats." *J Nutr Biochem* **26**(8): 841-849.
- Huggins, C. E., A. A. Domenighetti, M. E. Ritchie, N. Khalil, J. M. Favaloro, J. Proietto, G. K. Smyth, S. Pepe y L. M. Delbridge (2008). "Functional and metabolic remodelling in GLUT4-deficient hearts confers hyper-responsiveness to substrate intervention." *J Mol Cell Cardiol* **44**(2): 270-280.
- Hughes, M. N. (2008). "Chemistry of nitric oxide and related species." *Methods Enzymol* **436**: 3-19.

- Huie, R. E., Padmaja, S. (1993). "The reaction of NO with superoxide." *Free Radic Res Commun* **18**(4): 195-9.
- Huisman, A., A. Van De Wiel, T. J. Rabelink y E. E. Van Faassen (2004). "Wine polyphenols and ethanol do not significantly scavenge superoxide nor affect endothelial nitric oxide production." *J Nutr Biochem* **15**(7): 426-432.
- Hung, H. C., K. J. Joshipura, R. Jiang, F. B. Hu, D. Hunter, S. A. Smith-Warner, G. A. Colditz, B. Rosner, D. Spiegelman y W. C. Willett (2004). "Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease." *J Natl Cancer Inst* **96**(21): 1577-1584.
- Husain, K. y S. R. Hazelrigg (2002). "Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: effect of regular exercise on the heart." *Biochim Biophys Acta* **1587**(1): 75-82.
- Hyakukoku, M., K. Higashiura, N. Ura, H. Murakami, K. Yamaguchi, L. Wang, M. Furuhashi, N. Togashi y K. Shimamoto (2003). "Tissue-specific impairment of insulin signaling in vasculature and skeletal muscle of fructose-fed rats." *Hypertens Res* **26**(2): 169-176.
- Ignarro, L. J. (1990). "Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication." *Hypertension* **16**(5): 477-483.
- Ignarro, L. J. (1999). "Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology." *Biosci Rep* **19**(2): 51-71.
- Ignarro, L. J., J. B. Adams, P. M. Horwitz y K. S. Wood (1986). "Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms." *J Biol Chem* **261**(11): 4997-5002.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns y G. Chaudhuri (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9265-9269.
- Ihm, S. H., J. O. Lee, S. J. Kim, K. B. Seung, V. B. Schini-Kerth, K. Chang y M. H. Oak (2009). "Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression." *Atherosclerosis* **206**(1): 47-53.
- Iqbal, R., S. Anand, S. Ounpuu, S. Islam, X. Zhang, S. Rangarajan, J. Chifamba, A. Al-Hinai, M. Keltai y S. Yusuf (2008). "Dietary patterns and the risk of acute myocardial infarction in 52 countries: results of the INTERHEART study." *Circulation* **118**(19): 1929-1937.
- Jimenez, R., R. Lopez-Sepulveda, M. Kadmiri, M. Romero, R. Vera, M. Sanchez, F. Vargas, F. O'Valle, A. Zarzuelo, M. Duenas, C. Santos-Buelga y J. Duarte

- (2007). "Polyphenols restore endothelial function in DOCA-salt hypertension: role of endothelin-1 and NADPH oxidase." *Free Radic Biol Med* **43**(3): 462-473.
- Jones, S. A., V. B. O'Donnell, J. D. Wood, J. P. Broughton, E. J. Hughes y O. T. Jones (1996). "Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells." *Am J Physiol* **271**(4 Pt 2): H1626-1634.
- Jovanovic, S. V. y M. G. Simic (2000). "Antioxidants in nutrition." *Ann N Y Acad Sci* **899**: 326-334.
- Kalyanaraman, B. (2013). "Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms." *Redox Biol* **1**: 244-257.
- Kamata, K. y K. Yamashita (1999). "Insulin resistance and impaired endothelium-dependent renal vasodilatation in fructose-fed hypertensive rats." *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **103**(2): 195-210.
- Kamide, K., H. Rakugi, J. Higaki, A. Okamura, M. Nagai, K. Moriguchi, M. Ohishi, N. Satoh, M. L. Tuck y T. Ogihara (2002). "The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats." *Am J Hypertens* **15**(1 Pt 1): 66-71.
- Kashiwagi, M., M. Shinozaki, H. Hirakata, K. Tamaki, T. Hirano, M. Tokumoto, H. Goto, S. Okuda y M. Fujishima (2000). "Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats." *J Am Soc Nephrol* **11**(4): 616-624.
- Kelley, G. L., G. Allan y S. Azhar (2004). "High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation." *Endocrinology* **145**(2): 548-555.
- Kesse-Guyot, E., L. Fezeu, P. Galan, S. Hercberg, S. Czernichow y K. Castetbon (2011). "Adherence to French nutritional guidelines is associated with lower risk of metabolic syndrome." *J Nutr* **141**(6): 1134-1139.
- Klatt, P., K. Schmidt, F. Brunner y B. Mayer (1994). "Inhibitors of brain nitric oxide synthase. Binding kinetics, metabolism, and enzyme inactivation." *J Biol Chem* **269**(3): 1674-1680.
- Kolluru, G. K., S. Sinha, S. Majumder, A. Muley, J. H. Siamwala, R. Gupta y S. Chatterjee (2010). "Shear stress promotes nitric oxide production in endothelial cells by sub-cellular delocalization of eNOS: A basis for shear stress mediated angiogenesis." *Nitric Oxide* **22**(4): 304-315.

- Landmesser, U., H. Cai, S. Dikalov, L. McCann, J. Hwang, H. Jo, S. M. Holland y D. G. Harrison (2002). "Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II." *Hypertension* **40**(4): 511-515.
- Landmesser, U., S. Dikalov, S. R. Price, L. McCann, T. Fukai, S. M. Holland, W. E. Mitch y D. G. Harrison (2003). "Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension." *J Clin Invest* **111**(8): 1201-1209.
- Lassegue, B. (2007). "How does the chloride/proton antiporter ClC-3 control NADPH oxidase?" *Circ Res* **101**(7): 648-650.
- Lassegue, B., A. San Martin y K. K. Griendling (2012). "Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system." *Circ Res* **110**(10): 1364-1390.
- Layland, J., J. M. Li y A. M. Shah (2002). "Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes." *J Physiol* **540**(Pt 2): 457-467.
- Le, K. A. y L. Tappy (2006). "Metabolic effects of fructose." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**(4): 469-475.
- Lehnen, A. M., B. Rodrigues, M. C. Irigoyen, K. De Angelis y B. D. Schaan (2013). "Cardiovascular changes in animal models of metabolic syndrome." *J Diabetes Res* **2013**: 761314.
- Leibowitz, A., A. Rehman, P. Paradis y E. L. Schiffrin (2013). "Role of T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of high-fructose diet-induced metabolic syndrome." *Hypertension* **61**(6): 1316-1321.
- Li, H., C. Burkhardt, U. R. Heinrich, I. Brausch, N. Xia y U. Forstermann (2003). "Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells." *Circulation* **107**(18): 2348-2354.
- Li, J., J. Zhang, X. Dong, H. Deng y F. Yang (2015). "[Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced cardiac injury in mice]." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **35**(7): 1068-1072.
- Li, P. G., L. Sun, X. Han, S. Ling, W. T. Gan y J. W. Xu (2012). "Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism." *Pharmacology* **89**(3-4): 220-228.
- Li, X., N. Udagawa, K. Itoh, K. Suda, Y. Murase, T. Nishihara, T. Suda y N. Takahashi (2002). "p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function." *Endocrinology* **143**(8): 3105-3113.

- Litterio, M. C. a, M. A. Vazquez Prieto, A. M. Adamo, R. Elesgaray, P. I. Oteiza, M. Galleano y C. G. Fraga (2015). "(-)-Epicatechin reduces blood pressure increase in high-fructose-fed rats: effects on the determinants of nitric oxide bioavailability." *J Nutr Biochem* **26**(7): 745-751.
- Litterio, M. C. b (2015). *Acción de flavanoles sobre la función vascular: óxido nítrico y mecanismos antioxidantes* (Tesis doctoral), Universidad de Buenos Aires.
- Litterio, M. C., G. Jagers, G. Sagdicoglu Celep, A. M. Adamo, M. A. Costa, P. I. Oteiza, C. G. Fraga y M. Galleano (2012). "Blood pressure-lowering effect of dietary (-)-epicatechin administration in L-NAME-treated rats is associated with restored nitric oxide levels." *Free Radic Biol Med* **53**(10): 1894-1902.
- Liu, H., X. Guo, Y. Chu y S. Lu (2014). "Heart protective effects and mechanism of quercetin preconditioning on anti-myocardial ischemia reperfusion (IR) injuries in rats." *Gene* **545**(1): 149-155.
- Liu, R. H. (2004). "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action." *J Nutr* **134**(12 Suppl): 3479S-3485S.
- Liu, V. W. y P. L. Huang (2008). "Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice." *Cardiovasc Res* **77**(1): 19-29.
- Liu, Y. H., O. A. Carretero, O. H. Cingolani, T. D. Liao, Y. Sun, J. Xu, L. Y. Li, P. J. Pagano, J. J. Yang y X. P. Yang (2005). "Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**(6): H2616-2623.
- Lobysheva, I., G. Rath, B. Sekkali, C. Bouzin, O. Feron, B. Gallez, C. Dessy y J. L. Balligand (2011). "Moderate caveolin-1 downregulation prevents NADPH oxidase-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling by angiotensin II in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(9): 2098-2105.
- Loot, A. E., J. G. Schreiber, B. Fisslthaler y I. Fleming (2009). "Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase." *J Exp Med* **206**(13): 2889-2896.
- Lopez-Sepulveda, R., R. Jimenez, M. Romero, M. J. Zarzuelo, M. Sanchez, M. Gomez-Guzman, F. Vargas, F. O'Valle, A. Zarzuelo, F. Perez-Vizcaino y J. Duarte (2008). "Wine polyphenols improve endothelial function in large vessels of female spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* **51**(4): 1088-1095.
- Lorenz, M., L. Klinkner, G. Baumann, K. Stangl y V. Stangl (2015). "Endothelial NO Production Is Mandatory for Epigallocatechin-3-Gallate-induced Vasodilation:

- Results From eNOS Knockout (eNOS^{-/-}) Mice." *J Cardiovasc Pharmacol* **65**(6): 607-610.
- Lotito, S. B. y C. G. Fraga (1998). "(+)-Catechin prevents human plasma oxidation." *Free Radic Biol Med* **24**(3): 435-441.
- Lou, P. H., E. Lucchinetti, L. Zhang, A. Affolter, M. Gandhi, M. Hersberger, B. E. Warren, H. Lemieux, H. F. Sobhi, A. S. Clanachan y M. Zaugg (2014). "Loss of Intralipid(R)- but not sevoflurane-mediated cardioprotection in early type-2 diabetic hearts of fructose-fed rats: importance of ROS signaling." *PLoS One* **9**(8): e104971.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Lubrano, C., G. Valacchi, P. Specchia, L. Gnessi, E. P. Rubanenko, E. A. Shuginina, A. I. Trukhanov, L. G. Korkina y C. De Luca (2015). "Integrated Haematological Profiles of Redox Status, Lipid, and Inflammatory Protein Biomarkers in Benign Obesity and Unhealthy Obesity with Metabolic Syndrome." *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 490613.
- Lucesoli, F. y C. G. Fraga (1995). "Oxidative damage to lipids and DNA concurrent with decrease of antioxidants in rat testes after acute iron intoxication." *Arch Biochem Biophys* **316**(1): 567-571.
- Mackenzie, G. G., Carrasquedo, F., Delfino, J. M., Keen, C. L., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2004). "Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells." *Faseb J* **18**(1) 167-9.
- Mackraj, I., T. Govender y S. Ramesar (2008). "The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension." *J Cardiovasc Pharmacol* **51**(3): 239-245.
- Machlin, L. J. y A. Bendich (1987). "Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients." *FASEB J* **1**(6): 441-445.
- Maejima, Y., J. Kuroda, S. Matsushima, T. Ago y J. Sadoshima (2011). "Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase." *J Mol Cell Cardiol* **50**(3): 408-416.
- Mahmood, D. F., A. Abderrazak, K. El Hadri, T. Simmet y M. Rouis (2013). "The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease." *Antioxid Redox Signal* **19**(11): 1266-1303.
- Malik, V. S. y F. B. Hu (2015). "Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us." *J Am Coll Cardiol* **66**(14): 1615-1624.

- Mao, W., Y. Song, C. Han y N. Li (2008). "[Molecular mechanism by which green tea and tea extract inhibits left ventricle hypertrophy induced by renovascular hypertension in rats]." *Wei Sheng Yan Jiu* **37**(1): 43-46.
- Martin, W., R. F. Furchgott, G. M. Villani y D. Jothianandan (1986). "Phosphodiesterase inhibitors induce endothelium-dependent relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released endothelium-derived relaxing factor." *J Pharmacol Exp Ther* **237**(2): 539-547.
- Martinez, F. J., R. A. Rizza y J. C. Romero (1994). "High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs." *Hypertension* **23**(4): 456-463.
- Marzocchella, L., M. Fantini, M. Benvenuto, L. Masuelli, I. Tresoldi, A. Modesti y R. Bei (2011). "Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents." *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **5**(3): 200-220.
- Masella, R., R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi y C. Giovannini (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." *J Nutr Biochem* **16**(10): 577-586.
- Massion, P. B., C. Dessy, F. Desjardins, M. Pelat, X. Havaux, C. Belge, P. Moulin, Y. Guiot, O. Feron, S. Janssens y J. L. Balligand (2004). "Cardiomyocyte-restricted overexpression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) attenuates beta-adrenergic stimulation and reinforces vagal inhibition of cardiac contraction." *Circulation* **110**(17): 2666-2672.
- Massion, P. B., O. Feron, C. Dessy y J. L. Balligand (2003). "Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing." *Circ Res* **93**(5): 388-398.
- Mastroiacovo, D., C. Kwik-Urbe, D. Grassi, S. Necozone, A. Raffaele, L. Pistacchio, R. Righetti, R. Bocale, M. C. Lechiara, C. Marini, C. Ferri y G. Desideri (2015). "Cocoa flavanol consumption improves cognitive function, blood pressure control, and metabolic profile in elderly subjects: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) Study--a randomized controlled trial." *Am J Clin Nutr* **101**(3): 538-548.
- Matsuyama, T., Y. Tanaka, I. Kamimaki, T. Nagao y I. Tokimitsu (2008). "Catechin safely improved higher levels of fatness, blood pressure, and cholesterol in children." *Obesity (Silver Spring)* **16**(6): 1338-1348.
- Mayer, R. D., X. Wang y M. D. Maines (2003). "Nitric oxide inhibitor N omega -nitro-l-arginine methyl ester potentiates induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: a novel mechanism for regulation of the oxygenase." *J Pharmacol Exp Ther* **306**(1): 43-50.

- Medeiros, R. F., T. G. Gaique, T. Bento-Bernardes, N. A. Motta, F. C. Brito, C. Fernandes-Santos, C. Castro-Pinheiro, K. J. Oliveira y A. C. Nobrega (2016). "Aerobic training prevents oxidative profile, improves nitric oxide and vascular reactivity in rats with cardiometabolic alteration." *J Appl Physiol* (1985): jap 00369 02015.
- Mennen, L. I., D. Sapinho, A. de Bree, N. Arnault, S. Bertrais, P. Galan y S. Hercberg (2004). "Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women." *J Nutr* **134**(4): 923-926.
- Mervaala, E. M., Z. J. Cheng, I. Tikkanen, R. Lapatto, K. Nurminen, H. Vapaatalo, D. N. Muller, A. Fiebeler, U. Ganten, D. Ganten y F. C. Luft (2001). "Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes." *Hypertension* **37**(2 Pt 2): 414-418.
- Miatello, R., N. Risler, C. Castro, S. Gonzalez, M. Ruttler y M. Cruzado (2001). "Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats." *Am J Hypertens* **14**(11 Pt 1): 1135-1141.
- Miatello, R., M. Vazquez, N. Renna, M. Cruzado, A. P. Zumino y N. Risler (2005). "Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats." *Am J Hypertens* **18**(6): 864-870.
- Michell, B. J., M. B. Harris, Z. P. Chen, H. Ju, V. J. Venema, M. A. Blackstone, W. Huang, R. C. Venema y B. E. Kemp (2002). "Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635." *J Biol Chem* **277**(44): 42344-42351.
- 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**(4): 673-751.
- Mishra, P. K., S. Givvimani, V. Chavali y S. C. Tyagi (2013). "Cardiac matrix: a clue for future therapy." *Biochim Biophys Acta* **1832**(12): 2271-2276.
- Misra, H. P. y I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." *J Biol Chem* **247**(10): 3170-3175.
- Mladenka, P., L. Zatloukalova, T. Filipsky y R. Hrdina (2010). "Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity." *Free Radic Biol Med* **49**(6): 963-975.
- Mondillo, C., R. M. Pagotto, B. Piotrkowski, C. G. Reche, Z. J. Patrignani, C. B. Cymeryng y O. P. Pignataro (2009). "Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis

- via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats." *Biol Reprod* **80**(1): 144-152.
- Montenegro, M. F., E. M. Neto-Neves, C. A. Dias-Junior, C. S. Ceron, M. M. Castro, V. A. Gomes, A. Kanashiro y J. E. Tanus-Santos (2010). "Quercetin restores plasma nitrite and nitroso species levels in renovascular hypertension." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **382**(4): 293-301.
- Montezano, A. C., M. Dulak-Lis, S. Tsiropoulou, A. Harvey, A. M. Briones y R. M. Touyz (2015). "Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies." *Can J Cardiol* **31**(5): 631-641.
- Moore, P. K., A. O. Oluyomi, R. C. Babbedge, P. Wallace y S. L. Hart (1991). "L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse." *Br J Pharmacol* **102**(1): 198-202.
- Mulsch, A. y R. Busse (1990). "NG-nitro-L-arginine (N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine) impairs endothelium-dependent dilations by inhibiting cytosolic nitric oxide synthesis from L-arginine." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **341**(1-2): 143-147.
- Mulvihill, E. E., E. M. Allister, B. G. Sutherland, D. E. Telford, C. G. Sawyez, J. Y. Edwards, J. M. Markle, R. A. Hegele y M. W. Huff (2009). "Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance." *Diabetes* **58**(10): 2198-2210.
- Mulvihill, E. E., J. M. Assini, B. G. Sutherland, A. S. DiMattia, M. Khami, J. B. Koppes, C. G. Sawyez, S. C. Whitman y M. W. Huff (2010). "Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(4): 742-748.
- Murdoch, C. E., S. P. Alom-Ruiz, M. Wang, M. Zhang, S. Walker, B. Yu, A. Brewer y A. M. Shah (2011). "Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction." *Basic Res Cardiol* **106**(4): 527-538.
- Murphy, E., M. Kohr, J. Sun, T. Nguyen y C. Steenbergen (2012). "S-nitrosylation: a radical way to protect the heart." *J Mol Cell Cardiol* **52**(3): 568-577.
- Nair, A. R., C. M. Elks, J. Vila, F. Del Piero, D. B. Paulsen y J. Francis (2014). "A blueberry-enriched diet improves renal function and reduces oxidative stress in metabolic syndrome animals: potential mechanism of TLR4-MAPK signaling pathway." *PLoS One* **9**(11): e111976.

- Najmanova, I., M. Voprsalova y P. Mladenka (2014). "Vasodilatory activity of human quercetin metabolites." *Free Radic Biol Med* **75 Suppl 1**: S43.
- Niki, E., Ed. (1996). *alpha-Tocopherol*. . Handbook of Antioxidants. New York.
- Nishida, E. y Y. Gotoh (1993). "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." *Trends Biochem Sci* **18**(4): 128-131.
- Nishiyama, A., M. Yoshizumi, M. Rahman, H. Kobori, D. M. Seth, A. Miyatake, G. X. Zhang, L. Yao, H. Hitomi, T. Shokoji, H. Kiyomoto, S. Kimura, T. Tamaki, M. Kohno y Y. Abe (2004). "Effects of AT1 receptor blockade on renal injury and mitogen-activated protein activity in Dahl salt-sensitive rats." *Kidney Int* **65**(3): 972-981.
- Nyby, M. D., K. Matsumoto, K. Yamamoto, K. Abedi, P. Eslami, G. Hernandez, V. Smutko, M. E. Berger y M. L. Tuck (2005). "Dietary fish oil prevents vascular dysfunction and oxidative stress in hyperinsulinemic rats." *Am J Hypertens* **18**(2 Pt 1): 213-219.
- O'Neill, S., J. Brault, M. J. Stasia y U. G. Knaus (2015). "Genetic disorders coupled to ROS deficiency." *Redox Biol* **6**: 135-156.
- Olaleye, M. T., O. O. Crown, A. C. Akinmoladun y A. A. Akindahunsi (2014). "Rutin and quercetin show greater efficacy than nifedipin in ameliorating hemodynamic, redox, and metabolite imbalances in sodium chloride-induced hypertensive rats." *Hum Exp Toxicol* **33**(6): 602-608.
- Olin, K. L., M. S. Golub, M. E. Gershwin, A. G. Hendrickx, B. Lonnerdal y C. L. Keen (1995). "Extracellular superoxide dismutase activity is affected by dietary zinc intake in nonhuman primate and rodent models." *Am J Clin Nutr* **61**(6): 1263-1267.
- Oliveira-Paula, G. H., R. Lacchini y J. E. Tanus-Santos (2016). "Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms." *Gene* **575**(2 Pt 3): 584-599.
- OMS Informe 2015 (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> 2017).
- Osakabe, N. (2013). "Flavan 3-ols improve metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms." *J Clin Biochem Nutr* **52**(3): 186-192.
- Osakabe, N., J. Hoshi, N. Kudo y M. Shibata (2014). "The flavan-3-ol fraction of cocoa powder suppressed changes associated with early-stage metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats." *Life Sci* **114**(1): 51-56.
- Ottaviani, J. I., M. Balz, J. Kimball, J. L. Ensunsa, R. Fong, T. Y. Momma, C. Kwik-Urbe, H. Schroeter y C. L. Keen (2015). "Safety and efficacy of cocoa flavanol intake in healthy adults: a randomized, controlled, double-masked trial." *Am J Clin Nutr* **102**(6): 1425-1435.

- Ottaviani, J. I., C. Kwik-Urbe, C. L. Keen y H. Schroeter (2012). "Intake of dietary procyanidins does not contribute to the pool of circulating flavanols in humans." *Am J Clin Nutr* **95**(4): 851-858.
- Ottaviani, J. I., T. Y. Momma, C. Heiss, C. Kwik-Urbe, H. Schroeter y C. L. Keen (2011). "The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity in vivo." *Free Radic Biol Med* **50**(2): 237-244.
- Packer, L. G., Alexander N. (1987). "Methods in Enzymology. Oxygen radicals in biological systems PartB Oxygen radicals and antioxidants." **186**.
- Panchal, S. K., H. Poudyal y L. Brown (2012). "Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats." *J Nutr* **142**(6): 1026-1032.
- Paravicini, T. M., S. Chrissobolis, G. R. Drummond y C. G. Sobey (2004). "Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo." *Stroke* **35**(2): 584-589.
- Paulis, L., O. Pechanova, J. Zicha, A. Barta, R. Gardlik, P. Celec, J. Kunes y F. Simko (2010). "Melatonin interactions with blood pressure and vascular function during L-NAME-induced hypertension." *J Pineal Res* **48**(2): 102-108.
- Pedrielli, P., G. F. Pedulli y L. H. Skibsted (2001). "Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate." *J Agric Food Chem* **49**(6): 3034-3040.
- Pektas, M. B., G. Sadi y F. Akar (2015). "Long-Term Dietary Fructose Causes Gender-Different Metabolic and Vascular Dysfunction in Rats: Modulatory Effects of Resveratrol." *Cell Physiol Biochem* **37**(4): 1407-1420.
- Peng, T., X. Lu y Q. Feng (2005). "Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial depression." *Circulation* **111**(13): 1637-1644.
- Perez-Vizcaino, F., J. Duarte, R. Jimenez, C. Santos-Buelga y A. Osuna (2009). "Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin." *Pharmacol Rep* **61**(1): 67-75.
- Petroff, M. G., S. H. Kim, S. Pepe, C. Dessy, E. Marban, J. L. Balligand y S. J. Sollott (2001). "Endogenous nitric oxide mechanisms mediate the stretch dependence of Ca²⁺ release in cardiomyocytes." *Nat Cell Biol* **3**(10): 867-873.

- Petry, A., T. Djordjevic, M. Weitnauer, T. Kietzmann, J. Hess y A. Gorlach (2006). "NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells." *Antioxid Redox Signal* **8**(9-10): 1473-1484.
- Phatharajaree, W., A. Phrommintikul y N. Chattipakorn (2007). "Matrix metalloproteinases and myocardial infarction." *Can J Cardiol* **23**(9): 727-733.
- Piotrkowski, B., C. G. Fraga y E. M. de Cavanagh (2007). "Mitochondrial function and nitric oxide metabolism are modified by enalapril treatment in rat kidney." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(4): R1494-1501.
- Prathipati, P., N. Metreveli, S. S. Nandi, S. C. Tyagi y P. K. Mishra (2016). "Ablation of Matrix Metalloproteinase-9 Prevents Cardiomyocytes Contractile Dysfunction in Diabetics." *Front Physiol* **7**: 93.
- Prince, P. D., C. R. Lanzi, J. E. Toblli, R. Elesgaray, P. I. Oteiza, C. G. Fraga y M. Galleano (2016). "Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats." *Free Radic Biol Med* **90**: 35-46.
- Prosser, B. L., R. J. Khairallah, A. P. Ziman, C. W. Ward y W. J. Lederer (2013a). "X-ROS signaling in the heart and skeletal muscle: stretch-dependent local ROS regulates $[Ca^{2+}]_i$." *J Mol Cell Cardiol* **58**: 172-181.
- Prosser, B. L., C. W. Ward y W. J. Lederer (2013b). "X-ROS signalling is enhanced and graded by cyclic cardiomyocyte stretch." *Cardiovasc Res* **98**(2): 307-314.
- Prosser, B. L., C. W. Ward y W. J. Lederer (2011). "X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart." *Science* **333**(6048): 1440-1445.
- Pryor, W. A. (1976). "Free radicals in biology." Academic Press **2**.
- Qian, J., F. Chen, Y. Kovalenkov, D. Pandey, M. A. Moseley, M. W. Foster, S. M. Black, R. C. Venema, D. W. Stepp y D. J. Fulton (2012). "Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation." *Free Radic Biol Med* **52**(9): 1806-1819.
- Qian, J. y D. Fulton (2013). "Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium." *Front Physiol* **4**: 347.
- Quinn, M. T., M. C. Ammons y F. R. Deleo (2006). "The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction." *Clin Sci (Lond)* **111**(1): 1-20.
- Radi, R., J. S. Beckman, K. M. Bush y B. A. Freeman (1991). "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." *J Biol Chem* **266**(7): 4244-4250.

- Radi, R., A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano y L. Castro (2002). "Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria." *Free Radic Biol Med* **33**(11): 1451-1464.
- Rafikov, R., F. V. Fonseca, S. Kumar, D. Pardo, C. Darragh, S. Elms, D. Fulton y S. M. Black (2011). "eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity." *J Endocrinol* **210**(3): 271-284.
- Ralay Ranaivo, H., M. Diebolt y R. Andriantsitohaina (2004). "Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide." *Br J Pharmacol* **142**(4): 671-678.
- Ramirez-Sanchez, I., H. Aguilar, G. Ceballos y F. Villarreal (2012). "(-)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT." *Mol Cell Biochem* **370**(1-2): 141-150.
- Ramirez-Sanchez, I., L. Maya, G. Ceballos y F. Villarreal (2010). "(-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways." *Hypertension* **55**(6): 1398-1405.
- Ray, R., C. E. Murdoch, M. Wang, C. X. Santos, M. Zhang, S. Alom-Ruiz, N. Anilkumar, A. Ouattara, A. C. Cave, S. J. Walker, D. J. Grieve, R. L. Charles, P. Eaton, A. C. Brewer y A. M. Shah (2011). "Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(6): 1368-1376.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." *Diabetes* **37**(12): 1595-1607.
- Reczek, C. R. y N. S. Chandel (2015). "ROS-dependent signal transduction." *Curr Opin Cell Biol* **33**: 8-13.
- Rees, D. D., R. M. Palmer, R. Schulz, H. F. Hodson y S. Moncada (1990). "Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo." *Br J Pharmacol* **101**(3): 746-752.
- Rein, D., S. Lotito, R. R. Holt, C. L. Keen, H. H. Schmitz y C. G. Fraga (2000). "Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status." *J Nutr* **130**(8S Suppl): 2109S-2114S.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." *Curr Med Chem* **8**(7): 797-807.
- Ried, K., O. R. Frank y N. P. Stocks (2009). "Dark chocolate or tomato extract for prehypertension: a randomised controlled trial." *BMC Complement Altern Med* **9**: 22.
- Rimm, E. B. (2002). "Fruit and vegetables--building a solid foundation." *Am J Clin Nutr* **76**(1): 1-2.

- Rivera, L., R. Moron, M. Sanchez, A. Zarzuelo y M. Galisteo (2008). "Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats." *Obesity (Silver Spring)* **16**(9): 2081-2087.
- Rizvi, S. I. y M. A. Zaid (2001). "Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: effect of insulin and (-)-epicatechin." *J Physiol Pharmacol* **52**(3): 483-488.
- Rodriguez-Ariza, A., F. Toribio y J. Lopez-Barea (1994). "Rapid determination of glutathione status in fish liver using high-performance liquid chromatography and electrochemical detection." *J Chromatogr B Biomed Appl* **656**(2): 311-318.
- Rothwell, J. A., J. Perez-Jimenez, V. Neveu, A. Medina-Remon, N. M'Hiri, P. Garcia-Lobato, C. Manach, C. Knox, R. Eisner, D. S. Wishart y A. Scalbert (2013). "Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content." *Database (Oxford)* **2013**: bat070.
- Rude, M. K., T. A. Duhaney, G. M. Kuster, S. Judge, J. Heo, W. S. Colucci, D. A. Siwik y F. Sam (2005). "Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes." *Hypertension* **46**(3): 555-561.
- Ruwhof, C. y A. van der Laarse (2000). "Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways." *Cardiovasc Res* **47**(1): 23-37.
- Sag, C. M., S. Wagner y L. S. Maier (2013). "Role of oxidants on calcium and sodium movement in healthy and diseased cardiac myocytes." *Free Radic Biol Med* **63**: 338-349.
- Sainz, J., R. Wangenstein, I. Rodriguez Gomez, J. M. Moreno, V. Chamorro, A. Osuna, P. Bueno y F. Vargas (2005). "Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition." *Am J Hypertens* **18**(6): 871-877.
- Sanchez, M., M. Galisteo, R. Vera, I. C. Villar, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino y J. Duarte (2006). "Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats." *J Hypertens* **24**(1): 75-84.
- Sanchez, M., F. Lodi, R. Vera, I. C. Villar, A. Cogolludo, R. Jimenez, L. Moreno, M. Romero, J. Tamargo, F. Perez-Vizcaino y J. Duarte (2007). "Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and

- overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta." *J Nutr* **137**(4): 910-915.
- Santillo, M., A. Colantuoni, P. Mondola, B. Guida y S. Damiano (2015). "NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis." *Front Physiol* **6**: 194.
- Santos, C. X., N. Anilkumar, M. Zhang, A. C. Brewer y A. M. Shah (2011). "Redox signaling in cardiac myocytes." *Free Radic Biol Med* **50**(7): 777-793.
- Saravanakumar, M. y B. Raja (2011). "Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats." *Eur J Pharmacol* **671**(1-3): 87-94.
- Sarr, M., M. Chataigneau, S. Martins, C. Schott, J. El Bedoui, M. H. Oak, B. Muller, T. Chataigneau y V. B. Schini-Kerth (2006). "Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase." *Cardiovasc Res* **71**(4): 794-802.
- Scalbert, A. y G. Williamson (2000). "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." *J Nutr* **130**(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Scott, B. C., J. Butler, B. Halliwell y O. I. Aruoma (1993). "Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins." *Free Radic Res Commun* **19**(4): 241-253.
- Schneider, C., D. A. Pratt, N. A. Porter y A. R. Brash (2007). "Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis." *Chem Biol* **14**(5): 473-488.
- Schroder, K., K. Wandzioch, I. Helmcke y R. P. Brandes (2009). "Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(2): 239-245.
- Schroder, K., M. Zhang, S. Benkhoff, A. Mieth, R. Pliquett, J. Kosowski, C. Kruse, P. Luedike, U. R. Michaelis, N. Weissmann, S. Dimmeler, A. M. Shah y R. P. Brandes (2012). "Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase." *Circ Res* **110**(9): 1217-1225.
- Schroeter, H., C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C. L. Keen, N. K. Hollenberg, H. Sies, C. Kwik-Urbe, H. H. Schmitz y M. Kelm (2006). "(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(4): 1024-1029.
- Sears, C. E., S. M. Bryant, E. A. Ashley, C. A. Lygate, S. Rakovic, H. L. Wallis, S. Neubauer, D. A. Terrar y B. Casadei (2003). "Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling." *Circ Res* **92**(5): e52-59.

- Seddon, M., A. M. Shah y B. Casadei (2007). "Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling." *Cardiovasc Res* **75**(2): 315-326.
- Selemidis, S., G. J. Dusting, H. Peshavariya, B. K. Kemp-Harper y G. R. Drummond (2007). "Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells." *Cardiovasc Res* **75**(2): 349-358.
- Senaphan, K., U. Kukongviriyapan, W. Sangartit, P. Pakdeechote, P. Pannangpetch, P. Prachaney, S. E. Greenwald y V. Kukongviriyapan (2015). "Ferulic Acid Alleviates Changes in a Rat Model of Metabolic Syndrome Induced by High-Carbohydrate, High-Fat Diet." *Nutrients* **7**(8): 6446-6464.
- Serban, M. C., A. Sahebkar, A. Zanchetti, D. P. Mikhailidis, G. Howard, D. Antal, F. Andrica, A. Ahmed, W. S. Aronow, P. Muntner, G. Y. Lip, I. Graham, N. Wong, J. Rysz y M. Banach (2016). "Effects of Quercetin on Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *J Am Heart Assoc* **5**(7).
- Serrander, L., L. Cartier, K. Bedard, B. Banfi, B. Lardy, O. Plastre, A. Sienkiewicz, L. Forro, W. Schlegel y K. H. Krause (2007). "NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation." *Biochem J* **406**(1): 105-114.
- Shah, A. M. y P. A. MacCarthy (2000). "Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function." *Pharmacol Ther* **86**(1): 49-86.
- Shaul, P. W. (2002). "Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location." *Annu Rev Physiol* **64**: 749-774.
- Shimokawa Ki, K., M. Katayama, Y. Matsuda, H. Takahashi, I. Hara, H. Sato y S. Kaneko (2002). "Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma." *Mol Hum Reprod* **8**(1): 32-36.
- Shrime, M. G., S. R. Bauer, A. C. McDonald, N. H. Chowdhury, C. E. Coltart y E. L. Ding (2011). "Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies." *J Nutr* **141**(11): 1982-1988.
- Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Exp Physiol* **82**(2): 291-295.
- Sies, H. (2007). "Biological redox systems and oxidative stress." *Cell Mol Life Sci* **64**(17): 2181-2188.
- Silambarasan, T. y B. Raja (2012). "Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats." *Eur J Pharmacol* **679**(1-3): 81-89.

- Simic, M. G. (1990). "Pulse radiolysis in study of oxygen radicals." *Methods Enzymol* **186**: 89-100.
- Simos, Y. V., Verginadis, II, I. K. Toliopoulos, A. P. Velalopoulou, I. V. Karagounis, S. C. Karkabounas y A. M. Evangelou (2012). "Effects of catechin and epicatechin on superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity, in vivo." *Redox Rep* **17**(5): 181-186.
- Sirk, T. W., Brown, E. F., Friedman, M., Sum, A. K. (2009). "Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity." *J Agric Food Chem* **57** (15): 6720-8.
- Sirker, A., M. Zhang, C. Murdoch y A. M. Shah (2007). "Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure." *Am J Nephrol* **27**(6): 649-660.
- Sirker, A., M. Zhang y A. M. Shah (2011). "NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies." *Basic Res Cardiol* **106**(5): 735-747.
- Siti, H. N., Y. Kamisah y J. Kamsiah (2015). "The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review)." *Vascul Pharmacol* **71**: 40-56.
- Spanidis, Y., A. Mpesios, D. Stagos, N. Goutzourelas, D. Bar-Or, M. Karapetsa, E. Zakynthinos, D. A. Spandidos, A. M. Tsatsakis, G. Leon y D. Kouretas (2016). "Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations." *Exp Ther Med* **11**(3): 895-903.
- Sriramula, S. y J. Francis (2015). "Tumor Necrosis Factor - Alpha Is Essential for Angiotensin II-Induced Ventricular Remodeling: Role for Oxidative Stress." *PLoS One* **10**(9): e0138372.
- Stamler, J. S., S. Lamas y F. C. Fang (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." *Cell* **106**(6): 675-683.
- Stanisic, J., G. Koricanac, T. Culafic, S. Romic, M. Stojiljkovic, M. Kostic, M. Pantelic y S. Tepavcevic (2016). "Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet." *Mol Cell Endocrinol* **420**: 97-104.
- Steffen, Y., C. Gruber, T. Schewe y H. Sies (2008). "Mono-O-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase." *Arch Biochem Biophys* **469**(2): 209-219.
- Steffen, Y., T. Schewe y H. Sies (2007). "(-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **359**(3): 828-833.

- Sun, J., Steenbergen, C., Murphy, E., (2006). "S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress." *Antioxid Redox Signal* 8 (9-10): 1693-705.
- Suzuki, H., A. Ishigaki y Y. Hara (1998). "Long-term effect of a trace amount of tea catechins with perilla oil on the plasma lipids in mice." *Int J Vitam Nutr Res* 68(4): 272-274.
- Syed Hussain, S. S. K., M.N.; Kadir, H.A. (2015). "(+)-Catechin Attenuates NF- κ B Activation Through Regulation of Akt, MAPK, and AMPK Signaling Pathways in LPS-Induced BV-2 Microglial Cells." *Am J Chin Med* 43(5): 927-952.
- Takac, I., K. Schroder, L. Zhang, B. Lardy, N. Anilkumar, J. D. Lambeth, A. M. Shah, F. Morel y R. P. Brandes (2011). "The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4." *J Biol Chem* 286(15): 13304-13313.
- Takami, S., T. Imai, M. Hasumura, Y. M. Cho, J. Onose y M. Hirose (2008). "Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats." *Food Chem Toxicol* 46(6): 2224-2229.
- Tamura, T., K. Mitsumori, S. Muto, H. Kasahara, S. Kobayashi, Y. Okuhara, M. Hayashi, T. Nagasawa, T. Onozato y J. Kuroda (2010). "Fifty-two week chronic toxicity of enzymatically decomposed rutin in Wistar rats." *Food Chem Toxicol* 48(8-9): 2312-2318.
- Taubert, D., R. Berkels, R. Roesen y W. Klaus (2003). "Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension." *Jama* 290(8): 1029-1030.
- Taubert, D., R. Roesen y E. Schomig (2007). "Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis." *Arch Intern Med* 167(7): 626-634.
- Touyz, R. M. (2003a). "Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension." *Expert Rev Cardiovasc Ther* 1(1): 91-106.
- Touyz, R. M. (2003b). "Activated oxygen metabolites: do they really play a role in angiotensin II-regulated vascular tone?" *J Hypertens* 21(12): 2235-2238.
- Trnkova, L., Trnkova, L., Drsata, J., Bousova, I. (2015). " Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction." *J Biosci* 40(2): 419-39.
- Tsai, H. Y., L. Y. Wu y L. S. Hwang (2008). "Effect of a proanthocyanidin-rich extract from longan flower on markers of metabolic syndrome in fructose-fed rats." *J Agric Food Chem* 56(22): 11018-11024.
- Tsutsui, H., S. Kinugawa y S. Matsushima (2011). "Oxidative stress and heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301(6): H2181-2190.

- Usui, M., K. Egashira, S. Kitamoto, M. Koyanagi, M. Katoh, C. Kataoka, H. Shimokawa y A. Takeshita (1999). "Pathogenic role of oxidative stress in vascular angiotensin-converting enzyme activation in long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats." *Hypertension* **34**(4 Pt 1): 546-551.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur y J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- Vallet, P., Y. Charnay, K. Steger, E. Ogier-Denis, E. Kovari, F. Herrmann, J. P. Michel y I. Szanto (2005). "Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia." *Neuroscience* **132**(2): 233-238.
- van Acker, S. A., G. P. van Balen, D. J. van den Berg, A. Bast y W. J. van der Vijgh (1998). "Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids." *Biochem Pharmacol* **56**(8): 935-943.
- Vazquez-Prieto, M. A., N. F. Renna, E. R. Diez, V. Cacciamani, C. Lembo y R. M. Miatello (2011). "Effect of red wine on adipocytokine expression and vascular alterations in fructose-fed rats." *Am J Hypertens* **24**(2): 234-240.
- Vazquez-Prieto, M. A., N. F. Renna, C. Lembo, E. R. Diez y R. M. Miatello (2010). "Dealcoholized red wine reverse vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome: role of NAD(P)H oxidase and eNOS activity." *Food Funct* **1**(1): 124-129.
- Verstraeten, S. V., Hammerstone, J. F., Keen, C. L., Fraga, C. G., Oteiza, P. I. (2005). "Antioxidant and membrane effects of procyanidin dimers and trimers isolated from peanut and cocoa." *J Agric Food Chem* **53**(12): 5041-8.
- Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." *Cell Mol Life Sci* **59**(9): 1428-1459.
- von Lohneysen, K., D. Noack, P. Hayes, J. S. Friedman y U. G. Knaus (2012). "Constitutive NADPH oxidase 4 activity resides in the composition of the B-loop and the penultimate C terminus." *J Biol Chem* **287**(12): 8737-8745.
- Wan, L. L., J. Xia, D. Ye, J. Liu, J. Chen y G. Wang (2009). "Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit." *Cardiovasc Ther* **27**(1): 28-33.
- Wang, B. Y., R. C. Candipan, M. Arjomandi, P. T. Hsiun, P. S. Tsao y J. P. Cooke (1996). "Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits." *J Am Coll Cardiol* **28**(6): 1573-1579.

- Wang, H. D., S. Xu, D. G. Johns, Y. Du, M. T. Quinn, A. J. Cayatte y R. A. Cohen (2001). "Role of NADPH oxidase in the vascular hypertrophic and oxidative stress response to angiotensin II in mice." *Circ Res* **88**(9): 947-953.
- Wang, J. F., D. D. Schramm, R. R. Holt, J. L. Ensunsa, C. G. Fraga, H. H. Schmitz y C. L. Keen (2000). "A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage." *J Nutr* **130**(8S Suppl): 2115S-2119S.
- Wang, S., N. Moustaid-Moussa, L. Chen, H. Mo, A. Shastri, R. Su, P. Bapat, I. Kwun y C. L. Shen (2014). "Novel insights of dietary polyphenols and obesity." *J Nutr Biochem* **25**(1): 1-18.
- Ward, N. C. y K. D. Croft (2006). "Hypertension and oxidative stress." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**(9): 872-876.
- Weydert, C. J. y J. J. Cullen (2010). "Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue." *Nat Protoc* **5**(1): 51-66.
- Williams, N. H. Y. J. K. (1982). "Outer-sphere electron-transfer reactions of ascorbate anions." *Aust. J. Chem.* **35**: 1133-1144.
- Wingler, K., S. Wunsch, R. Kreutz, L. Rothermund, M. Paul y H. H. Schmidt (2001). "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1456-1464.
- Wong, S. K., K. Y. Chin, F. H. Suhaimi, A. Fairus y S. Ima-Nirwana (2016). "Animal models of metabolic syndrome: a review." *Nutr Metab (Lond)* **13**: 65.
- Xing, S. S., H. W. Tan, X. P. Bi, M. Zhong, Y. Zhang y W. Zhang (2008). "Felodipine reduces cardiac expression of IL-18 and perivascular fibrosis in fructose-fed rats." *Mol Med* **14**(7-8): 395-402.
- Xu, X., L. Tu, L. Wang, X. Fang y D. W. Wang (2011). "CYP2J3 gene delivery reduces insulin resistance via upregulation of eNOS in fructose-treated rats." *Cardiovasc Diabetol* **10**: 114.
- Yada, T., H. Shimokawa, O. Hiramatsu, T. Kajita, F. Shigeto, M. Goto, Y. Ogasawara y F. Kajiya (2003). "Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo." *Circulation* **107**(7): 1040-1045.
- Yamamoto, Y. y E. Oue (2006). "Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet." *Biosci Biotechnol Biochem* **70**(4): 933-939.
- Yang, S., P. Madyastha, S. Bingel, W. Ries y L. Key (2001). "A new superoxide-generating oxidase in murine osteoclasts." *J Biol Chem* **276**(8): 5452-5458.

- Yang, Y. J., Y. J. Kim, Y. K. Yang, J. Y. Kim y O. Kwon (2012). "Dietary flavan-3-ols intake and metabolic syndrome risk in Korean adults." *Nutr Res Pract* **6**(1): 68-77.
- Yokozawa, T., H. J. Kim y E. J. Cho (2008). "Gravinol ameliorates high-fructose-induced metabolic syndrome through regulation of lipid metabolism and proinflammatory state in rats." *J Agric Food Chem* **56**(13): 5026-5032.
- You, Y. H., S. Okada, S. Ly, K. Jandeleit-Dahm, D. Barit, T. Namikoshi y K. Sharma (2013). "Role of Nox2 in diabetic kidney disease." *Am J Physiol Renal Physiol* **304**(7): F840-848.
- Youn, J. Y., L. Gao y H. Cai (2012). "The p47phox- and NADPH oxidase organiser 1 (NOXO1)-dependent activation of NADPH oxidase 1 (NOX1) mediates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling and endothelial dysfunction in a streptozotocin-induced murine model of diabetes." *Diabetologia* **55**(7): 2069-2079.
- Zakula, Z., G. Koricanac, S. Tepavcevic, M. Stojiljkovic, T. Milosavljevic y E. R. Isenovic (2011). "Impairment of cardiac insulin signaling in fructose-fed ovariectomized female Wistar rats." *Eur J Nutr* **50**(7): 543-551.
- Zeiber, A. M., B. Fisslthaler, B. Schray-Utz y R. Busse (1995). "Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells." *Circ Res* **76**(6): 980-986.
- Zhang, G. X., S. Kimura, A. Nishiyama, T. Shokoji, M. Rahman y Y. Abe (2004). "ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction." *Hypertension* **43**(1): 117-124.
- Zhang, M., A. C. Brewer, K. Schroder, C. X. Santos, D. J. Grieve, M. Wang, N. Anilkumar, B. Yu, X. Dong, S. J. Walker, R. P. Brandes y A. M. Shah (2010). "NADPH oxidase-4 mediates protection against chronic load-induced stress in mouse hearts by enhancing angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(42): 18121-18126.
- Zhang, M., A. Perino, A. Ghigo, E. Hirsch y A. M. Shah (2013). "NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers?" *Antioxid Redox Signal* **18**(9): 1024-1041.
- Zhang, M. y A. M. Shah (2014). "ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells." *Cardiovasc Res* **102**(2): 249-257.
- Zhang, Y., C. Huang, S. Liu, J. Bai, X. Fan, J. Guo, Y. Jia, Z. Zhang, X. Chen, P. Zhang, B. Wang y X. Zhang (2015). "Effects of quercetin on intracavernous pressure and expression of nitrogen synthase isoforms in arterial erectile dysfunction rat model." *Int J Clin Exp Med* **8**(5): 7599-7605.

- Zhang, Y. H., C. Z. Jin, J. H. Jang y Y. Wang (2014). "Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology." *J Physiol* **592**(15): 3189-3200.
- Zhao, C. X., X. Xu, Y. Cui, P. Wang, X. Wei, S. Yang, M. L. Edin, D. C. Zeldin y D. W. Wang (2009). "Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats." *J Pharmacol Exp Ther* **328**(2): 610-620.
- Zhao, L. R., Y. J. Du, L. Chen, Z. G. Liu, Y. H. Pan, J. F. Liu y B. Liu (2014). "Quercetin protects against high glucose-induced damage in bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *Int J Mol Med* **34**(4): 1025-1031.
- Zhao, Y., P. M. Vanhoutte y S. W. Leung (2015). "Vascular nitric oxide: Beyond eNOS." *J Pharmacol Sci* **129**(2): 83-94.