



EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS RICOS EN POLIFENOLES

Ligia Stella Guerrero Orjuela

Dipòsit Legal: T.457-2013

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Ligia Stella Guerrero O.

**Evaluación del efecto corrector de la síntesis de lípidos y la
hipertensión de extractos ricos en polifenoles**

TESIS DOCTORAL

Directores: Dr. Lluís Arola Ferrer y Dra. Begoña Muguera

Departamento de Bioquímica y Biotecnología



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013



Departament de Bioquímica i Biotecnologia

C/ Marcel·lí Domingo s/n

Campus Sant Pere Sescelades

43007 Tarragona

Telèfon: 977 559 521

Fax: 977 558 232

Lluís Arola Ferrer, Catedràtic d'Universitat del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili y María Begoña Mugerza, professora agregat del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN:

Que aquest treball, titulat "Evaluación del efecto corrector de la síntesis de lípidos y la hipertensión de extractos ricos en polifenoles" que presenta Ligia Stella Guerrero per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta universitat.

Tarragona,

Fdo. Dr. Lluís Arola Ferrer

Fdo. Dra. María Begoña Mugerza

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

*A mis padres y mi hermanita, por su amor y apoyo constante,
sin ellos esto no hubiese sido posible*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

“Parece imposible hasta que se hace”

Nelson Mandela

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Agradecimientos

El agradecimiento en ocasiones sobra, pero nunca la gratitud.....!!!

(Anónimo)

Hace cuatro años salí de mi casa pensando que sería mucho tiempo lejos y con muchas expectativas, ahora que ha pasado el tiempo y he llegado hasta acá, recuerdo tantas personas que conocí, tantas cosas que aprendí, tantos lugares que visité.....y por ello quisiera mostrar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado y han hecho posible que este sueño se haya hecho realidad. Espero no olvidar a nadie.

A la compañía Alpina, que apoyo este proyecto en todo momento, A Juan Pablo Fernández y Claudia Manzano por su gestión para lograr finalizar este objetivo. Indudablemente mi gratitud a "mi jefe" Alvaro Otálora, quien asumió como propia esta idea desde el principio, Alvarito gracias por la oportunidad de poder abrir los ojos a una vida diferente.

Agraeixo al meu director, Lluís Arola, la teva confiança en mi, l'oportunitat de treballar al teu grup, el teu suport, i el teu constant assessorament. A Begoña, por tú entrega y dedicación a éste trabajo, por tú infinita paciencia y tolerancia, por enseñarme a hacer ciencia, sobre todo muchas gracias por tú gran calidad humana y científica. A la Cinta i a la Pepa el seu assessorament i bon humor a les reunions del mini grup dels dimecres quan començava el meu treball per la tesis. Al Gerard el seu suport i assessorament que van ser fonamentals per aconseguir la meva primera publicació i perquè sempre va tindre un "hola" molt català quan ens trobàvem pel passadís. A Anna Arola, amb qui vaig tindre l'oportunitat de treballar durant les llargues jornades de pràctiques, i per participar en el desenvolupament d'aquest treball, sobretot perquè sempre té un somriure quan et trobes amb ella... i això t'anima quan les coses no van com s'espera. Als professors: A la Montse (per la seva col·laboració en tots els tràmits administratius, tasca que no es pas fàcil) i al Miquel per les mini converses en algunes jornades de feina al laboratori i als altres professors del departament.

Al Dr. Julián Castillo por su asesoría y soporte científico fundamentales en el desarrollo de éste trabajo.

A Xavier Gómez, quien fue un soporte importante en mis primeros días en Tarragona, además quien me enseñó la URV y me presentó a Lluís Arola.

A Niurka, Rosa, Yaiza y Vanessa quienes me acogieron los primeros días, por su trabajo constante, su ayuda y soporte continuos; quienes terminan viviendo las tesis como propias. A Santiago y a Pietat por su colaboración y paciencia durante las prácticas de laboratorio. A Tony de la Torre de Recursos Científicos por su colaboración en todo momento. A Ingrid, Montse y Rosa de la secretaría del Departamento quienes con su trabajo y su trato amable, hicieron más fácil el mío. A Tony Caimari y Josep Del Bas por su asesoría y soporte en el laboratorio. A Isabel Baiges, por enseñarme las primeras cosas del trabajo de laboratorio con radioactivos, por su constancia y por su dedicación, que son ejemplo. A Anna Cresenti por su calidez y ayuda cuando estuvimos en Barcelona y por ser de las primeras personas que me hizo sentir que podía tener una casa lejos de la mía.

A mis compañeros de Doctorado, los que ya no están pero que no podría dejar de agradecer, a Esther Sala, Laura Guasch y David Pajuelo, grandes seres humanos, por tantos buenos momentos. A Anabell, Lidia, Victor, Neus, Nohemí, Laura, Husam, Ma. José y Adrià, con quienes compartí el trabajo de laboratorio, practicas, comidas, cenas, algunos cafés y momentos divertidos dentro y fuera del despacho...por que cada uno a su manera me hizo sentir parte de un grupo...y de un buen grupo.

A Mar Quiñones por su participación activa en el desarrollo de la tesis, por sus palabras de ánimo y su vocación al trabajo. A Zara y María, quienes vivieron conmigo mi miedo a las ratas y me ayudaron a superarlo.....chicas sin su ayuda y su trabajo no habría sido posible culminar este proyecto.

A la "cuasi Doctora" Cristina Rojas y su familia, que me hicieron sentir como en mi hogar. Cris siempre tan dispuesta a colaborar, vales un Imperio como tú misma dices. A Aleix, tan amable y especial, muchas gracias por los buenos

momentos y las buenas conversaciones, por las palabras de ánimo y apoyo. A los dos por que han vivido como suyos momentos muy importantes para mí.

A mis amigos y compatriotas Said y Yanine, que me han enseñado a apreciar y ver de una manera diferente la cultura costeña, a Julián Cristiano por su tranquilidad...que da tranquilidad, a Nohora por tantas buenas conversaciones, por el buen humor, pero sobre todo por las lecciones de vida.... A Marcelo y Gaby por la buena energía, las buenas cenas, los buenos momentos compartidos y por los que vendrán.

A Lauris y Jaime Andrés, dos grandes personajes.....muchas gracias por compartir su talento y amistad con Raúl y conmigo, pero sobre todo gracias por el apoyo emocional.....Lauris...!la madrina!.....te quiero mucho.

A Sergi e Isa, con quienes hemos intentado salir de la matrix, gracias por ese proceso y por todos los momentos vividos, dos seres maravillosos a quienes extrañaré mucho. A la familia de Sergi, Jaume y Josefina por compartir su espacio con nosotros.

A mis amigos de Colombia Rafa y Luces, que han estado en la distancia, quienes reafirman que los amigos de verdad son tesoros, otros dos que valen un Imperio. A Stellita y Hernando, por estar siempre pendientes de mi familia, eso no tiene precio. A mi amiga Andreita y a sor María de los Ángeles, sus palabras siempre me animaron y ayudaron, y sé que sus oraciones también. A Lin Lin, Lucy y Pedro que estuvieron tan pendientes desde que llegue.

A mi amiga Isabel Araque y a su esposo Alvaro, gracias por hacerme sentir parte de su bonito espacio Colombo-Catalán, Isa siempre escuchando mis historias y diciendo "yo sé cómo es...." Gracias amiga y gracias a ésta bonita familia.

A Mercedes Mora, quien siempre ha creído en mí. A Sarita Russy siempre tan divertida y única, por estar pendiente y por visitarme desde tan lejos.

A mi amigo Juan Pablo, "El Che viajero", tantos buenos momentos compartidos, tantos viajes, tantas cosas inolvidables, solo me queda por decir "Juanpi sos grande y único Che".

A mi amigo William, por todo, por el apoyo científico, emocional, por la paciencia, por escuchar mis largas conversaciones, por los días de cine y de viaje, por haber compartido este proceso, Amigo gracias.

A Bertita, sin más palabras a mi mamá Peruana-Catalana, por estar en todo momento y por ser tan especial.

A mi hermanita, tan dulce y amorosa; a mi hermano, a quien esperamos volver a ver...

A tí....Raúl, por ser como eres, por el apoyo, por darme ánimo y hacerme reír cuando sentía que no podría seguir, por ser mi amigo, mi cómplice, mi compañero.....al cubanito salido de su isla.....Te amo, por hacer mi vida feliz.

A mis padres, quienes con sus esfuerzos han logrado que yo llegue hasta acá, por que han estado siempre, por su amor incondicional, por todo...gracias.

A Dios por no darme todo, solo lo que necesito.

	Página
Resumen/Abstract	3
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Polifenoles	17
1.1.1. Flavonoides	18
1.1.2. Estructura Química de los Flavonoides	18
1.1.3. Absorción y Metabolismo de los flavonoides	22
1.1.4. Efecto beneficioso de los flavonoides	23
1.1.4.1. Efecto Antioxidante de los flavonoides	24
1.1.4.2. Efecto de los flavonoides sobre el metabolismo lipídico	25
1.1.4.3 Efecto de los flavonoides sobre la función endotelial	28
1.1.4.4. Efecto de los flavonoides sobre la hipertensión	30
1.1.5. Fuentes alimentarias de flavonoides	31
1.1.6. Extracto de proantocianidinas de semilla de uva (GSPE)	33
1.1.6.1 Extracto de proantocianidinas de semillas de uva y homeostasis de los lípidos	34
1.1.6.2 Efecto antioxidante del extracto de proantocianidinas de semillas de uva	36

1.2. Dislipidemia	37
1.2.1 Síntesis y metabolismo del colesterol	42
1.2.2. Síntesis y metabolismo de los triacilgliceroles	44
1.3. Función endotelial e hipertensión arterial	46
1.3.1. Estructura de la pared vascular	46
1.3.2. Endotelio y tono vascular	49
1.3.3. Factores derivados del endotelio que regulan el tono vascular	50
1.3.3.1. Óxido Nítrico	51
1.3.3.2. Prostaciclina I ₂	52
1.3.4. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona	54
1.3.4.1. Enzima Convertidora de Angiotensina	55
1.3.5. Disfunción endotelial	58
1.4 Síndrome Metabólico	60
2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	63
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.1. MANUSCRITO 1: Serum metabolites from grape seed procyanidins decrease lipid synthesis in HepG2 cells	73
3.2. DOCUMENTO 1: Efecto de diferentes dosis de GSPE sobre la síntesis y secreción de lípidos en células HepG2	103

3.3. MANUSCRITO 2: Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies	125
3.4. MANUSCRITO 3: Antihypertensive effect of a grape seed procyanidin-rich extract (GSPE) on spontaneously hypertensive rats	137
3.4. MANUSCRITO 4: Endothelial factor involvement in the antihypertensive effect of a grape seed procyanidin extract in spontaneously hypertensive rats	175
3.5. DOCUMENTO 2: Efecto de procianidinas de semilla de uva (GSPE) sobre la homeostasis de los lípidos y la tensión arterial en un modelo animal de síndrome metabólico inducido por la dieta	197
4. RECAPITULACIÓN	221
5. CONCLUSIONES	235
6. BIBLIOGRAFÍA	239

FIGURAS

Figura 1. Clasificación y estructura química de las principales clases de polifenoles	21
Figura 2. Óxido nítrico: síntesis y funciones	30
Figura 3. Efecto de la concentración de LDL Colesterol sobre la producción de óxido nítrico	40
Figura 4. Efecto de la presión arterial sobre el contenido de LDL en la pared arterial	41
Figura 5. Cambios en el volumen del ateroma con relación a los cambios en la presión arterial sistólica	42
Figura 6. Corte transversal de una arteria	48
Figura 7. Relajación del músculo liso dependiente del endotelio	53
Figura 8. Representación de la cascada de RAAS	55
Figura 9. Isoformas de la enzima convertidora de angiotensina	57

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los polifenoles de acuerdo a su estructura química	18
---	----

Resumen-Abstract



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

El consumo regular de flavonoides se ha asociado con una reducción de la mortalidad por franja de edad y una disminución del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. La uva y el vino, son considerados una fuente importante de flavonoides principalmente del tipo proantocianidinas. Nuestro grupo ha demostrado que el extracto de proantocianidinas de semillas de uva (GSPE) corrige desviaciones homeostáticas asociadas a situaciones de riesgo de desarrollo de patologías relacionadas con el síndrome metabólico, ya que mejora la resistencia a la insulina, disminuye la inflamación y mejora el perfil lipídico y el contenido hepático de lípidos. También ha podido resolver, en parte, los mecanismos implicados en estos procesos. En la presente Tesis Doctoral el grupo de investigación comienza el estudio del GSPE sobre la hipertensión, inicialmente en un modelo experimental de hipertensión esencial y posteriormente sobre la presión arterial asociada al síndrome metabólico, y se plantea sentar las bases para desarrollar ingredientes funcionales a partir de proantocianidinas que presenten un efecto simultáneo en la prevención del riesgo de dislipemia y de hipertensión arterial, dos de las patologías más frecuentemente asociadas en el síndrome metabólico.

Nuestros resultados *in vitro* muestran que los diferentes tipos de proantocianidinas presentes en los extractos estudiados (extractos de pino, de cacao y de pepita de uva) inducen una disminución en la síntesis *de novo* de colesterol, triacilglicérols, y ésteres de colesterol en células hepáticas (HepG2). Sin embargo, en los últimos años se ha discutido el hecho de emplear extractos para la evaluación *in vitro* del efecto biológico de los flavonoides, ya que debido a las transformaciones estructurales que sufren los flavonoides durante su metabolismo, las formas bioactivas que se encuentran en el sangre y que alcanzan los tejidos son diferentes a las presentes en los alimentos. Utilizamos por ello un sistema que nos posibilitara evaluar sobre células HepG2 las moléculas fisiológicas. Para ello incubamos las células hepáticas con suero de ratas tratadas con diferentes dosis del extracto de GSPE y correlacionamos las moléculas presentes en el suero añadido con los efectos metabólicos. Los resultados obtenidos indican que los compuestos

predominantes en el suero son conjugados de proantocianidinas, principalmente glucuronidadas, y que además aparecen de manera dosis dependiente. Posteriormente, comprobamos que los compuestos presentes en el suero exhiben efecto reductor de la síntesis *de novo* de lípidos en células HepG2, siendo especialmente marcado el efecto sobre la síntesis de triacilgliceroles. Finalmente evaluamos el efecto del GSPE sobre la homeóstasis de los lípidos en un modelo animal de síndrome metabólico inducido por la dieta, encontrando que *in vivo* las proantocianidinas de semillas de uva a una dosis de 375mg/Kg producen una disminución significativa de la síntesis hepática de triacilgliceroles.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral se estudia el efecto del GSPE sobre la hipertensión arterial. En primer lugar evaluando *in vitro* el efecto de 17 flavonoides sobre la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), enzima clave en el control de la presión arterial, con la intención de establecer las bases estructurales de la bioactividad de los flavonoides y utilizando una aproximación quimioinformática para entender las bases moleculares de la interacción proteína ligando. Los resultados indican que los flavonoides, en su mayor parte son agentes efectivos en la inhibición de la ACE, destacando aquellos que presentan en su estructura un grupo catecol en el anillo B, un doble enlace entre al carbono 2 y 3 en el anillo C y un grupo cetona en el carbono 4 del anillo C.

En cuanto al estudio del efecto del GSPE sobre la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en un modelo animal de síndrome metabólico inducido por dieta de cafetería, los resultados obtenidos indican que el extracto a una dosis de 375mg/kg presenta efecto antihipertensivo a las 6 horas de administración en los dos modelos animales. El efecto antihipertensivo en los animales SHR es claramente endotelio dependiente mediado principalmente por una mejor disponibilidad del óxido nítrico (NO), aunque el efecto vasodilatador de la prostaciclina PGI₂ también parece estar implicado, y está asociado a una disminución del estrés oxidativo, sin presentar efecto sobre la actividad de la ACE.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que el GSPE exhibe efecto tanto a nivel de la síntesis de lípidos hepáticos principalmente los triacilgliceroles, y un efecto antihipertensivo, tanto en animales con hipertensión esencial como en un modelo de síndrome metabólico, por lo que creemos podría considerarse potencialmente un ingrediente funcional para ser empleado como coadyuvante en el manejo dietario y farmacológico en patologías como el síndrome metabólico, dislipidemias e hipertensión.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

The regular consumption of flavonoids has been associated with a reduction in mortality per age range, and a decrease in the risk of developing cardiovascular diseases. Grapes and wine are considered an important source of flavonoids, mainly the proanthocyanidin types. Our group has demonstrated that proanthocyanidin extract from grape seeds (GSPE) corrects homeostatic deviations associated with risk situations in the development of pathologies related with metabolic syndrome, for it improves insulin resistance, decreases inflammation and improves the lipid profile and the hepatic lipid content. It has also been able to solve in part, the mechanisms involved in these processes. In this Doctoral Thesis, the research group starts studying GSPE in relation to hypertension, initially in an essential hypertension experimental model and later about arterial pressure associated with metabolic syndrome, with the idea of laying the foundations for the development of functional ingredients from proanthocyanidins presenting a simultaneous effect in risk prevention of dyslipidemia and hypertension, two of the most common pathologies associated with metabolic syndrome.

Our *in vitro* results show that the different types of proanthocyanidins present in the studied extracts (pine, cocoa, and grape extracts) induce a decrease in *de novo* cholesterol synthesis, triglycerides and cholesterol esters in hepatic cells (HepG2). However, in recent years, the fact of using extracts for the *in vitro* evaluation of the biological effect of flavonoids has been argued, due to the fact that because of the structural transformations that flavonoids undergo during their metabolism, the bioactive forms that are found in blood and that reach the tissue are different from the ones present in food. We have therefore used a system that allows us to evaluate physiological molecules on HepG2 cells. For this we incubated hepatic cells with rat serum treated with different doses of GSPE extract, and correlated present molecules in the added serum with the metabolic effects. The results obtained indicate that the predominant compounds in the serum are proanthocyanidin conjugates, mainly glucuronidated, and that they also appear in a dose-dependent form. Later, we verified that the compounds present in the serum exhibit a reducing effect of the *de novo* lipid synthesis in HepG2 cells, with the effect on triglycerides being

especially noticeable. Finally, we evaluated the effect of GSPE on the homeostasis of lipids in a diet-induced metabolic syndrome animal model, finding that *in vivo*, grape seed proanthocyanidins at a dose of 375mg/Kg produce a significant decrease in the hepatic synthesis of triglycerides.

In the second part of the Doctoral Thesis the effect of GSPE on arterial hypertension is studied. First evaluating the *in vitro* effect of 17 flavonoids on the activity of the angiotensin converting enzyme (ACE), key in the control of arterial pressure, and with the intention of establishing the structural basis of flavonoid bioactivity, and using a cheminformatic approximation to understand the molecular basis of ligand protein interaction. Results indicate that flavonoids are mainly effective agents in the inhibition of ACE, highlighting those that present a catechol group in ring B, a double link between carbon-2 and 3 in ring C, and a ketone group in carbon-4 of ring C.

Regarding the study of the effect of GSPE on arterial pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR), and in a metabolic syndrome animal model induced by a cafeteria diet, the results obtained indicate that the extract at a dose of 375mg/Kg has an antihypertensive effect 6 hours after administration in the two animal models. The antihypertensive effect in SHR animal is clearly endothelium dependent, mediated mainly by better nitric oxide (NO) availability, although the vasorelaxant effect of prostacyclin PGI₂ also seems to be involved, and is associated to a decrease in oxidative stress without presenting an effect on ACE activity.

In conclusion, the results obtained in this Doctoral Thesis suggest that GSPE exhibits an effect both at a hepatic lipid synthesis, mainly the triglycerides, and an antihypertensive effect, in animals with essential hypertension as well as in a metabolic syndrome model, so we think that it may be considered potentially functional ingredient to be used as a coadjuvant in the dietary and pharmacological management of pathologies such as metabolic syndrome, dyslipidemia, and hypertension.

Lista de Abreviaturas



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

ACE	Enzima convertidora de angiotensina
ACEI	Inhibidor de la actividad de la ACE
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Apo B	Apolipoproteína B
AT 1-7	Angitensinógena 1-7
ATPasa	Adenosintrifosfatasa
Brk	Bradiquinina
BP	Presión arterial
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CE	Ésteres de colesterol
CETP	Proteína transportadora de ésteres de colesterol
COX	Ciclooxigenasa
CVD	Enfermedad cardiovascular
DAG	Diacilgliceroles
DCP1	Dipeptidil carboxipeptidasa I
DM	Diabetes Mellitus
DBP	Presión arterial diastólica
ED	Disfunción endotelial
EDHF	Factor polarizante derivado del endotelio
EDNO	Óxido nítrico derivado del endotelio
eNOS	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1	Endotelina-1
ER	Retículo endoplasmático
FAS	Ácido graso sintasa
FC	Colesterol libre

GSPE	Extracto de proantocianidinas de semillas de uva
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HTA	Hipertensión arterial
LCFA	Ácidos grasos de cadena larga
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Lipasa hepática
L-NAME	L-Nitro arginina metil éster
LP	Lipasa pancreática
LPL	Lipoproteinlipasa
MAG	Monoacilgliceroles
MDA	Malondialdenido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido Nítrico
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
O₂⁻	Anión superóxido
PA	Proantocianidinas
PAF	Factor activador de plaquetas
PGI₂	Prostaciclina I ₂
PPAR γ	Receptor de peroxisoma proliferador activado gamma
QM	Quilomicrones
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTC	Transporte reverso del colesterol
SBP	Presión arterial sistólica
sACE	Isoforma somática de la enzima convertidora de angiotensina
sdLDL	Lipoproteínas de baja densidad pequeñas y densas

SEM	Error estándar de la media
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SM	Síndrome metabólico
SMC	Células musculares lisas
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
tACE	Isoforma testicular de la enzima convertidora de angiotensina
TAOS	Estado antioxidante total
TG	Triacilglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Introducción



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

1. 1. Polifenoles

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos más numerosos y ubicuos de las plantas, forman parte integral de la dieta humana y animal. La mayoría de estos compuestos son definidos como metabolitos no esenciales para los procesos bioquímicos de las plantas [Borriello et al., 2010], pero están involucrados en procesos tales como crecimiento, lignificación, pigmentación, polinización, inhibición del crecimiento de patógenos, protección contra radiaciones UV y estrés oxidativo [Scalbert et al., 2002; Fraga, 2010a]. Desde un punto de vista estructural incluyen desde moléculas fenólicas simples, hasta compuestos altamente polimerizados, con pesos moleculares de más de 30.000 Da [Bravo, 1998]. Las plantas suministran a la dieta humana más de 8.000 diferentes polifenoles que pueden ser clasificados en función de su estructura química, como flavonoides y no-flavonoides [Fraga, 2010a] (tabla 1).

Las principales fuentes son frutas, bebidas como el té, café, vino y zumos de frutas, chocolate y en un menor porcentaje vegetales, cereales y semillas de leguminosas [Scalbert et al., 2002]. Tras su ingestión y absorción posterior, los polifenoles son por lo general, transformados estructuralmente en el intestino y posteriormente en el hígado que los trata como xenobióticos, siendo las moléculas que alcanzan la circulación periférica y los tejidos diferentes de las inicialmente presentes en los alimentos. Los compuestos derivados o metabolitos resultantes son formas conjugadas de los anteriores, normalmente como sulfatos y glucuronatos. El catabolismo completo de los polifenoles en los seres humanos, por lo general, sólo se produce como resultado de la actividad microbiana en el intestino grueso [Kroon et al.; 2004].

Tabla 1: Clasificación de los polifenoles de acuerdo a su estructura química

CLASIFICACIÓN DE LOS POLIFENOLES DE ACUERDO A SU ESTRUCTURA QUÍMICA	
Clase	Ejemplos
No flavonoides	
• Ácidos Fenólicos	Ácido cafeico, Ácido ferúlico
• Estilbenos	Resveratrol
Flavonoides	
• Flavonoles	Quercetina, Kaempferol, Miricetina
• Flavonas	Luteolina, Apigenina
• Isoflavonas	Daidzeina, Genisteina
• Flavanonas	Hesperetina, Naringenina
• Flavanoles	
• Catequinas (monómeros)	Catequina, Epicatequina
• Proantocianidinas (polímeros)	Procianidinas
• Antocianidinas	Cianidina, Delfinidina

1.1.1. Flavonoides

Flavonoides (del latín *flavus* “amarillo”) es el término genérico con el que se identifica una clase de metabolitos secundarios de los vegetales que constituyen una familia de moléculas aromáticas derivadas de la fenilalanina y el malonil-coenzima A [Winkel-Shirley, 2001]; incluye más de 6.500 moléculas cuya estructura está basada en un esqueleto de 15 carbonos [Corradini et al., 2011]. Los flavonoides comprenden un grupo diverso de compuestos polifenólicos, que tienen el mismo origen biosintético, un elemento estructural básico común con diferentes grados de oxidación dando lugar a las distintas familias estructurales [Ballester et al., 2006].

1.1.2. Estructura Química de los Flavonoides

Químicamente los flavonoides son fenilbenzopironas; forman una familia de estructuras basadas en un núcleo común de tres anillos, incluye dos anillos de benceno (A y B) unidos a un heterociclo de pirano o pirona (con un doble enlace) que corresponde al anillo C central [Middleton et al., 2000] (Figura1).

Durante su síntesis los flavonoides sufren diferentes modificaciones químicas, tales como hidrogenaciones, hidroxilaciones, sulfuraciones, metilaciones y acetilaciones, así como también la incorporación de distintos restos azucarados, dando lugar a la gran diversidad de flavonoides que se pueden encontrar en la naturaleza [Ballester et al., 2006]. Las glucosilaciones presentes en los flavonoides, hacen que estos sean menos reactivos, más polares y por lo tanto más solubles en agua; estas modificaciones pueden ser consideradas como formas de protección de las plantas para prevenir daños citoplasmáticos y almacenar los flavonoides en las vacuolas celulares [Corradini et al., 2011]. Los flavonoides se clasifican según los grupos funcionales que posean en: flavanoles, flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanonas (figura 1). Esta subdivisión se basa en la presencia (o ausencia) de un doble enlace en la posición 4 del anillo C, la presencia (o ausencia) de un doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo C, y la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B. En la estructura de los flavonoides, el grupo fenilo normalmente es substituido en la posición 2 por un anillo de pirona y en los isoflavonoides la substitución se realiza en la posición 3 [Middleton et al., 2000].

Los flavonoles se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C3, representan el grupo más ubicuo de polifenoles presente en los alimentos y los compuestos más comunes de éste grupo de flavonoides son la quercetina y el kaempferol [Quiñones et al., 2012, Del Rio et al., 2012]. Las principales fuentes alimentarias son las cebollas, la col rizada, los puerros, el brócoli y los arándanos. La síntesis de estos polifenoles es estimulada por la luz, de esta manera frutos de un mismo árbol pueden presentar diferentes concentraciones dependiendo su nivel de exposición a la luz [D'Archivio et al., 2007].

Las flavonas son los flavonoides menos comunes, tienen un doble enlace entre el C2 y el C3. El perejil y el apio representan las únicas fuentes importantes comestibles de flavonas y la piel de las frutas contiene cantidades

importantes de flavonas polimetoxiladas [D'Archivio et al., 2007]. Las flavanonas se caracterizan por la presencia de un centro quiral en la posición C2 y por la ausencia del doble enlace entre el C2 y el C3, generalmente se encuentran glucosiladas en el C7, usualmente rutinósidos (6-*O*-ramnosil-D-glucosidos) y neohesperidosidos (2-*O*- α -L-ramnosil-D-glucósidos) [Corradine et al., 2011]. Las flavanonas están presentes en altas concentraciones en frutas cítricas aunque también se hallan en tomates y ciertas plantas aromáticas como la menta. Las principales formas son la naringenina en pomelo, la hesperetina en naranjas y el eriodictiol en limones [D'Archivio et al., 2007].

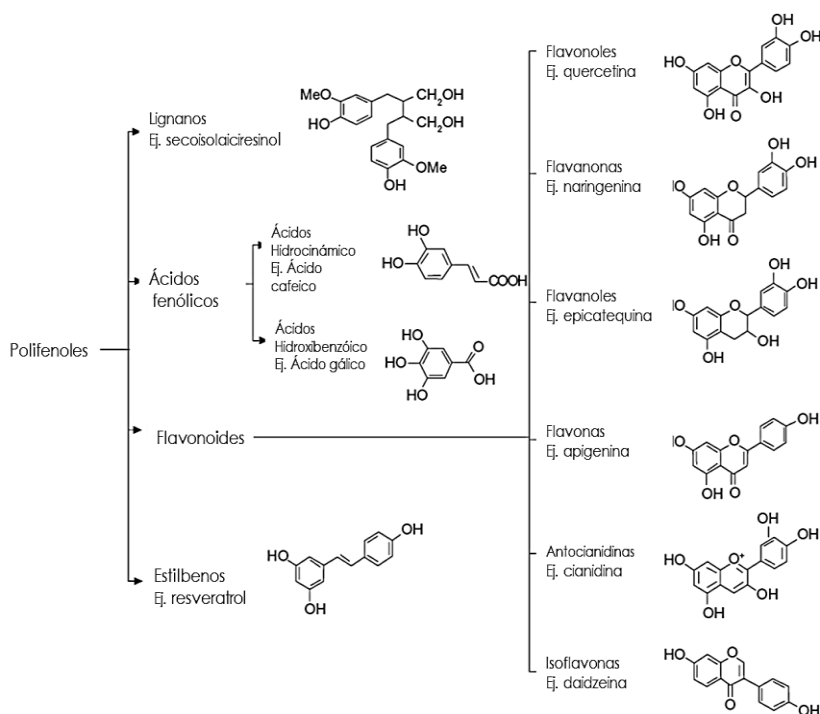
Las isoflavonas, son flavonoides con estructura similar a la de los estrógenos, tienen un grupo hidróxilo en la posición C4' y C7 en una configuración análoga a la del estradiol. Esta característica les confiere la propiedad de unirse al receptor de estrógenos, actuando como una pseudohormona, motivo por lo cual también son clasificadas como fitoestrógenos. La soja y sus derivados son las principales fuentes en la dieta humana, se encuentran especialmente en tres formas moleculares: genisteína, daidzeína y gliciteína, normalmente en una concentración de 1:1:0.2 [Manach et al., 2004; Corradini et al., 2011].

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, responsables de la mayoría de los colores rojo, azul, y púrpura de frutas, hortalizas, flores y otros tejidos vegetales [Corradine et al., 2010]. Las antocianinas se encuentran principalmente en la piel, excepto para ciertos tipos de fruta roja, en el que también se producen en carne y hueso (cerezas y fresas) [Manach et al., 2004]. El contenido en los alimentos es generalmente proporcional a la intensidad del color y la concentración se incrementa con el grado de madurez de la fruta [D'Archivio et al., 2007].

Finalmente, los flavan-3-oles, pueden aparecer como monómeros (catequinas o unidades de flavan-3-ol) o como oligómeros condensados entre sí, también llamados proantocianidinas (PA). Las PA se pueden encontrar como polímeros de hasta 50 unidades o taninos condensados [Del Rio et al.,

2012]. Es bastante complejo valorar el contenido de PA en los alimentos, debido a que poseen un amplio rango estructural y pesos moleculares muy variables [Rasmussen et al., 2005]. Los dos centros quirales en el C2 y el C3 de los monómeros producen 4 isómeros, de los cuales la (+)-catequina y la (-)-epicatequina se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza [Aron-Kennedy, 2008; Crozier et al., 2009]. Las PA se clasifican en tipos según su conformación estructural, la PA de tipo B se forman a partir de la (+)-catequina y la (-)-epicatequina por acoplamiento oxidativo entre el C4 del monómero superior y el C6 o el C8 de la unidad o extensión adyacente inferior para crear oligómeros o polímeros. Las PA de tipo A tienen un enlace éter adicional entre el C2 en el anillo B de uno de los monómeros y en el C7 del anillo A del otro monómero [Del Rio et al., 2012].

Figura 1. Clasificación y estructura química de las principales clases de polifenoles dietarios [Spencer et al., 2008]



1.1.3. Absorción y Metabolismo de los flavonoides

Los flavonoides liberados de las matrices alimentarias durante el proceso de digestión, son potencialmente biodisponibles o susceptibles de ser absorbidos por la barrera intestinal [Saura-Calixto et al., 2007]. Su biodisponibilidad varía ampliamente entre polifenoles, para algunos compuestos depende de las fuentes dietarias o de los subgrupos funcionales que contengan. Los polifenoles mejor absorbidos en los humanos son las isoflavonas y el ácido gálico, seguidos por las catequinas, flavanonas y glucósidos de quercetina [Scalbert et al., 2002].

La mayoría de los flavonoides dietarios presentes en los alimentos se encuentran en la forma de *O*-glucósidos, ésteres sulfato y *O*-metil éter; los azúcares más comunes en los glucósidos son la D-glucosa, la L-ramnosa, la glucoramnosa, la galactosa y la arabinosa. El enlace β de estos glucósidos es resistente a la hidrólisis de las enzimas pancreáticas, aunque en el intestino delgado se han identificado β -endoglucosidasas capaces de hidrolizar los glucósidos presentes en algunos flavonoides [Heim et al., 2002; Scalbert et al., 2002].

Tras su absorción los polifenoles sufren modificaciones estructurales como metilaciones, sulfataciones y/o glucuronidaciones; estos procesos aumentan la hidrofiliidad del compuesto y facilitan su excreción por vía urinaria o biliar. La frecuencia de estas modificaciones está condicionada por la naturaleza y la dosis del flavonoide ingerido [Heim et al., 2002; Scalbert et al., 2002]. La absorción en el intestino delgado de las PA es limitada debido a su estructura polimérica, que les confiere un alto peso molecular, sobre todo cuando se trata de compuestos con estructura superior a trímeros [Prasain et al., 2010].

El metabolismo de los flavonoides se produce a través de una secuencia de reacciones común para todos ellos, que es similar a la detoxificación metabólica que sufren muchos xenobióticos [Manach et al., 2004]. Como consecuencia de estos procesos, las formas que se encuentran en el plasma y

en los tejidos son muy distintas de las que están presentes en los alimentos, lo que dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica [Day et al., 2001; Natsume et al., 2003]. Los metabolitos circulantes se pueden unir a las proteínas presentes en el plasma, principalmente a la albúmina, aunque la afinidad de los flavonoides por la albúmina varía en función de su estructura química [Dufour-Dangles, 2005; Bolli et al., 2010]. La concentración de flavonoides en el plasma es muy variable; depende principalmente de su estructura química y de su fuente de origen [Van Het Hof et al., 1999]; aunque no suele ser superior a $1\mu\text{M}$, mientras que en el caso de los metabolitos es de aproximadamente $10\mu\text{M}$ [Manach et al., 2004]. Los flavonoides que no se pueden absorber en el intestino delgado alcanzan el colon, y allí la microflora hidroliza los glucósidos en agliconas y metaboliza masivamente las agliconas principalmente en ácidos fenólicos de bajo peso molecular y catabolitos aromáticos que posteriormente son absorbidos y pasan al torrente circulatorio [Setchell et al., 2002, Del Rio et al., 2012].

1.1.4. Efectos beneficiosos de los flavonoides

Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre el consumo de dietas altas en frutas y vegetales, y la incidencia de algunas patologías como el cáncer, la enfermedad cardiovascular (CVD) y algunos desordenes neurodegenerativos. Los efectos beneficiosos asociados a estas dietas están relacionados con la presencia de algunos flavonoides y otros compuestos fenólicos [Actis-Goretta et al., 2006, Fraga et al., 2010b]. Se han realizado un número significativo de estudios tanto en humanos como en modelos animales, analizando el efecto de extractos de polifenoles, moléculas puras o alimentos y bebidas ricas en flavonoides sobre la progresión de factores de riesgo asociado a la CVD. El efecto protector de los polifenoles de la dieta en el riesgo vascular y su capacidad para disminuir la incidencia de eventos isquémicos puede ser atribuido en parte, a la capacidad que tienen estas moléculas de retardar la progresión de lesiones ateroscleróticas y el avance de las placas aterogénicas [Stoclet et al., 2004]. Los beneficios de las

dietas ricas en frutas y vegetales sobre la CVD se han atribuido a los flavonoides en general y más específicamente a los flavonoles [Perez-Vizcaino-Duarte, 2010].

1.1.4.1. Efecto Antioxidante de los flavonoides

Inicialmente los efectos beneficiosos de los flavonoides se relacionaron con su potente capacidad antioxidante [Bravo, 1998] o de neutralizar las especies de radicales libre (ROS) [Martínez-Flórez et al., 2002]. El mecanismo por el cual los flavonoides ejercen su función antioxidante no ha sido elucidado totalmente [Morales et al., 2012]; así, ensayos *in vitro* han demostrado que la actividad antioxidante de los flavonoides depende de sus grupos funcionales localizados en el núcleo de la estructura. Tanto la configuración como el número total de grupos hidróxilo influyen en el mecanismo antioxidante [Heim et al., 2002]. La actividad antioxidante puede ser incrementada por la polimerización de los monómeros de flavonoides como ocurre con las PA, con una capacidad antioxidante más alta debido al mayor número de grupos OH [Procházková et al., 2011]. En la parte superior del tracto gastrointestinal los polifenoles son capaces de producir la reducción química directa de hidroperóxidos de los alimentos ingeridos, contribuyendo a contrarrestar el estrés oxidativo postprandial [Sies, 2010].

A nivel celular y tisular los flavonoides cumplen su función protectora contra los daños provocados por las especies reactivas de oxígeno a través de diferentes mecanismos, entre los que se han descrito:

- a. Depuración directa de las ROS [Procházková et al., 2011]
- b. Activación de enzimas antioxidantes [Nijveldt et al., 2001]
- c. Capacidad quelante de metales [Ferrali et al., 1997]
- d. Inhibición de oxidasas [Cos et al., 1998; Heim et al., 2001]
- e. Inducción de la expresión de elementos de respuesta presentes en algunos genes involucrados con la expresión de enzimas detoxificantes [Lee-Hilz et al., 2006].

Los flavonoides pueden actuar como antioxidantes o pro-oxidantes dependiendo la concentración en la que se encuentren en los sistemas biológicos; algunos autores han asociado el papel pro-oxidante de los flavonoides con la expresión de enzimas que contrarrestan el estrés oxidativo [Procházková et al., 2011]. Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles muestran efectos vasodilatadores, antitrombóticos y antiinflamatorios [Dell'Agli et al., 2004; Schroeter et al., 2006]. Aunque la actividad antioxidante ha sido tradicionalmente atribuida sólo a los compuestos fenólicos solubles, o polifenoles extraíbles, algunos trabajos sugieren que los polifenoles no extraíbles (PA poliméricas hidrolizables de alto peso molecular) son 15-30 veces más eficaces en la extinción de radicales peroxilo que los fenoles simples; por otra parte, aquellos flavonoides que no se absorben podría ejercer efectos locales en el tracto gastrointestinal de protección de macromoléculas [Martin-Appel, 2010].

1.1.4.2. Efecto de los flavonoides sobre el metabolismo lipídico

El consumo de alimentos fuentes de flavanoles como las uvas, el vino rojo, las cerezas, las manzanas, el chocolate y el té se ha relacionado con un aumento en la actividad anti-aterogénica, a través de la reducción plasmática de los niveles de apolipoproteína B (ApoB), disminución de los niveles de triacilglicérolos (TG) y mejoría en el perfil sérico de colesterol [Bladé et al., 2010]. Los flavonoides manifiestan un efecto hipolipemiante como resultado de su capacidad de reducir la absorción de lípidos dietarios, disminuir la secreción de los quilomicrones (QM) por los enterocitos e inhibir la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado [Adiels et al., 2006; Therond, 2009].

Las flavonas y los flavanoles pueden formar enlaces hidrofóbicos con proteínas y enzimas involucradas en la lisis de los TG, generando agregados moleculares como sucede en el caso de la lipasa pancreática, estas modificaciones estructurales bloquean la actividad de esta enzima e inhiben su acción lipolítica [Yoshikawa et al., 2002; Yoshizumi et al., 2006].

Adicionalmente diversas investigaciones han revisado el efecto de los flavonoides sobre la síntesis de colesterol y su secreción en modelos celulares, animales y en humanos. En células HepG2 (células de hepatoma humano) se ha observado que según el tipo de flavonoide y la dosis empleada se puede inhibir o estimular la síntesis de colesterol; se ha determinado que en este modelo celular la inhibición de la síntesis de colesterol ocurre a través de un mecanismo indirecto que modula la actividad de la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa [Gebhardt, 2001]. Otros estudios indican que los flavonoides del vino rojo (des-alcoholizado) reducen la producción de ApoB100 e incrementan la expresión del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en células HepG2 [Pal et al., 2003].

En modelos animales se ha observado un efecto hipocolesterolemizante para catequinas del té, naringenina y naringina [Yang-Koo, 2000; Miura et al., 2001; Lee et al., 2003]. Algunos flavonoides pueden inhibir la absorción de colesterol mediante la formación de co-precipitados de colesterol, de ésta manera interfieren con la solubilidad micelar del colesterol, paso esencial en la absorción intestinal de este compuesto [Ikeda et al., 1992]. En células Caco-2 (células humanas de cáncer de colon) se ha determinado que los flavonoides afectan la esterificación del colesterol [Vidal et al., 2005] y reducen los niveles de colesterol libre (FC) y de colesterol total [Pal et al., 2005].

El consumo de polifenoles del vino tinto y zumo de uva negra, incrementa la capacidad antioxidante del plasma y reducen las LDL circulantes [Carbonneau et al., 1997]. *In vivo* los polifenoles pueden inhibir la oxidación de las LDL por interacción directa o por estimulación de mecanismos de defensa endógenos contra el estrés oxidativo [Stoclet et al., 2004; Prasain et al., 2010]. Los polifenoles pueden estimular el incremento en la síntesis de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuir la oxidación de las LDL [Nigdicar et al., 1998], e incrementar el nivel de antioxidantes tanto en plasma como a nivel celular generando resistencia al estrés oxidativo [Pignatelli et al., 2006; Micallef et al., 2007].

Las antocianinas pueden disminuir los lípidos en sangre y aminorar la esteatosis hepática [Seymour et al., 2008]. Experimentalmente se ha determinado que las antocianinas pueden estimular la activación de proteínas quinasas C en células HepG2, proceso que produce la fosforilación de una de las subunidades de la adenosintrifosfatasa ATPasa, suprimiendo de esta manera su activación y consecuentemente reduciendo la síntesis *de novo* de los lípidos, inducida por altos niveles de glucosa [Guo et al., 2011].

Los oligómeros de PA de la cáscara de maní pueden disminuir la expresión del mRNA de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos como la ácido graso sintasa (FAS) [Tatsuno et al., 2012], la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c), la acetil CoA carboxilasa (ACC1) y algunos genes involucrados en el metabolismo de los lípidos como los PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptors) [Bansode et al., 2012].

Además, las PA han demostrado mejorar la hipertrigliceridemia postprandial en modelos animales [Bladé et al., 2010] y la ingestión de alimentos ricos en PA, como el vino tinto, se ha relacionado con una disminución de los lípidos plasmáticos en humanos [Zern et al., 2005]. La concentración plasmática de TG es el resultado del equilibrio entre la secreción de lipoproteínas ricas en TG por el intestino y el hígado, y su captación por parte de los tejidos extrahepáticos a través de la lipoproteinlipasa (LPL). Las lipoproteínas ricas en TG que se encuentran en el plasma se originan ya sea en el hígado (VLDL) o en el intestino (QM). El efecto hipotrigliceremiante de las PA se ha atribuido tanto a una inhibición de la absorción de lípidos de la dieta asociada con una reducción de la secreción de los QM por los enterocitos [Vidal et al., 2005; Sugiyama et al., 2007], como a una disminución de la secreción de las VLDL por el hígado [Del Bas et al., 2008; Quesada et al., 2009; Baiges et al., 2010].

1.1.4.3. Efecto de los flavonoides sobre la función endotelial

El efecto de los flavonoides sobre la función endotelial ha sido analizado principalmente en modelos animales con CVD incluyendo HTA, síndrome metabólico (SM) y estrés oxidativo. La mayoría de los datos soportan la evidencia de que los flavonoides son capaces de mejorar la disponibilidad del óxido nítrico (NO) [Kim et al., 2000; Mishra et al., 2000; Zhang et al., 2002] e incrementar la vasodilatación dependiente del endotelio tanto en sujetos sanos como en diferentes condiciones patológicas. El consumo crónico de flavonoides está asociado con un aumento en la excreción urinaria de nitritos y nitratos los cuales son metabolitos del NO; también se ha relacionado con la inhibición de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE), las cuales afectan negativamente la vía del NO [Jiménez et al., 2012].

En el tracto gastrointestinal, los polifenoles dietarios pueden producir NO utilizando como fuente los nitratos estomacales e inducir relajación del músculo liso; en este caso los nitratos pueden ser considerados como precursores del NO [Sies, 2010]. En el endotelio, los efectos beneficiosos de los flavonoides se atribuyen principalmente a su capacidad de interactuar con el sistema del NO derivado del endotelio (EDNO) y mejorar su disponibilidad, evitando la desaparición del NO por interacción directa con los aniones súper óxido y otros radicales libres. Además, los flavonoides son capaces de incrementar la producción de EDNO a través del aumento de la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) [Ajay et al., 2006; Akhlaghi-Bandy, 2009].

Los flavonoides pueden estimular la relajación de los vasos sanguíneos por un mecanismo dependiente del endotelio o producir relajación por vías alternas independientes de éste tejido [Andriambelosom et al. 1997; Jochmann et al., 2008]. La vasodilatación se ha atribuido a la acción directa de los flavonoides sobre el músculo liso vascular [Mishra et al., 2000; Zhang et al., 2002; Ajar et al., 2003], efecto que depende de la relación estructura-actividad, es por ésta

razón que todos los flavonoides no producen el mismo grado de relajación [Hiipakka et al., 2002; Taubert et al., 2002; Chen et al., 2003].

Adicionalmente, algunos flavonoides inducen fosforilación de la proteína quinasa B (Akt) y subsecuente fosforilación de la eNOS en Ser1177 en células endoteliales, activando de esta forma a la eNOS y estimulando por lo tanto la síntesis del NO [Stoclet et al., 2004]. Hay estudios que han confirmado que este mecanismo activado por el Ca^{2+} , también es estimulado por los flavan-3-oles presentes en el té verde mediante la fosforilación de eNOS en Ser1179 [Lorenz et al., 2004]. En células endoteliales los polifenoles pueden incrementar las concentraciones de Ca^{2+} tanto por estimulación de su liberación desde las reservas intracelulares, como por estimulación de la entrada del Ca^{2+} desde el medio extracelular [Martin et al., 2002]. El aumento del Ca^{2+} por acción de los polifenoles ocurre como resultado de un incremento en la producción de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) relacionado con el efecto prooxidante, el cual es inhibido por la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa [Duarte et al., 2004]. Los estudios sugieren que el efecto de los polifenoles sobre los niveles de NO puede ocurrir por estimulación en la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dentro de las células, estimulando así la actividad de la eNOS y a través de la depuración del $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el líquido intersticial (preservando de esta forma el NO) [Akhlaghi-Bandy, 2009] (figura 2).

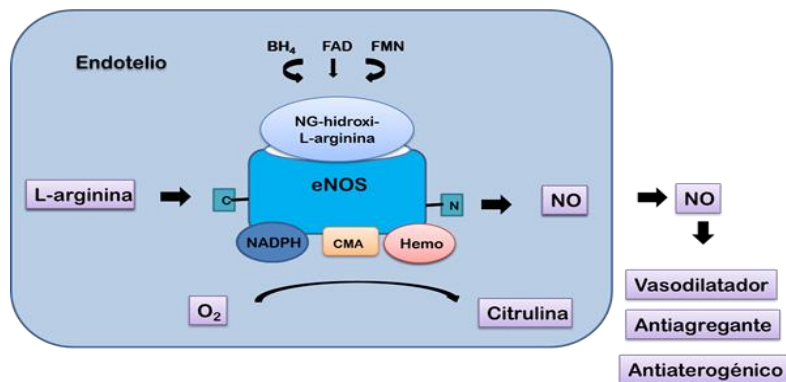


Figura 2. NO, síntesis y funciones. El NO es producido principalmente por los leucocitos, las neuronas y las células endoteliales. La eNOS sintetiza NO a partir de su sustrato la L-arginina mediante oxidación por medio del intermediario NG-hidroxi-L-arginina. (BH₄: tetrahidropteridina, eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; C: extremo carboxilo terminal; N: extremo amino terminal; CMA: calmodulina). [Adaptado de Acosta et al., 2006; Martínez-Agustín-Sánchez de M, 2004].

1.1.4.4 Efecto de los flavonoides sobre la Hipertensión

Existen múltiples evidencias científicas que avalan la relación entre estrés oxidativo e HTA, y la disfunción endotelial (ED) que se asocia a la HTA se vincula a su vez a un exceso de radicales libres y las ROS capaces de destruir el NO [Touyz-Schiffirin, 2008]. Estudios clínicos han demostrado que los pacientes hipertensos presentan un incremento en la producción de las ROS y una disminución en las defensas antioxidantes. Así, en condiciones patológicas el incremento de la actividad de las ROS genera ED, un aumento de la contractilidad del músculo liso vascular, un crecimiento de este tejido, invasión de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de los depósitos proteicos de la matriz extracelular [Kumar-Das, 1993].

La producción de las ROS, también puede aumentar en otros órganos como el corazón, el sistema nervioso y los riñones, órganos y tejidos relacionados con el control de la presión arterial (BP) [Touyz-Schiffirin, 2004; Münzel et al., 2008]. Debido al papel fundamental del estrés oxidativo en el

desarrollo de la HTA se ha sugerido que terapias antioxidantes podrían ejercer una influencia beneficiosa en esta patología [Paravicini-Touyz, 2008]. De hecho, dos de los grupos farmacológicos más importantes para el tratamiento de la HTA, los inhibidores de la actividad de la ACE y los antagonistas de los receptores AT1 de la angiotensina II (Ang II), se comportan también como antioxidantes [Miana et al., 2012]. La utilización de suplementos antioxidantes como terapia para la HTA ha suscitado sin embargo cierta controversia, y los resultados obtenidos con ellos hasta el momento no son consistentes [Paravicini-Touyz, 2008].

Los ensayos con dietas antioxidantes, han indicado por el contrario que el alto consumo de alimentos ricos en antioxidantes muestra efectos beneficiosos sobre la HTA [Ceriello, 2008; Paravicini-Touyz 2008]. Así, por ejemplo, el consumo elevado de frutas y verduras en la dieta, reduce la BP e incrementa la capacidad antioxidante del plasma de sujetos hipertensos y obesos [Appel et al., 1997]. Diferentes mecanismos podrían justificar las propiedades antihipertensivas de los flavonoides. La vasodilatación ocasionada por estos compuestos se ha relacionado con la reducción del estrés oxidativo [Duarte et al., 2001; Peng et al., 2005] y también con la producción de NO [Fraga et al., 2011c]. Sin embargo, es posible que otros mecanismos de acción estén también implicados en el efecto antihipertensivo de los flavonoides. De hecho, varios estudios han demostrado que ciertos alimentos ricos en flavonoides, y también los propios flavonoides, inhiben la ACE *in vitro* [Actis-Goretta et al., 2006; Ottaviani et al., 2006]

1.1.5 Fuentes alimentarias de flavonoides

La diversidad estructural de los polifenoles hace que la estimación del contenido de estos en los alimentos no sea fácil [Scalbert-Williamson, 2000]; además los polifenoles no se distribuyen uniformemente en los tejidos vegetales y el fraccionamiento de los alimentos durante los procesos puede resultar en una pérdida o enriquecimiento de algunos compuestos fenólicos [Burda et al., 1990]. Las frutas y bebidas como el té y el vino rojo constituyen

las principales fuentes de flavonoides; en muchos casos, los alimentos contienen complejas mezclas de polifenoles [Guyot et al., 1998]. También los factores ambientales tienen un efecto importante sobre el contenido de flavonoides, por ejemplo factores que pueden ser de tipo edáficos, climáticos (exposición al sol, la lluvia) o agronómicos (cultivo en invernaderos o campos, cultivo biológico, cultivo hidropónico, rendimiento de fruto por árbol, etc.). En general, las concentraciones de ácidos fenólicos disminuyen durante la maduración, mientras que aumentan las concentraciones de antocianinas [Clifford, 2000].

El consumo promedio de polifenoles se ha considerado aproximadamente de 23mg/día, excediendo el consumo diario de vitamina E y β -caroteno. La ingesta de polifenoles varía entre países, así se han reportado valores tan bajos de 2.6mg/día en Japón hasta valores de 68.2mg/día en Finlandia [Nijveldt et al., 2001]. En los seres humanos, la ingesta media diaria de polifenoles se estima en alrededor de 1 g/día, aunque depende mucho de la dieta de cada individuo, especialmente de su aporte de fruta y verdura [Scalber- Williamson, 2000].

Las frutas y los zumos de fruta son unas de las principales fuentes de polifenoles en la dieta humana considerando el contenido por porción aproximadamente 100–400mg [Lotito-Frei, 2006]. Una manzana aporta 400mg de fenoles expresado en equivalentes de ácido gálico [Lotito-Frei, 2004], las peras y las uvas por porción pueden contener aproximadamente 300mg de fenoles, una porción de arándanos o cerezas aporta entre 200 a 400mg de fenoles [Vinson et al., 2001]. Los vegetales como la espinaca, el brócoli y las cebollas también aportan cantidades significativas de polifenoles a la dieta humana [Chu et al., 2002]. Otros alimentos derivados de plantas y algunas bebidas también contribuyen al total de fenoles en la alimentación, por ej. el café, el vino, el té, el chocolate, cacao y la cerveza presentan una alta actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* [Shivashakara-Acharya, 2010], efecto que ha sido atribuido exclusivamente a los polifenoles presentes en estos alimentos. El vino tinto contiene por cada 200mL un total de 200–500mg de fenoles dependiendo

del tipo y la variedad [Lotito et al., 2002; Actis-Goretta et al., 2002], el total de fenoles en el vino blanco es mucho menor, aproximadamente 40 a 60 mg por cada 200mL; el contenido total de fenoles en la cerveza es de 50 a 100mg en 200mL [Lotito et al., 2002]. El chocolate negro contiene aproximadamente 340mg de fenoles por porción de 40g [Scalbert-Williamson, 2000].

1.1.6. Extracto de proantocianidinas de semilla de uva (GSPE)

El GSPE es una mezcla de PA derivadas de flavan-3-oles de la clase de los flavonoides, que se encuentran ampliamente distribuidas en las semillas de la uva [Devi et al., 2011]. Estudios previos muestran que los compuestos fenólicos presentes en el GSPE y su formas metabólicas son considerados como antioxidantes [Puiggròs et al., 2005; Devi et al., 2011], agentes insulinomiméticos [Pinent et al., 2004; Castell-Auví et al., 2012], moléculas anti-inflamatorias [Terra et al., 2007; Martínez-Micaelo et al., 2012], agentes involucrados en el metabolismo lipídico [Del Bas et al.; 2008, Baiges et al., 2010], relacionados con el retardo en los procesos de envejecimiento, agentes protectores contra el cáncer y que presentan propiedades antimicrobianas [Xia et al., 2010].

Los extractos de semilla de uva contienen flavonoides (flavan-3-oles catequina y epicatequina y proantocianidinas), ácidos fenólicos (ácido gálico y ácido elágico) y estilbenos (resveratrol y piceido) compuestos que han sido estudiados por su funcionalidad y beneficios para la salud [Keser et al., 2012]. Bagchi et al., reportan que la suplementación con el GSPE en animales y humanos mejora la funcionalidad cardiaca incluyendo una disminución de la cantidad de las ROS y el producto de la peroxidación lipídica malondialdehido (MDA) en procesos de perfusión cardiaca, mejora la función del ventrículo izquierdo posterior a eventos isquémicos, reduce el tamaño del infarto de miocardio y disminuye la fibrilación y la taquicardia ventriculares [Bagchi et al., 2003].

1.1.6.1 Extracto de proantocianidinas de semillas de uva y homeostasis de los lípidos

Diversos estudios han demostrado que el GSPE tiene la capacidad de inhibir algunas lipasas incluyendo la LPL encargada de hidrolizar los TG provenientes de los QM y las VLDL, liberando ácidos grasos que serán captados por los adipocitos; de esta manera la inhibición de LPL puede afectar la absorción de grasas y la captación de lípidos en la periferia. En células 3T3-L1 (línea celular de pre adipocitos), el GSPE puede atravesar la membrana plasmática y reducir la lipólisis, presumiblemente por disminución de la actividad de la lipasa sensible a hormonas (LSH) [Moreno et al., 2003]. Asimismo, el GSPE limita la formación de adipocitos por alteración de la expresión de algunos genes durante la diferenciación de estas células *in vitro*. El análisis por medio de *microarrays* de expresión génica en células 3T3-L1 después de ser tratadas con el GSPE, ha evidenciado una modificación del perfil de expresión génica en la que el ciclo celular y genes relacionados con el crecimiento son limitados por acción del GSPE, afectando la adipogénesis principalmente en la inducción de la diferenciación de las células adiposas; a su vez el GSPE disminuye los niveles de mRNA del receptor de peroxisoma proliferador activado PPAR γ 2 y LSH en este tipo de células [Pinent et al., 2005].

En modelos animales como el hámster, que presentan un perfil lipídico similar a la hipercolesterolemia humana cuando son alimentados con dietas altas en colesterol, el GSPE disminuye el índice de aterosclerosis (porcentaje de la aorta cubierto por células espumosas) entre un 50 y 63% utilizando dosis de 50 y 100mg/Kg respectivamente [Vinson et al., 2001]. En el mismo modelo animal, se ha observado una reducción del colesterol total entre un 25 y 23% y una disminución del nivel de TG entre un 10 y un 34% [Bagchi et al., 2003]. Asimismo, un trabajo reciente indica que la administración oral de una dosis de 25mg/Kg de GSPE durante un periodo de 15 días, produce una reducción de los depósitos de tejido adiposo blanco en zona retroperitoneal, inguinal, epididimal y mesentérica en hámsters alimentados con una dieta alta en grasa;

este efecto se asocia con una mejoría del perfil lipídico en plasma de los animales. Los autores plantean que el posible mecanismo de regulación del GSPE este mediado por la activación de la β -oxidación y del ciclo glicerol libre/ácidos grasos libres en el tejido adiposo [Caimari et al., 2012].

La administración aguda de GSPE reprime la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, TG y colesterol [Del Bas et al., 2008; Del Bas et al., 2009]. En estudios realizados con ratas después de 5 horas de la administración de GSPE, se observa una mejoría de la función mitocondrial en el músculo esquelético con un aumento en la actividad de enzimas involucradas en la oxidación y metabolismo del piruvato. Este hecho acompañado de una disminución en la expresión del gen de la proteína transportadora de ácidos grasos-1 (FATP1) en músculo, sugiere que el GSPE tiene efecto sobre la acumulación de los lípidos a nivel de miocitos [Pajuelo et al., 2011].

Asimismo, en animales normolipidémicos [Del Bas et al., 2005] y con dislipidemia [Quesada, et al., 2009] se ha comprobado que el GSPE reduce los niveles plasmáticos de lipoproteínas ricas en TG y colesterol en el suero de los animales. El efecto hipolipemiante del GSPE se debe en parte a la inhibición de la absorción de los lípidos de la dieta y disminución de la secreción de los QM por parte de los enterocitos. En el hígado el GSPE limita la secreción de las VLDL mediante la represión de la proteína de transferencia microsomal (MTP), la cual es clave en el ensamblaje de las VLDL [Del Bas et al., 2005]. En células HepG2 tratadas con el GSPE se observa la sobreexpresión del receptor nuclear SHP, un receptor nuclear que actúa como un represor inducible de otros receptores nucleares y factores de transcripción. Con este mecanismo, se controla la lipogénesis y el metabolismo del colesterol en el hígado [Bavner et al., 2005]. De esta manera una disminución en los niveles de expresión de SHP podría incrementar la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP1), la que a su vez, induce la sobreexpresión de genes lipogénicos estimulando la hipertrigliceridemia [Del Bas et al., 2008].

1.1.6.2 Efecto antioxidante del extracto de proantocianidinas de semillas de uva

La capacidad antioxidante del extracto de uva ha sido estudiada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Estudios de diferentes grupos han indicado que los extractos de piel y de semilla de uva presentan una alta actividad antioxidante debido a su capacidad de captar los radicales libres. Además estos extractos presentan la capacidad de quelar iones metálicos los cuales son fuertes promotores de la peroxidación lipídica [Fuleki-Da Silva, 1997; Jayaprakasha et al., 2001]. Algunos autores han indicado que el GSPE previene las lesiones provocadas por el estrés oxidativo en células HepG2, mediante la modulación de la expresión de enzimas involucradas en los sistemas antioxidantes [Puiggròs et al., 2005]. Asimismo, también se ha demostrado que la catequina y las PA B4, componentes ambos del GSPE, exhiben propiedades antioxidantes en células esplénicas de ratón [Fan-Lou, 2004].

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del GSPE ha sido demostrada en varios modelos experimentales; así se ha reportado que estos compuestos protegen a las LDL de la oxidación provocada por Cu^{2+} , en modelos celulares (en células esplénicas), previenen el daño del DNA inducido por H_2O_2 y reducen el estrés oxidativo en células PC12 (células de rata derivadas de un feocromocitoma adrenal medular) inducido por la adición de Fe^{2+} y t-butil hidroperóxido [Chanvitayapongs et al., 1997; Shafiee et al. 2003]. Algunos estudios muestran además, que los polifenoles contenidos en la semilla de uva actúan como antioxidantes y ayudan a prevenir la peroxidación de los lípidos e inhiben la producción de las ROS. Por ejemplo la suplementación dietaria con GSPE (600mg/día) durante 4 semanas ha mostrado reducir el estrés oxidativo y mejorar la relación glutatión/glutatión oxidado (GSH/GSSG) y el estado antioxidante total (TAOS) en un ensayo aleatorizado doble ciego en humanos [Kar et al., 2009]. En otros estudio realizado en humanos quienes presentaban hipercolesterolemia se demostró

que la suplementación con el GSPE a una dosis de 300 mg/2 veces/día, mejora la capacidad antioxidante [Vinson et al., 2001].

Se ha demostrado que el GSPE tiene mayor potencial antioxidante que la vitamina C y la vitamina E. Estudios *in vitro* han reportado que el GSPE (una dosis de 100mg/L) es capaz de inhibir entre un 62 a 66% la producción de $O_2^{\cdot-}$ con respecto a la vitamina C y de un 37 a 42% en relación a la vitamina E [Sato et al., 1999]. Al evaluar el efecto del GSPE sobre el estrés oxidativo producido por el proceso de envejecimiento, se ha mostrado que una dosis de 75mg/Kg del extracto de semilla de uva administrado a un grupo de ratas durante 12 semanas, disminuye en un 46% los niveles de producción de H_2O_2 , reduciendo de manera significativa el estrés oxidativo en los animales. El sistema nervioso y particularmente el cerebro son tejidos cuya composición principalmente es lipídica ya que más de un 60% de su peso seco está constituido por lípidos, especialmente por fosfolípidos [Svennerholm, 1968], y está sometido a un aumento de la peroxidación lipídica con la edad [Bagchi et al., 2000]; al evaluar el efecto del GSPE sobre los niveles de malondialdehído (MDA) u marcador de peroxidación lipídica, se observó una reducción del 41% en los animales tratados con el extracto en comparación con sus respectivos controles. Por otro lado, el contenido de grupos sulfhídricos de las proteínas aumentó un 84% en respuesta a el GSPE en los animales adultos, estas modificaciones estructurales son consideradas un mecanismo antioxidante celular no enzimático [Devi et al., 2011].

1.2 Dislipidemia

La dislipemia es una alteración genética o adquirida que puede afectar tanto a los niveles absolutos como a la proporción relativa de los lípidos presentes en el plasma. Se acompaña de niveles anormalmente elevados de colesterol o TG, con o sin una reducción significativa de las HDL, acompañada de una preponderancia de las LDL pequeñas y densas [NCEP, 2002]. La dislipidemia secundaria coexiste positivamente con alteraciones ateroscleróticas, incluyendo diabetes tipo 2 (DM), Síndrome metabólico (SM),

obesidad, enfermedad coronaria [NCEP, 2002]. El estudio de Framingham ha permitido asociar la CVD con alteraciones en el perfil de los lípidos y la hipertensión arterial (HTA), desordenes que involucran modificaciones en la homeostasis metabólica y hemodinámica [Lake et al., 2003, Kearney et al., 2005; Düsing, 2010]. Asimismo, se ha mostrado que la dislipidemia produce cambios de la función endotelial que pueden llegar a complicarse con un incremento compensatorio de la presión arterial (BP) [Nickenig, 2002; Nickenig-Harrison, 2002].

Los pacientes con hiperlipidemia familiar presentan aterosclerosis en conjunto con altos niveles de TG combinado con DM y SM, desordenes en los cuales las LDL oxidadas son captadas por los macrófagos en la pared arterial, estimulando la proliferación de células espumosas y la formación de la lesión aterosclerótica [Tanaka, 2004]. Se cree que la dislipidemia aterogénica es causada por la suma de múltiples anomalías metabólicas tales como: 1) aumento en la producción de lipoproteínas ricas en TG tanto en el hígado como en el intestino, 2) aumento en la síntesis de colesterol e, 3) incremento del catabolismo de las HDL [Arca et al., 2012].

Diversos estudios han indicado que la característica dominante de la dislipidemia en los pacientes con SM y DM, es el aumento de la tasa de producción de las VLDL-ApoB en el hígado; dicho incremento está determinado por la concentración de TG en el plasma, el cual está significativamente relacionado con los índices de sensibilidad a la insulina [Adiels et al., 2005]. Un factor importante que condiciona la síntesis de las VLDL es la disponibilidad de TG en los hepatocitos, sumado a los ácidos grasos provenientes de la síntesis *de novo* y de los tejidos extra hepáticos que sirven de sustrato para la síntesis de TG [Choi- Ginsberg, 2011]. La contribución relativa de cada una de estas fuentes es altamente dependiente del estado nutricional, la lipogénesis *de novo* ocurre principalmente en estado de ayuno y es controlada por diversos factores de transcripción; en general la expresión de genes lipogénicos está globalmente regulada por la proteína SREBP [Horton et al., 2002]. Específicamente, la isoforma SREBP-1c regula prácticamente casi todas las

enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y algunas de las enzimas que participan en la síntesis de unidades de acetil-CoA [Horton et al., 2002]; el efecto lipogénico de la SREBP-1c es estimulado por la acción de la insulina en estados de hiperinsulinemia crónica [Horton et al., 2002]. Adicionalmente el tejido adiposo aporta ácidos grasos libres como fuente para la síntesis de los TG hepáticos, en estado de ayuno aproximadamente el 77% de los TG-VLDL derivan del reciclaje de ácidos grasos del tejido adiposo [Choi- Ginsberg, 2011].

El incremento en el flujo de partículas de VLDL ricas en TG en pacientes con DM y SM tiene consecuencias importantes en el metabolismo de las otras lipoproteínas [Vergnani et al., 2000]. De hecho, las TG-VLDL son una buena fuente de sustrato para la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP), cuya función es catalizar la transferencia de ésteres de colesterol (CE) en intercambio con los TG entre las LDL y las HDL. Como consecuencia, estas lipoproteínas se vuelven relativamente ricas en TG y pobres en CE, siendo hidrolizadas por la LPL y la lipasa hepática (LH) con la consecuente producción de partículas de LDL pequeñas y densas (sdLDL) y HDL pequeñas [Arca et al., 2012]. El efecto final de la alteración metabólica mencionada anteriormente, es la acumulación de lipoproteínas ricas en apoB pro-aterogénicas y la alteración de la función de las HDL [Martin et al., 2009].

La modificación en la composición de las HDL afecta de manera importante el flujo del colesterol desde las células; así el deterioro en la capacidad de las HDL para movilizar el colesterol ha sido relacionado con un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria [Khera et al., 2011; Navab et al., 2011]. Por otra parte las HDL ejercen su acción anti-aterogénica en un proceso en el que interviene la estimulación de la producción de óxido nítrico endotelial (NO), ya que se ha demostrado que las HDL en pacientes con DM son menos activas en la promoción de la síntesis de NO, afectando de manera indirecta la vasodilatación endotelial mediada por NO [Sorrentino et al., 2010]. La dislipidemia con niveles elevados de colesterol LDL, crea fundamentalmente una situación de deficiencia de NO. Una vez que el colesterol LDL interactúa con un radical libre hidroxilo o superóxido, se transforma en LDL oxidada, que

es capaz de inhibir la producción de NO. De hecho, se ha demostrado una correlación significativa entre los niveles de LDL colesterol y la producción de NO [Vergnani et al., 2000] (figura 3)

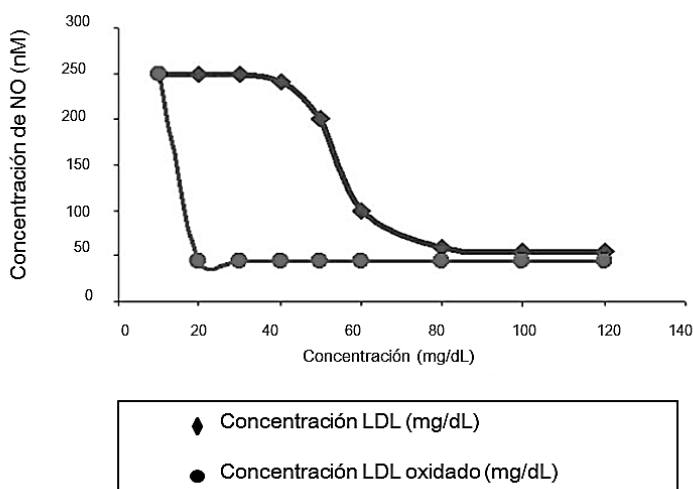


Figura 3. Efecto de la concentración de LDL-colesterol sobre la producción de Óxido Nítrico [Verganini et al., 2000]

Asimismo, estudios poblacionales han reportado que niveles elevados de colesterol total, colesterol LDL y de la relación colesterol total/HDL están asociados de forma independiente con un aumento en la incidencia de HTA [Halperin et al., 2006]. Algunos autores han demostrado una mayor penetración de colesterol LDL en las paredes arteriales según aumentan los niveles de BP, en los experimentos realizados por estos autores se advierte claramente, que a mayor presión arterial sistólica (SBP), se observa un aumento en el colesterol LDL en la íntima vascular [Curmi et al., 1990; Meyer et al., 1996] (figura 4).

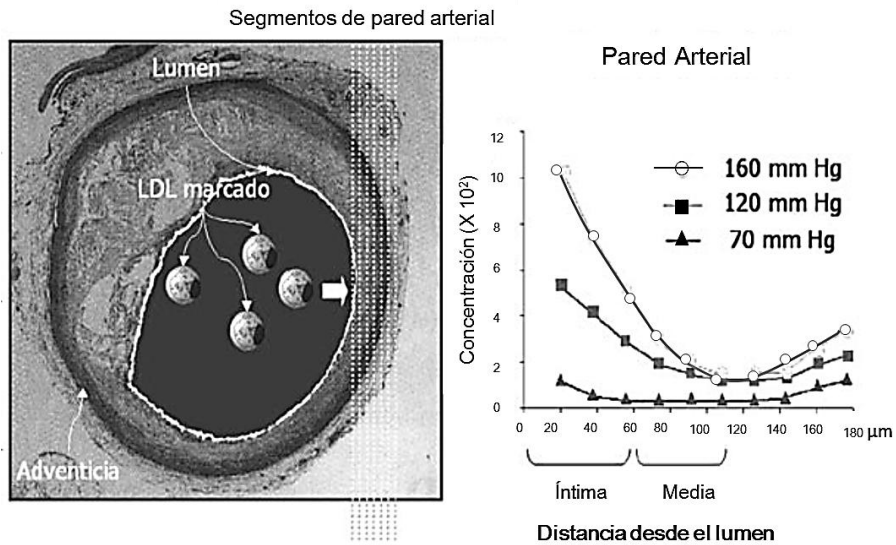


Figura 4. Efecto de la BP sobre el contenido de LDL en la pared arterial [Meyer G, 1996; Tagle-Acevedo, 2007]

También, en resultados obtenidos mediante ecografías intracoronarias, se ha observado que las modificaciones producidas en el volumen de los ateromas en pacientes con enfermedad coronaria se correlacionan significativamente con los cambios ocurridos en la BP [Nisse et al., 2004] (figura 5).

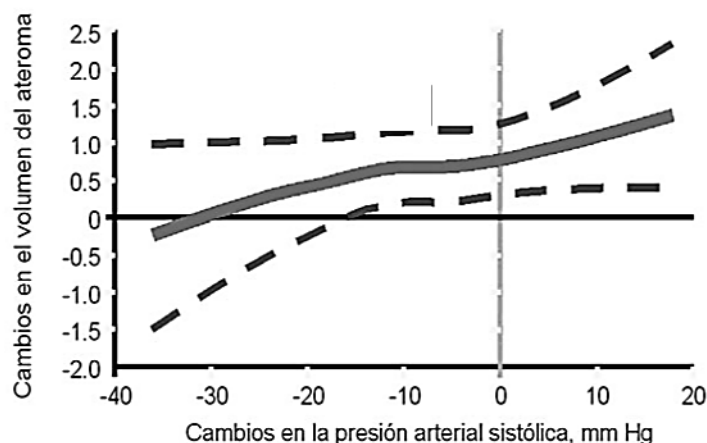


Figura 5. Cambios en el volumen del ateroma con relación a los cambios en la SBP [Nissen et al., 2004]

1.2.1 Síntesis y metabolismo del Colesterol

El colesterol es un componente importante de las membranas de las células eucarióticas, que permite generar una barrera semipermeable y regular el fluido de líquidos a nivel celular. Interviene en la modulación de las funciones de las proteínas de membrana y participa en el tráfico y la señalización transmembrana, como es el caso de los receptores acoplados a proteína G [Cherezov et al., 2007]. Los metabolitos del colesterol (esteroides y ácidos biliares) están involucrados en algunas vías de transducción de señales y la solubilización de otros lípidos [Ikonen, 2006].

El colesterol corporal proviene de la síntesis endógena y de la dieta [Van Heek et al., 2000]. Los alimentos suministran en promedio 400mg/día de colesterol y el hígado secreta 1g/día aproximadamente [Grundy-Metzger, 1972; Wilson-Rudel, 1994]. Cerca del 50% del colesterol de la dieta se absorbe en el intestino y el remanente es excretado por las heces [Bays, 2002; Clearfield, 2003]. La proporción de síntesis *de novo* de colesterol en relación con la ingesta dietaria es de aproximadamente 70:30 [Grundy, 1983]; en la práctica se

pueden encontrar variaciones entre individuos dependiendo de la constitución genética y la suplementación dietaria. Únicamente el FC no esterificado puede ser absorbido por los enterocitos; la mayor parte del colesterol existe en forma de esteroides libres, FC, y solo del 10 al 15% existe como CE. Estos últimos deben ser hidrolizados por la enzima colesterol esterasa para liberar el FC para su posterior absorción. El colesterol es mínimamente soluble en un medio acuoso [Swell et al., 1958; Holt et al., 1986] y por lo tanto debe ser incorporado en micelas de sales biliares antes de su absorción. Por lo general, estas micelas empaquetan el FC junto con fosfolípidos, ácidos grasos libres ionizados y no ionizados, monoglicéridos y lisofosfolípidos para formar micelas mixtas [Hernell et al., 1990; Yao et al., 2002]. Estas micelas se transportan al borde en cepillo de los enterocitos, donde se absorben, proceso que depende de la presencia de los ácidos biliares en el lumen intestinal y se correlaciona directamente con el conjunto de ácidos biliares totales [Voshol et al., 2001].

El hígado contribuye aproximadamente en un 40 a 50% con la síntesis de colesterol a nivel corporal en el caso de especies como la rata, el ratón y el mono [Dietschy et al., 1993]. Todas las células nucleadas pueden sintetizar el colesterol utilizando como sustrato el acetil CoA a través de la vía del mevalonato colesterol. El paso limitante en la vía del mevalonato es el modulado por la enzima hidroximetilglutaril CoA reductasa (HMG-CoAR) [Ikonen, 2008]. El colesterol es el esteroide más abundante en el plasma y se encuentra principalmente asociado con lipoproteínas, incluyendo las LDL (60-70% del colesterol plasmático) y HDL (20 – 30%) [NCEP, 2001]. El colesterol de la dieta es transportado desde el intestino hasta el hígado donde es distribuido a los otros tejidos [Ikonen, 2008], siendo el hígado el órgano clave para la regulación de los niveles de colesterol en sangre [Lee-Carr, 2004].

La homeostasis del colesterol se mantiene por medio de dos procesos, uno que transporta el colesterol desde el hígado a los tejidos y otro que permite el regreso del colesterol al tejido hepático. Los lípidos secretados desde los hepatocitos en forma de las VLDL, de lipoproteínas de densidad intermedia y de partículas de LDL son captados por los tejidos periféricos vía el receptor de

las LDL. Alternativamente, el exceso de colesterol en la periferia es removido y transportado de regreso al hígado por acción de las HDL, mecanismo que conocido como transporte reverso del colesterol (RTC) [Barter-Kastelein, 2006; Goedeke-Fernández-Hernando, 2012]. En el sistema de RTC se han identificado proteínas que se unen con las HDL y que se encargan de mediar la transferencia de los CE desde los tejidos periféricos al hígado. El colesterol entonces puede ser secretado en la bilis y eliminado del cuerpo, produciendo resultados potencialmente antiaterogénicos [Oliveira-de Faria, 2011].

1.2.2 Síntesis y metabolismo de los triacilgliceroles

Los glicerolípidos representan una alta proporción de los lípidos totales en plasma e incluyen los TG y diacilgliceroles (DAG) [Quehenberger-Dennis, 2011]. Los TG provienen de diferentes fuentes: de lipogénesis *de novo*, de reservas citoplasmáticas de TG, y de remanentes de lipoproteínas captadas directamente por el hígado [Nguyen et al., 2008]. La concentración plasmática de TG se encuentra distribuida entre los QM y las VLDL y depende principalmente de la ingesta dietaría [Quehenberger-Dennis, 2011]. Los TG de la dieta son hidrolizados en el lumen del intestino delgado a ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y monoacilgliceroles (MAG) por acción de la LP en el segmento superior del yeyuno [Iqbal-Hussain, 2009].

Una vez dentro del enterocito, los productos de la hidrólisis de los TG deben atravesar el citoplasma para alcanzar el retículo endoplasmático (ER), donde se utilizan para sintetizar lípidos complejos. Proteínas de unión específicas (FABPs) transportan los ácidos grasos y MAG al ER, donde se utilizan para la biosíntesis de TG, las dos FABPs principales son la hepática y la intestinal [Agellon et al., 2002; Besnard et al., 2002; Hanhoff et al., 2002]. La mayor parte de los TG sintetizados en el enterocito se produce a lo largo de la vía de MAG, en la que MAG y acil-CoA están unidos covalentemente para formar DAG en una reacción catalizada por la monoacilglicerol aciltransferasas (MGATs) [Yen et al., 2008]; acilaciones adicionales de los DAG por la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) conducen a la síntesis de TG. Dos DGATs

han sido identificadas y caracterizadas: DGAT1 y DGAT2 [Yen et al., 2008], la DGAT2 se expresa principalmente en el hígado y el intestino. Su importancia en la absorción de las grasas se ha demostrado por una reducción en la absorción de la grasa en animales DGAT2-*knockout*, la DGAT1, se expresa en varios tejidos incluyendo hígado, intestino y piel. En algunos estudios, se ha encontrado que la MGAT2 [Cao et al., 2003] y MGAT3 [Cao et al., 2007] poseen actividad DGAT [Buhman et al., 2000; Smith et al., 2000]. Una parte de la síntesis de TG también se produce a través de la desfosforilación del ácido fosfatídico y acilación de los resultantes DAG [Iqbal-Hussain, 2009].

Estudios realizados en células Caco-2 demostraron que los TG nacientes se emplean preferentemente para el montaje de los QM [Luchoomun-Hussain, 1999]. Una proporción de los TG obtenidos por ésta vía es parcialmente utilizada para montar las nacientes lipoproteínas que contienen ApoB formando los pre quilomicrones. El producto resultante se une a la proteína microsomal de transporte de triglicéridos (MTP), que participa en el montaje y la secreción de lípidos neutros en los QM [Iqbal-Hussain, 2009], los cuales son transportados en vesículas hasta el complejo de Golgi; desde allí viajan hasta la membrana basolateral para la posterior exocitosis en la lámina propia y finalmente, en la linfa mesentérica [Mansbach-Gorelick, 2007].

El hígado, el tejido adiposo y la glándula mamaria son los tres lugares principales donde se lleva a cabo la biosíntesis de los ácidos grasos y de los TG. El hígado es el órgano central para la interconversión y su metabolismo. La síntesis de ácidos grasos se lleva a cabo en el citosol de las células y el producto activo para la síntesis es el acetil CoA proveniente de la glucosa vía glucólisis. A esta ruta también se le conoce como "síntesis *de novo*" o síntesis completa. El acetil CoA se sintetiza en el interior de las mitocondrias pero no puede salir hacia el citosol, por lo que se condensa con el oxalacetato que se difunde posteriormente hacia el citoplasma [Huang-Kummerow, 1976]. La síntesis de ácidos grasos tiene lugar en un complejo formado por siete enzimas independientes y una proteína transportadora que sujeta a la cadena acílica en crecimiento; a este complejo se le denomina ácido graso sintetasa. Los ácidos

grasos generados por esta vía se agrupan con el glicerol, el cual proviene del glicerol 3P, llevándose a cabo la síntesis *de novo* de los TG. La mayor parte de la TG sintetizados por esta vía ingresa en el pool citosólico que se utiliza para generar un pool diferente de DAG [Huang-Kummerow, 1976; Iqbal- Hussain, 2009].

1.3 Función endotelial e Hipertensión

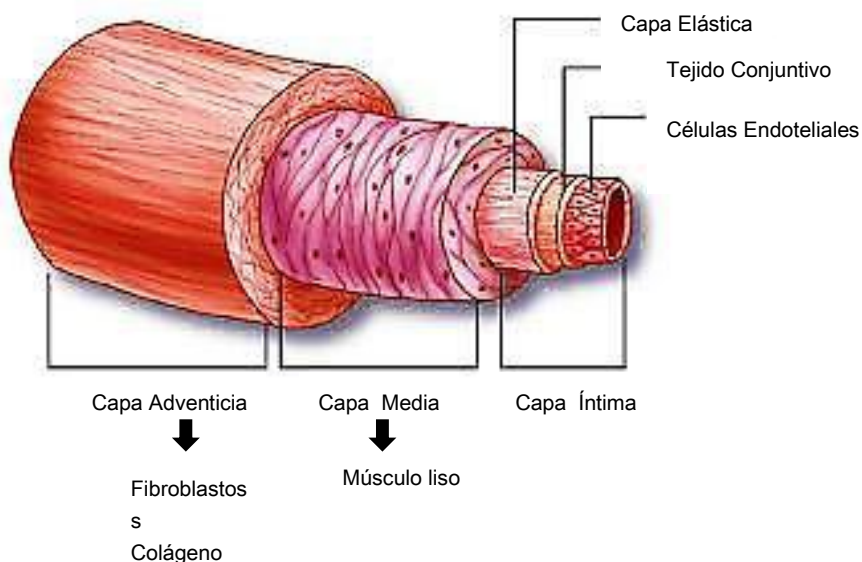
La HTA es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar una CVD [Papadogiannis-Protogerou, 2011; Wang et al., 2012;] y se estima que en el año 2025 la HTA habrá aumentado un 24% en los países desarrollados y un 80% en los países en vías de desarrollo [Kearney, 2005; Ngo et al., 2011;]. La HTA se ha asociado con un incremento en la resistencia periférica, resultante de alteraciones funcionales, estructurales y mecánicas a nivel de la resistencia de las pequeñas arterias [Viridis et al., 2011]. Existen factores que contribuyen a la fisiopatología de la HTA especialmente en adultos mayores, las arterias y conductos de gran tamaño como la arteria aorta y carótida se vuelven rígidas y menos elásticas, aumentando la BP [Blanchet-Safar, 2005] y provocando la proliferación de las células musculares lisas y disfunción endotelial en los vasos de resistencia, causando vasoconstricción [Bessa et al., 2009; Viridis et al., 2011].

1.3.1 Estructura de la pared vascular

La pared vascular es un órgano activo y flexible, formado por células endoteliales, células musculares lisas y fibroblastos, e integrada por una parte no celular que corresponde a la matriz extracelular (figura 6). Estos componentes son capaces de modificar su forma y de reorganizarse de manera dinámica en respuesta a estímulos fisiológicos y/o patológicos, manteniendo la integridad de la pared vascular en condiciones normales o participando en cambios estructurales en respuesta a situaciones patológicas como la HTA y la aterosclerosis [Touyz, 2000; Risler et al., 2005]. La elevación crónica de la BP produce cambios en las dimensiones y propiedades de las

arterias [Fung, 1993; Hayashi et al., 1996]; uno de los fenómenos biomecánicos que ocurren en respuesta a la HTA es el engrosamiento de la pared vascular, este mecanismo intenta disminuir el estrés y restablecer el flujo normal [Matsumoto-Hayashi, 1994]; sin embargo el tono vascular se incrementa como resultado de la HTA [Fridez et al., 2001]. Tres componentes vasculares importantes se ven afectados por la HTA: la estructura vascular, los mecanismos vasculares (rigidez) y la función vascular. La alteración del diseño geométrico de las arterias de resistencia es una característica de la HTA establecida y muchas de las características hemodinámicas asociadas con la HTA esencial pueden explicarse por alteraciones en la estructura de los vasos [Risler et al., 2005] (figura 6).

Figura 6: Corte transversal de una arteria.



La capa media se encuentra integrada por células musculares lisas (SMC), las cuales son uno de los principales constituyentes de la pared vascular. Son consideradas células dinámicas y multifuncionales que contribuyen al remodelamiento arterial a través de numerosos pasos incluyendo crecimiento celular (hiperplasia e hipertrofia), apoptosis, elongación celular, reorganización de las células y/o alteración de la composición de la matriz extracelular [Schriffrin- Touyz, 2004]. En condiciones normales las SCM completamente diferenciadas en las arterias de adultos, se encuentran en estado quiescente o de reposo “contráctil”; en respuesta a las lesiones provocadas por diferentes estímulos incluyendo HTA, las células pierden su capacidad contráctil, aumentan la secreción de proteínas y se hacen más sensibles a factores de crecimiento autocrinos y paracrinos. En esta situación los factores de crecimiento estimulan aún más la hipertrofia y la hiperplasia de las SMC, lo que conlleva al incremento de la resistencia vascular [Shaw -Xu, 2003; Willis et al., 2004, Risler et al., 2005].

Los cambios funcionales en la HTA incluyen alteración en la función endotelial, que se evalúa principalmente como un deterioro en la vasodilatación inducida por acetilcolina y de la relajación dependiente del endotelio. Entre los cambios estructurales se cuentan un aumento de la remodelación vascular secundaria a un incremento del crecimiento celular, a la migración celular y a una leve inflamación vascular [Viridis et al., 2011]. Otra característica importante en el remodelamiento de las grandes arterias durante la HTA, es el aumento de la deposición en las células vasculares de varios componentes de la matriz extracelular, incluyendo colágeno, fibronectina y proteoglicanos [Wolinsky, 1970; Arribas et al, 2006]. La respuesta vascular a la HTA se caracteriza por una reorganización de las fibras elásticas y fragmentación de estas, lo que conduce a la generación de productos de degradación de la elastina (EDPs) [Arribas et al, 2006]. Estos EDPs son moléculas que presentan actividad quimiotáctica, proliferativa y efectos migratorios sobre las SMC [Mochizuk et al., 2000].

1.3.2 Endotelio y tono vascular

El endotelio vascular está localizado en la interface entre los tejidos y la sangre modulando la función de varios órganos [Wu-Thiagarajan, 1996], proporciona revestimiento celular a todos los vasos del sistema circulatorio y forma una barrera estructural entre el espacio vascular y los tejidos. La localización del endotelio en la interfase entre los vasos sanguíneos y la sangre le provee de la capacidad de participar en procesos de vasoregulación, permeabilidad selectiva de las células hematopoyéticas y nutrientes, generar una superficie no-trombótica facilitando el flujo sanguíneo que no permite a las plaquetas u otras células sanguíneas se adhieran, impidiendo la activación de la cascada de coagulación [Wu-Thiagarajan, 1996; Fridge-Thompson, 2007]. El endotelio vascular participa en la regulación de la homeostasis cardiovascular y metabólica, siendo crucial para la modulación del tono vascular, adhesión de leucocitos y la angiogénesis [Vita, 2011]. Las funciones del endotelio se efectúan a través de la presencia de receptores de membrana para numerosas moléculas incluyendo proteínas (ej. factores de crecimiento, proteínas involucradas en la coagulación, las LDL, metabolitos como el NO y la serotonina, y algunas hormonas como la endotelina-1 (ET-1)), así como también a través de la unión específica de proteínas y receptores que regulan la unión célula-célula [Cines et al., 1998].

El endotelio juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo, en parte, a través de la secreción y la absorción de sustancias vasoactivas que actúan de manera paracrina para generar contracción y dilatación del lecho vascular [Wu-Thiagarajan, 1996; Cines et al., 1998]. Las células endoteliales están involucradas en la regulación de la BP y el flujo de la sangre por medio de la liberación de compuestos vasodilatadores como el NO y la prostaciclina I₂ (PGI₂), como también de vasoconstrictores incluyendo la ET-1 y el factor activador de plaquetas (PAF) [Cines et al., 1998].

El tejido endotelial es responsable de regular el crecimiento del tejido conectivo que lo circunda, en su estado basal inactivo el endotelio evita la

proliferación de SMC a través de la secreción del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [Fitridge et al., 2007]. El endotelio interviene en la hiperpolarización de las SMC por una vía independiente del NO, la cual incrementa la conductancia del potasio y la subsecuente propagación de la despolarización de las células, para mantener el tono vasodilatador [Deanfield et al., 2007], por ejemplo el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, puede compensar la pérdida del tono vascular mediada por el NO cuando la disponibilidad de éste se ve reducida particularmente en la microcirculación [Halcox et al., 2001].

1.3.3 Factores derivados del endotelio que regulan el tono vascular

Existen múltiples estímulos neurohormonales que al interactuar con receptores endoteliales llevan por distintos mecanismos a la formación por parte del endotelio de factores que regulan el tono vascular como el NO y PGI₂ [González, 1997].

1.3.3.1 Óxido Nítrico

El NO es un gas que difunde fácilmente desde las células endoteliales a las SMC de la pared vascular [Martínez-Agustín-Sánchez de M., 2004], es producido principalmente por los leucocitos, las neuronas y las células endoteliales [Acosta et al., 2006]. La síntesis del NO es modulada por la PGI₂, la ET-1 y el PAF, que son sintetizados en respuesta a cambios en el entorno celular. Se ha descrito que el NO actúa como un metabolito con función vasodilatadora, antiaterogénica (disminuyendo la oxidación de las LDL) y antiagregante plaquetario por inhibición de la activación de las plaquetas [Schmitt-Dirsh, 2009], que tiene la capacidad de participar en la regulación del flujo sanguíneo en respuesta al “estrés de roce” de la sangre o a la acción de la bradiquinina (BrK) [Martínez-Agustín-Sánchez de M., 2004]. El NO actúa como modulador de la hemostasis y del tono vascular, produciendo relajación celular sobre el músculo liso vascular o sobre el mismo endotelio [Vera et al., 2005].

Las células endoteliales sintetizan NO, a través de la oxidación de L-arginina a L-citrulina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) [Stamler et al., 1992; Cines et al., 1998; Alderton et al., 2001], en presencia de cofactores como la tetrahidrobiopterina (BH4), mononucleótido de flavina (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), grupo Hemo y calmodulina [Martínez-Agustín-Sánchez de M, 2004; Deanfield et al., 2007] (figura 2). Esta enzima que está presente en los mamíferos, se encuentra en diferentes isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), inducible en respuesta a diferentes estímulo (iNOS), y mitocondrial (mtNOS); la isoenzima constitutiva del endotelio es la eNOS y es la responsable de la formación habitual de NO [Martínez-Agustín-Sánchez de M, 2004].

El NO interactúa con centros metálicos, oxígeno molecular, grupos tioles y algunos radicales de oxígeno [Fraga et al., 2010b]. La función fisiológica más importante del NO es producir vasodilatación por activación de la guanilato ciclasa, [Rivero-Vilches et al., 2001], estimulando la conversión de guanosin trifosfato a guanosin monofosfato cíclico (cGMP). Al incrementar las concentración intracelular de cGMP se produce la relajación del músculo liso y por lo tanto la vasodilatación por activación de las quinasas dependientes de cGMP [Lincoln, 1989; Deanfield et al., 2007] (figura 7).

Una reducción en la disponibilidad del NO es un evento clave en la patogénesis de la disfunción endotelial en la HTA y otras CVDs. La disminución en los niveles de NO puede ser secundaria a su menor síntesis y/o un incremento en la inactivación oxidativa de NO por parte de las ROS [Vera et al., 2005]. La regulación de las concentraciones de NO es bastante compleja; se sabe que su producción disminuye durante la aterosclerosis avanzada, tanto por una reducción en la síntesis de la eNOS como por un incremento en su degradación. La vida media del NO es muy breve (unos segundos tan solo), en estas condiciones hay muy poca cantidad de NO disponible para sus funciones endoteliales. Adicionalmente si la disponibilidad de arginina o de tetrahidropteridina (BH4) disminuye, en lugar de formarse NO se generaría

alternativamente el O_2^- por acción de la eNOS [Martínez-Agustín-Sánchez de M., 2004].

1.3.3.2 Prostaciclina I₂

La prostaciclina I₂ o PGI₂ es sintetizada en los vasos de la pared vascular y actúa como un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y un importante vasodilatador pulmonar y sistémico [Moncada, 1977; Yao, 2012]; tanto las células endoteliales como las células del músculo liso y los fibroblastos tienen el potencial de sintetizar PGI₂ [Baenziger et al., 1977; Bunting et al., 1977]. La función vasodilatadora y antiagregante de la PGI₂ se realiza a través de la unión con receptores acoplados a proteína G y subsecuente activación de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). Este a su vez provoca una disminución del Ca^{2+} y disminuye la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} [Yao et al, 2012]. La PGI₂ en las células del músculo liso puede unirse a los receptores de prostaciclina y de la misma manera incrementar los niveles citosólicos de cAMP conduciendo a la relajación del músculo liso y vasodilatación [Dunbar, 2010].

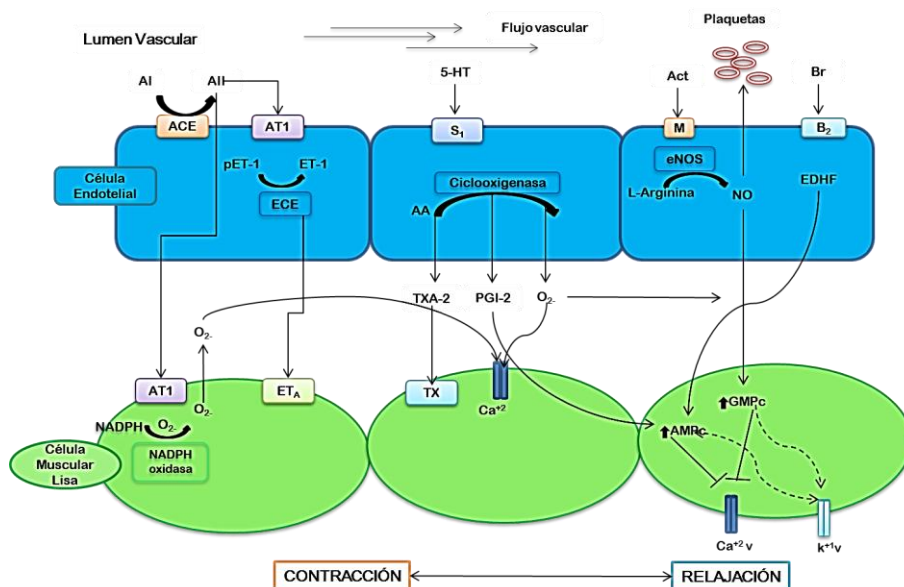


Figura 7: Relajación del músculo liso dependiente del endotelio. Diversos factores de la sangre como la acetilcolina (Act), histamina (5 HT), Bradiquinina (Brk) pueden activar receptores específicos de la membrana celular del endotelio, con la liberación de moléculas vasorelajantes como el NO, prostaciclina I₂ (PGI₂) y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Estas moléculas estimulan en el músculo liso la producción de segundos mensajeros como cGMP y cAMP con el consiguiente aumento de la permeabilidad celular al facilitar la relajación y disminuir la agregación plaquetaria. Sustancias con efecto antagónico como endotelina 1 (ET-1), angiotensina I y II (AI- AII), Tromboxano (TXA-2) pueden ser liberadas por las células endoteliales y producir vasoconstricción. ACE: enzima convertidora de angiotensina, ECE: enzima convertidora de endotelina; S₁: receptor de serotonina; B₂: receptor de Bradikinina; pET-1: proendotelina 1; T: receptor de trombina; L-Arg: arginina; AA: Ácido Araquidónico. [Echeverry et al., 2009]

En contraste con el NO, la PGI₂ no contribuye al mantenimiento del tono vascular basal en las arterias mayores [Joannides et al, 1995]. Sin embargo en pacientes con una disminución en la biodisponibilidad del NO como en la aterosclerosis, las prostaglandinas pueden jugar un papel compensatorio importante [Bulut et al., 2003]. Algunos autores indican que cuando las células endoteliales son estimuladas con agonistas que incrementan las concentraciones intracelulares de calcio, el NO es liberado continuamente [Harrington et al., 2007], mientras que PGI₂ es liberada de manera transitoria

[Mitchell et al., 1992]. Adicionalmente PGI₂ facilita la liberación de NO por parte de las células endoteliales [Shimokawa et al., 1988], al contrario la acción de PGI₂ en las SMC es potenciada por el NO e indirectamente el NO prolonga la vida media del cAMP, el segundo mensajero de las prostaciclina [Delpy et al., 1996].

1.3.4. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

El sistema renina angiotensina aldosterona (RAAS) es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales que juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad hemodinámica por medio de la regulación de la BP [Santeliz et al., 2008], y el balance de líquidos y electrolitos [Skeggs et al., 1976, Persson et al., 2009]. Sin embargo la activación patológica de RAAS produce un incremento en la vasoconstricción, hipertrofia muscular anormal (vascular y cardíaca) y fibrosis [Topouchian et al., 2007]. Tradicionalmente RAAS ha sido involucrado en procesos fisiológicos y fisiopatológicos relacionados a los sistemas renal y cardiovascular [Coates, 2003; Braga et al., 2007; Shi et al., 2010;]. Los primeros estudios realizados en RAAS ya presentaban un esquema metabólico, donde la renina cataliza la conversión de angiotensinógeno (AT) a angiotensina I (Ang I), la cual entonces es convertida a angiotensina II (Ang II) por acción de la ACE principalmente a nivel pulmonar. La Ang II estimula la liberación de aldosterona, una hormona esteroidea, secretada por la zona glomerular de la corteza suprarrenal, que está directamente implicada en la regulación de la BP. La Aldosterona ejerce sus efectos principales en la región tubular distal de la nefrona donde aumenta la reabsorción de agua y cloruro de sodio, lo que conduce a la expansión del volumen del líquido extracelular [Probstfield-O'Brien, 2010; Catena et al., 2012] (figura 8).

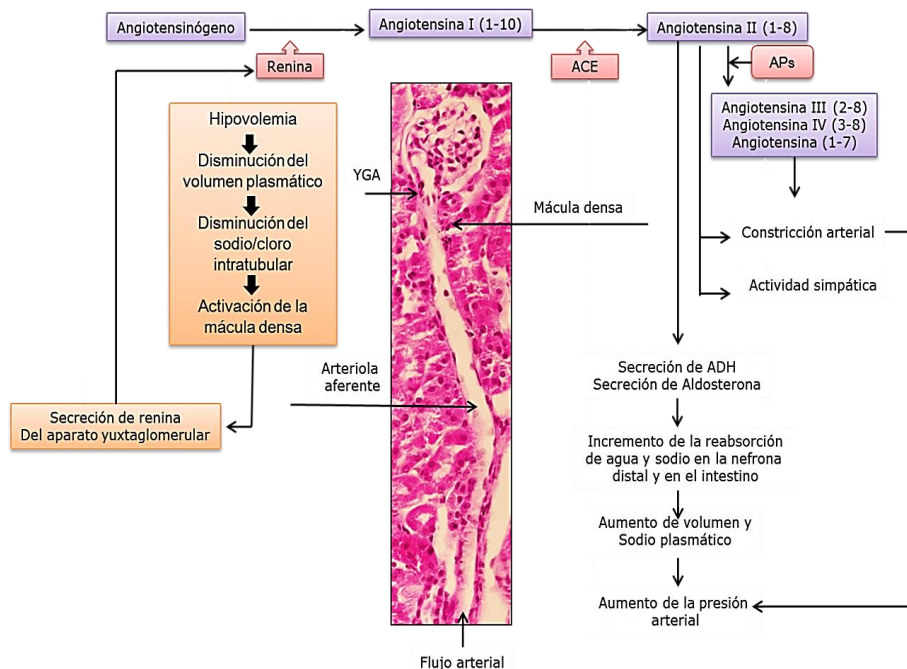


Figura 8: Representación de la cascada de RAAS: Las principales señales activadoras de RAAS son la reducción en la perfusión de la nefrona debido a la disminución de la BP media y la disminución de la hipovolemia inducida por la carga intratubular de sodio / cloruro. Las células del aparato yuxtaglomerular del riñón de producen la renina, la cual activa la cascada generando la producción de angiotensina II y aldosterona. La activación de RAAS produce vasoconstricción arteriolar y retención de líquidos, como resultado se produce un aumento de la BP media. APs: Aminopeptidasas; YGA: zona yuxtaglomerular. [Adaptado de: Röszer-Ricote, 2010]

1.3.4.1. Enzima Convertidora de Angiotensina

La ACE fue identificada inicialmente como un componente clave de RASS en 1956 [Coates, 2003; Riordan, 2003] cuya función principal en este contexto es convertir la Ang I a la forma activa Ang II, por escisión del dipéptido histidina-leucina de la región C-terminal de Ang I [Actis-Goretta et al., 2006; Ottaviani et al., 2006]. El efecto hemodinámico de estos eventos es la reducción del flujo de sangre periférica, lo que aumenta la resistencia periférica y BP media [Henriksen-Jacob, 2003]. Adicionalmente la ACE tiene la capacidad

de hidrolizar el péptido denominado Bradiquinina (Brk), el cual actúa como un potente vasodilatador dependiente del endotelio, que provoca la contracción del músculo liso no vascular [Skidgel-Erdös, 1987; Erdös, 1990; Isaac et al., 1998].

La ACE es una metalopeptidasa dependiente de zinc, que se encuentra distribuida a través del organismo incluyendo el sistema nervioso central (SNC); existe como una proteína de membrana y en forma soluble en plasma, líquido amniótico, líquido seminal y otros fluidos corporales [Shi et al., 2010], también se ha determinado su presencia en células endoteliales y en menor cantidad en SMC [Persson et al., 2009].

En los mamíferos, se han identificado dos isoformas de la ACE, la isoenzima endotelial o isoforma somática (sACE) presente en varios tejidos (vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro principalmente), está compuesta de dos dominios altamente similares, cada uno de estos con sus sitios catalíticos funcionales. La otra isoenzima se ha encontrado exclusivamente en células germinales de los testículo (tACE); con excepción de 67 aminoácidos en el extremo N-terminal es idéntica al extremo C-terminal de la ACE endotelial [Shi et al., 2010]. La diferencia entre las isoformas consiste en que la tACE tiene un sitio activo mientras que la sACE posee dos sitios activos, ambas isoformas de la ACE actúan como ectoenzimas de superficie celular con capacidad para hidrolizar péptidos circulantes [Coates, 2003] (figura 9).

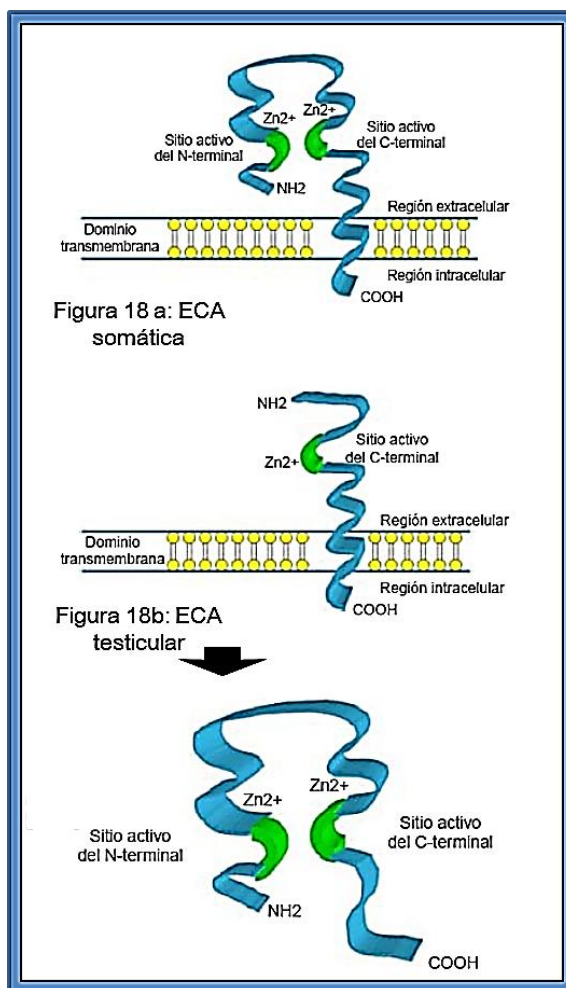


Figura 9: Isoformas de la enzima convertidora de angiotensina [Santeliz et al., 2008]

La inhibición de la ACE ha mostrado mejorar la función endotelial [Mancini et al., 1996] y el remodelamiento cardiovascular [Schartl et al., 1994]; aunque una proporción sustancial de estos beneficios es, sin duda debido a la disminución de la BP, los inhibidores de la actividad de la ACE ejercen un número de efectos que son independientes de la BP. Estos incluyen reducción en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, inhibición del crecimiento y estabilización de la placa aterosclerótica [Fleming et al., 2005].

Se han descrito moléculas con la capacidad de unirse a iones metálicos que presentan la capacidad de inhibir la acción de la ACE (iACE); el mecanismo alopático de algunos inhibidores se basa en la propiedad de unirse al zinc en el sitio activo de la ACE, [Persson et al., 2009]. Los inhibidores de la actividad de la ACE son empleados para el tratamiento de la CVD ya que ayudan a mejorar la BP, controlar pacientes con HTA y prolongar la supervivencia de pacientes con infarto agudo de miocardio, disfunción ventricular izquierda asintomática, falla cardíaca congestiva y disfunción renal [Loizzo et al., 2007]. Sin embargo se han descrito efectos locales secundarios con el empleo de iACE como la tos y el edema angioneurótico, por lo tanto, la detección y desarrollo de nuevos iACE, sin efectos secundarios sería beneficioso en el tratamiento de la CVD [Loizzo et al., 2007]. Algunos estudios realizados con flavonoides [Kameda et al., 1987; Oh et al., 2004; Actis-Goretta et al., 2006] y con compuestos ricos en PA [Kang et al, 2003] muestran que estas moléculas actúan como potenciales inhibidores naturales de la actividad de la ACE [Braga et al., 2007; Persson et al., 2009; Kwon et al., 2010] convirtiéndolos en importantes blancos de estudio de formas no farmacológicas en el tratamiento de la HTA.

1.3.5. Disfunción endotelial

La ED se define como un desequilibrio parcial o total entre factores vasodilatadores y vasoconstrictores, entre factores promotores e inhibidores del crecimiento y entre factores pro-aterogénico y anti-aterogénicos; que provocan vasoconstricción y cambios estructurales en la pared de los vasos sanguíneos [Quyyumi, 1998; Vera et al., 2005]. La ED se caracteriza por una reducción en la capacidad de las células endoteliales para producir vasodilatación vía liberación de NO, acompañada de una reducción en la capacidad de las células del endotelio para suprimir procesos inflamatorios [Schmitt-Dirsh, 2009].

La ED es considera una las primeras manifestaciones común a varios factores de riesgo cardiovascular como la HTA y la aterosclerosis [Jiménez et

al., 2012], es características de la HTA crónica pero no es específica de la HTA primaria, ya que puede estar asociada con otros factores de riesgo. No se ha determinado una relación directa entre la severidad de la disfunción endotelial y los niveles de BP lo que indica que el aumento de la BP no necesariamente está determinada por la ED [Fritsch et al., 2012]. Entre las alteraciones más importantes en la ED se encuentran disminución de la biodisponibilidad del NO [Taddei et al., 1998], desequilibrio en RASS, aumento en la liberación de las ROS y prostanoïdes vasoconstrictores [Vera et al., 2005; Fritsch et al., 2012].

La HTA está relacionada con un incremento en la producción de radicales libres y del estrés oxidativo, factores que contribuyen con la disminución de la relajación del músculo liso vascular estimulando en mayor grado la ED [Ajay et al., 2006; Bessa et al., 2009]. En los casos de hiperlipemia, la síntesis excesiva de las LDL incrementa la formación de las LDL oxidadas, generando un estado de estrés oxidativo que ocasiona la conversión del NO en peroxinitrito, reduciendo de esta manera sus efectos biológicos agudizando el estado de ED [Vallance et al., 2001].

La ED se acompaña de diversos factores de riesgo cardiovascular como insulinoresistencia, hipercolesterolemia, inflamación de la pared vascular, aumento en la oxidación de lipoproteínas, proliferación de las SMC, aumento de la deposición de la matriz extracelular, incremento de las células de adhesión y formación de trombos [Ross, 1999; Durier et al., 2003]. De esta manera la ED puede estar involucrada en la iniciación de la inflamación vascular, en el desarrollo del remodelamiento vascular, y es considerada un determinante temprano en la progresión de la aterosclerosis, además de estar asociada independientemente con un mayor riesgo cardiovascular [Lerman-Zeher, 2005; Savoia et al., 2011].

Existen evidencias que demuestran que el estrés oxidativo participa en el daño vascular estimulando el crecimiento celular y la deposición de proteínas en la matriz extracelular [Bessa et al., 2009]; adicionalmente los radicales libres promueven la proliferación de las SMC y la hipertrofia de las mismas,

procesos claves en la progresión de la HTA [Harrison et al., 2007]. En modelos animales y en estudios con humanos se ha demostrado que la HTA se acompaña de un aumento en la producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno, reducción de la síntesis de NO y disminución en la biodisponibilidad de antioxidantes; todo esto contribuyendo a un aumento en el estrés oxidativo, incrementando la ED [Bessa et al., 2009].

1.4 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) fue descrito por primera vez por Reaven en 1988 como la asociación de un estado de resistencia a la insulina, HTA, hiperlipidemia y obesidad [Reaven, 1988]. Actualmente el SM es considerado un trastorno complejo con altos costos socioeconómico, definido como un conjunto de factores interconectados que a menudo preceden al desarrollo de DM tipo 2 y aumentan el riesgo a desarrollar una CVD [Lakka et al., 2002; Kahn et al., 2005].

Los componentes principales del SM son la dislipidemia, niveles reducidos de HDL, elevación de la BP y alteración en la homeostasis de la glucosa, aunque la obesidad y/o la resistencia a la insulina han ganado cada vez más la atención como las manifestaciones principales del SM [Kassi et al., 2011]. En los últimos años, otras anomalías como los estados crónicos proinflamatorios y protrombóticos, de causa no alcohólico o de hígado graso y la apnea del sueño han sido añadidos a la entidad del SM, haciendo su definición más complejo. Además de los muchos componentes y las implicaciones clínicas del SM, todavía no se ha llegado a un consenso general sobre los mecanismos patogénicos o una definición única de los criterios diagnósticos. Además, todavía hay debate sobre si esta entidad representa un síndrome específico o es un sustituto de los factores de riesgo que combinados incrementan el riesgo particular [Kassi et al., 2011].

A pesar de los avances en la fisiopatología y la delimitación de factores de riesgo que predisponen al síndrome metabólico, hay muchos aspectos que no

están claros. La gran variación en la susceptibilidad y la edad de aparición en los individuos con un perfil muy similar de riesgo, sugiere una interacción importante entre genética y factores ambientales [Ordovas, 2007]. Aunque la obesidad y la resistencia a la insulina permanecen en el centro de la fisiopatología de la SM, un número de otros factores tales como el estrés crónico y la desregulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y el sistema nervioso autónomo, un aumento en el estrés oxidativo celular, la actividad del RAAS, así como moléculas descubiertas recientemente como los micro RNAs también pueden estar involucrados en su patogénesis [Kassi et al., 2011].

La prevalencia e incidencia en la población general del SM y la obesidad visceral ha ido en aumento en los últimos años, con un estimación del 24,6% a un 30,9% en Europa [Pais et al., 2009]. Adicionalmente a que el SM es un factor importante de riesgo para desarrollar una CVD, algunos estudios han demostrado una relación entre el SM y el desarrollo de cáncer colon rectal. Algunas de las características clínicas del síndrome metabólico, incluyendo obesidad, la dislipidemia y la alteración en la homeostasis de la glucosa, se han relacionado con un mayor riesgo de cáncer colon rectal en varios estudios epidemiológicos recientes [Pais et al., 2009].

La relación entre el SM y la alimentación ha sido analizada en algunos estudios epidemiológicos donde concluyen, que el consumo de una dieta alta en frutas y verduras se relaciona con valores más bajos de algunos de los factores de riesgo asociados al SM, se describe una reducción en: la circunferencia de la cintura, de la BP, de los niveles de glucosa en sangre y de los triglicéridos plasmáticos [Galleano et al., 2012]. Los flavonoides, como componentes de frutas y verduras y los alimentos derivados de ellos, pueden proporcionar beneficios para la salud. Estos beneficios pueden estar relacionados con la participación de los flavonoides en el control del riesgo de factores implicados en el SM, de acuerdo a los efectos biológicos descritos para los flavonoides en el numeral 1.1.4 de la presente Tesis Doctoral (figura 10).

Introducción

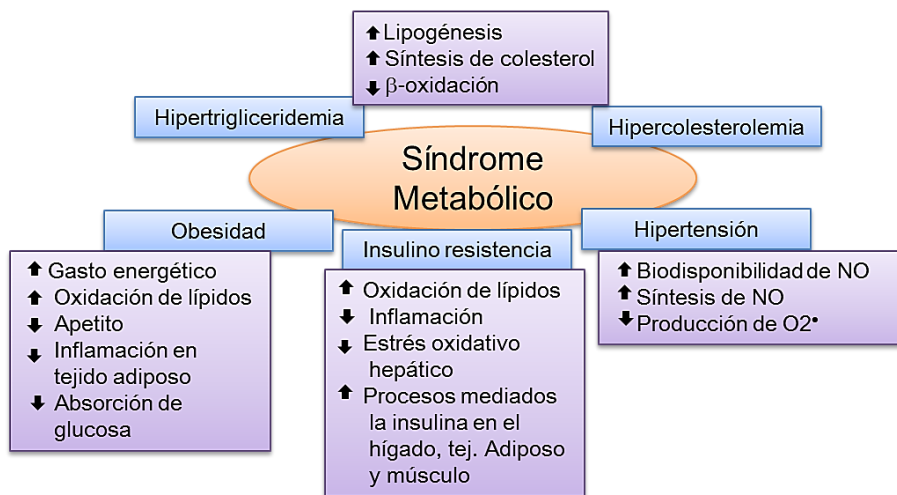
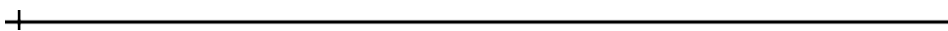


Figura 10. Síndrome metabólico y flavonoides dietarios. La figura muestra 5 de los factores de riesgo que definen el SM (recuadros de color azul) y los beneficios potenciales de los flavonoides sobre los parámetros asociados con cada factor (recuadros de color violeta). Las flechas indican la dirección del proceso. [Galleano et al., 2012]

Objetivos



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

2. OBJETIVOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El grupo de Nutrigenómica de la URV centra su investigación en el estudio de fitoquímicos, principalmente proantocianidinas, como agentes que minimizan el riesgo de desarrollo de patologías asociadas en el síndrome metabólico. En este contexto, la presente Tesis Doctoral pretende sentar las bases para desarrollar ingredientes funcionales basados en proantocianidinas que presenten un **efecto simultáneo en la prevención del riesgo de dislipemia e hipertensión arterial**.

Diversos estudios del grupo han demostrado que la suplementación crónica y aguda con proantocianidinas de pepita de uva tiene un marcado efecto sobre la homeostasis de los lípidos, corrigiendo la dislipemia asociada a dietas hiperlipídicas. No está bien caracterizado el efecto de proantocianidinas de diferentes orígenes o estructuras sobre la homeostasis lipídica, ni se conoce exactamente cuáles son las moléculas responsables de los efectos descritos.

La primera parte de la presente Tesis Doctoral se plantea profundizar en estos aspectos, formulándose la siguiente pregunta: **¿cuáles son las moléculas responsables del efecto corrector de la dislipemia?** Para resolver ésta cuestión planteamos dos estrategias:

- 1 Los trabajos previos del grupo para intentar conocer las moléculas responsables del efecto corrector de la dislipemia se realizaron fraccionando un extracto funcional y analizando fracciones relativamente purificadas, llegando a la conclusión que era una fracción muy rica en un trímero y un dímero galato la responsable [Montagut et 2009]. En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado una estrategia diferente, analizando por una parte extractos con diferente composición en proantocianidinas: extracto de pino, con proantocianidinas de tipo A, extracto de cacao, con proantocianidinas tipo B no galatadas y extracto de

proantocianidinas de pepita de uva, con formas tipo B galatadas y no galatadas.

Para afrontar esta estrategia se ha utilizado un modelo *in vitro*, con células HepG2, que nos permite seguir el destino del acetato marcado con C¹⁴ y por tanto seguir la síntesis y la secreción celular de triacilgliceroles y colesterol. La investigación realizada para resolver ésta primera estrategia configura el objetivo 1 de la presente Tesis Doctoral: **Evaluar el efecto de diferentes proantocianidinas sobre la síntesis y secreción de lípidos en células HepG2.**

- 2 La absorción intestinal y posterior paso de las proantocianidinas por el hígado trata, en parte, a estas moléculas como xenobióticos, modificando parcialmente su estructura química. Así, llegan a las células un conjunto de moléculas, en parte, diferentes a las que se ingieren. Para avanzar en la resolución de la primera pregunta de esta Tesis Doctoral, se han analizado los efectos directos de los metabolitos de proantocianidinas que aparecen en el suero de rata después de dos horas de la administración de 1000mg/kg del extracto de pepita de uva. Con este fin, utilizamos un método que, usando el suero de rata en el modelo *in vitro* anteriormente mencionado, nos permite conocer el efecto directo sobre la homeostasis lipídica de las moléculas realmente presentes en suero. Posteriormente también se estudiaron los efectos de la administración de diferentes dosis del extracto sobre el metabolismo de los lípidos.

La investigación realizada para resolver ésta segunda estrategia configura el objetivo 2 de la presente Tesis Doctoral: **Efecto de los metabolitos de proantocianidinas presentes en suero tras la administración de diferentes dosis de GSPE sobre la síntesis y secreción de lípidos en células hepáticas.**

El conjunto de resultados obtenidos en relación con los objetivos 1 y 2 y su discusión se presentan como MANUSCRITO 1 de los que configuran esta Tesis Doctoral. En el DOCUMENTO 1 se resume la determinación del efecto observado con diferentes dosis de GSPE.

Con relativa frecuencia entre la población que presenta síndrome metabólico, la dislipemia se asocia a problemas de hipertensión arterial. Con la intención de ampliar el uso potencial de las proantocianidinas, nos planteamos la pregunta: **¿las moléculas activas en la corrección de la dislipemia tienen un efecto inhibitor de la enzima convertidora de angiotensina?** Así podríamos plantear la utilización de extractos ricos en las moléculas activas en la prevención del factor de riesgo de dislipemia e hipertensión.

En primer lugar, mediante un sistema *in vitro* se determinó el efecto sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, enzima clave para el control de la presión arterial, de un conjunto de 17 flavonoides de diferente estructura química, lo que permitió, mediante un estudio quimioinformático, establecer los requisitos estructurales que debe tener un flavonoide con efecto significativo en la inhibición de esta importante enzima y así poder predecir cual de las moléculas biodisponibles y activas en la prevención de la dislipemia tienen efecto simultáneo en la prevención de la hipertensión. El trabajo realizado en este contexto configura el objetivo 3 de la presente Tesis Doctoral: **Determinar la relación de la estructura de diferentes flavonoides sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina** y los resultados obtenidos así como su discusión se presentan en el MANUSCRITO 2 de los que configuran la presente Tesis Doctoral.

Establecido el hecho que las proantocianidinas tienen un efecto *in vitro* sobre la enzima convertidora de angiotensina, quisimos comprobar *in vivo* el efecto sobre la hipertensión arterial de las proantocianidinas de pepita de uva, de las que se tiene escasa información bibliográfica. Se trataba de responder a la última pregunta de la presente tesis: **¿las proantocianidinas de pepita de**

uva, tienen un efecto *in vivo* en la reducción de la tensión arterial? Para responder esta cuestión nos planteamos tres objetivos:

Objetivo 4: Evaluar el efecto agudo de proantocianidinas de pepita de uva sobre la tensión arterial en un modelo animal de hipertensión esencial

En este caso se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas, a las cuales se les administraron tres dosis diferentes de extracto de proantocianidinas de pepita de uva, analizando la tensión arterial sistólica y diastólica de las ratas antes y después de la administración del extracto, cuantificando en plasma la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y determinando en hígado la concentración de malondialdehído y de glutatión reducido como marcadores de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos y su discusión se presentan en el MANUSCRITO 3.

Objetivo 5: Conocer el mecanismo de actuación de las proantocianidinas de pepita de uva sobre la modificación de la tensión arterial

Si bien habíamos demostrado en el estudio de los objetivos anteriores el papel antihipertensivo de las proantocianidinas de pepita de uva en ratas espontáneamente hipertensas, y que la reducción del estrés oxidativo podría ser uno de los mecanismos envueltos en este efecto; era necesario determinar si la respuesta antihipertensiva observada estaba también mediada por factores relajantes derivados del endotelio. Con este fin se llevaron a cabo tanto ensayos *in vitro* como *in vivo* y se estudiaron los efectos del extracto de pepita de uva sobre el óxido nítrico y la prostaciclina PGI₂, los 2 principales relajantes vasculares liberados por el endotelio. En los estudios *in vitro*, se montaron aortas con y sin endotelio de animales hipertensos en baños de órganos tradicionales. También se montaron preparaciones con endotelio preincubadas con L-NAME (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico) o indometacina (inhibidor de la síntesis de PGI₂). Para el estudio *in vivo* se utilizó ratas espontáneamente hipertensas tratadas simultáneamente con L-NAME y el extracto de pepita de uva. Se analizó también el efecto sobre la

síntesis de prostaciclina tratando a los animales en éste caso con indometacina. Los resultados y su discusión configuran el MANUSCRITO 4 de los que conforman la presente Tesis Doctoral.

Objetivo 6: Evaluar el efecto antihipertensivo e hipolipidémico de la administración de proantocianidinas de pepita de uva en un modelo síndrome metabólico.

Una vez determinamos que las proantocianidinas de pepita de uva tienen un efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas y que el mecanismo involucrado está relacionado principalmente con la síntesis de óxido nítrico, se pasó a la última fase de esta Tesis Doctoral, estudiando en un modelo con síndrome metabólico, inducido por alimentación crónica con dieta de cafetería, los efectos de las proantocianidinas de pepita de uva sobre la tensión arterial y el metabolismo lipídico, para demostrar así la principal hipótesis de la presente Tesis Doctoral: las proantocianidinas de pepita de uva pueden usarse para corregir simultáneamente la tensión arterial y la dislipemia. Los resultados obtenidos se presentan discutidos en el DOCUMENTO 2.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Resultados y Discusión



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

MANUSCRITO 1

Serum metabolites from grape seed procyanidins decrease
lipid synthesis in HepG2 cells

Guerrero L., Margalef M., Pons Z., Arola L.,
Arola-Arnal A., Muguerza, B.

Enviado para su publicación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

**Serum Metabolites of Proanthocyanidin-treated rats decrease lipid synthesis
in HepG2 cells**

Guerrero L[#], Margalef M[†], Pons Z[†], Quiñones M[†], Arola L^{†§}, Arola-Arnal A[†],
and Muguerza B^{†§}.

[†] Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University,
Tarragona, 43007 Spain.

[#] Department of Research, Nutrition and Innovation, ALPINA S.A, Bogotá,
Colombia.

[§] Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), Reus, 43204, Spain

Running title: Lipid-lowering effect proanthocyanidin metabolites.

*Corresponding author: Dr. Anna Arola-Arnal

Dpt. Bioquímica i Biotecnologia, Universitat Rovira i Virgili, C/ Marcel·lí
Domingo s/n 43007 Tarragona, Spain.

Telephone: +34 977 55 86 30

Fax: +34 977 55 82 32

E-mail: anna.arola@urv.cat

Abstract

The regular consumption of flavonoids, which are phenolic compounds, has been associated with reduced mortality and a decreased risk of cardiovascular diseases (CVD). Grapes, wine, cocoa and pine are significant sources of flavonoids, particularly proanthocyanidins. However, the proanthocyanidins that are found in plasma are very different from the original flavonoids in food sources. Thus, the use of physiologically appropriate conjugates of proanthocyanidins is essential for the *in vitro* analysis of flavonoid bioactivity.

In this study, the effect of different proanthocyanidin-rich extracts, which were obtained from cocoa (CCX), French maritime pine bark (Pycnogenol extract, PYC) and grape seed (GSPE), on lipid homeostasis was evaluated. Hepatic human cells (HepG2 cells) were treated with 25mg/L of CCX, PYC or GSPE. We also performed *in vitro* experiments to assess the effect on lipid synthesis that is induced by the bioactive GSPE proanthocyanidins using the physiological metabolites that are present in the serum of GSPE-treated rats. Prior to its addition to the HepG2 cell cultures, the semi-purified serum of GSPE-treated rats was fully characterised by LC-QqQ/MS². The lipids studied in the analyses were free cholesterol (FC), cholesterol ester (CE) and triglycerides (TG).

All three proanthocyanidin-rich extracts induced a remarkable decrease in the *de novo* lipid synthesis in HepG2 cells. In addition, the metabolites of GSPE-treated rats serum reduced the total percentage of CE, FC and particularly TG; this reduction was significantly higher than that observed in the cells that were treated with GSPE directly. In conclusion, the bioactivity of the physiological metabolites that are present in the serum of rats after their ingestion of a proanthocyanidin-rich extract was demonstrated in Hep G2 cells.

Key words: Grape seed proanthocyanidin extract; serum metabolites; lipid synthesis; cell cultures; HepG2 cells.

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of death worldwide. According to the World Health Organization, 17.3 million people died from CVD in 2008; this number represents 30% of the total deaths worldwide. In addition, starting from 2015, it is estimated that approximately 20 million people will die every year from this disease. Among the modifiable risk factors for CVD, dyslipidaemia, hypertension, smoking and diabetes mellitus are of particular relevance [1]. Specifically, hyperlipidaemia, which is the elevation of cholesterol and/or triglyceride (TG) levels, is a significant risk factor for the development of atherosclerosis and heart disease.

There is a body of evidence that indicates that a diet rich in vegetables and fruits decreases the risk of CVD [2-4]; in addition, this decrease has been attributed to the phenolic compounds that are present in plants. Flavonoids are phenolic compounds that are commonly found in fruits and vegetables at high concentrations, and their regular consumption has been associated with a reduced mortality and a decreased risk of CVD [5-8]. More specifically, grapes, wine, cocoa and pine are known to be significant sources of flavonoids, particularly flavan-3-ols and proanthocyanidins [9,10].

It is well known that proanthocyanidins improve human health by affecting the cellular and physiological processes. Several studies have shown the beneficial effects of proanthocyanidins on lipid metabolism in different experimental models [11,12] and humans [13,14]. Our group has previously shown that the oral administration of grape seed proanthocyanidins significantly reduces the postprandial levels of TG-rich and ApoB-containing lipoproteins and improves several atherosclerotic risk indexes in normolipidemic rats [15]. In addition, grape seed proanthocyanidins lead to a reduction in the production and secretion of TG in the human hepatocarcinoma cell line HepG2 [16]. However, the effect of other proanthocyanidin extracts on lipid production and secretion has not been studied in hepatic cells.

It is generally accepted that polyphenol bioavailability is relatively poor [17], although the monomeric flavan-3-ols (or flavanols) are among the polyphenols that exhibit higher bioavailability [18]. Moreover, the rapid conversion of flavonoids into their metabolites is well known [19]. Therefore, the large amount of scientific data that has been generated using non-physiologically relevant forms and/or concentrations of flavonoids is questionable [20,21]. In fact, the limited description of flavonoid bioactivity that is based on studies that use non-physiologically relevant forms and/or concentrations of these compounds is considered the most important limitation in flavonoid research [20]. Thus, the development of *in vitro* models using physiologically appropriate conjugates, forms and concentrations of flavonoids that are more similar to those observed in tissues after the intake of these compounds is an important requirement for the analysis of flavonoid bioactivity [21]. Hence, we hypothesised that this question could be addressed through the treatment of cells with the sera of rats that were orally administered a proanthocyanidin-rich extract. In this study, the cells were incubated directly with the flavonoid metabolites in the rat sera, which would simulate the physiological conditions that occur within the body. The use of the sera of rats that were previously administered the compound under study for the treatment of cell cultures has been recently described. In fact, a previous study confirmed the bioactivity of bezafibrate, which is a known PPAR- γ ligand, in HeLa cells using serum [22].

Therefore, the aim of this study was to first evaluate the effect of different proanthocyanidin-rich extracts on the lipid production and secretion in HepG2 cells. Moreover, the lipid-lowering effect of bioactive proanthocyanidins was also evaluated using an *in vitro* system; in this system, the cells were treated with the physiological metabolites that were present in the serum of rats that ingested a grape seed proanthocyanidin extract (GSPE).

2. Materials and Methods

Chemicals and reagents

Chromatographic analysis: Methanol (Scharlab S.L., Barcelona, Spain), acetone (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and glacial acetic acid (Panreac, Barcelona, Spain) were of HPLC analytical grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q advantage A10 system (Madrid, Spain). The 1000mg/L standard stock solutions of (+)-catechin, (-)-epicatechin, gallic acid, epigallocatechin gallate, proanthocyanidin B2 and proanthocyanidin B1 (all from Fluka/Sigma - Aldrich, Madrid, Spain) in methanol and the 2000mg/L standard solution of pyrocatechol in methanol, which was used as an internal standard (Fluka/Sigma Aldrich, Madrid, Spain), were stored in a dark-glass flask at -20°C.

Standard stock mixtures with a concentration of 200mg/L of (+)-catechin, (-)-epicatechin, epigallocatechin gallate and gallic acid in methanol and 100mg/L of proanthocyanidin B2 and proanthocyanidin B1 in methanol were prepared weekly and stored at -20°C. These standard stock solutions were diluted daily to the desired concentration using an acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v:v:v) solution.

Cell culture: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), foetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin and streptomycin were purchased from Bio Whittaker Europe (Verviers, Belgium). The Bradford protein reagent was obtained from Bio-Rad Laboratories (Life Science Group, Hercules, CA, USA). ¹⁴C-acetate was purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England).

Proanthocyanidin-rich extracts

The grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) was provided by *Les Dérives Résiniques et Terpéniques* (Dax, France). According to the manufacturer, this proanthocyanidin extract contains monomeric (16.55%), dimeric (18.77%), trimeric (16%), tetrameric (9.3%) and oligomeric (>5) (35.7%)

proanthocyanidins. According to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, the total polyphenol content is 92%.

The cocoa proanthocyanidin extract (CCX) used for this study was provided by Natraceutical (Valencia, Spain). This extract was obtained from a polyphenol-rich cocoa powder that was produced from unfermented, blanch-treated, non-roasted cocoa beans, which preserve the degradation of polyphenols [23]. The data obtained using normal-phase HPLC showed that the proanthocyanidin cocoa extract contains monomeric (23.7%), dimeric (15.8%), trimeric (18.4%), tetrameric (13.9%) and oligomeric proanthocyanidins (>5) (36.2%) [24].

The pycnogenol extract (PYG) was provided by Shirota Functional Foods (Tarragona, Spain). The pycnogenol extract contains monomeric (38.0%), dimeric (40.9%) and oligomeric (containing more than 3 monomeric units, 62.0%) proanthocyanidins. The total polyphenol content of this extract was 84% [25].

Experimental procedure in rats

In this study, 17 to 20 week old male Wistar rats that weighed 300-350g were used. The Animal Ethics Committee of our University approved all procedures (reference number 6777 by Generalitat de Catalunya). The animals were obtained from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) and housed in animal quarters at 22°C with a 12/12-hour light/dark cycle (light from 9:00 a.m. to 21:00 p.m.). The animals consumed tap water and a standard chow diet (Panlab A04, Barcelona, Spain) ad libitum throughout the experiment. The rats were randomly divided into two groups: control (n=4) and GSPE (n=3). The rats from the experimental group were administered 1mL of 1g/kg of body weight of GSPE by oral gavage. The control group was orally administered 1mL of water. The corresponding treatments were administered between 9 and 10am after overnight fasting. Two hours after the treatment, the rats were anaesthetised with sodium pentobarbital (80mg/kg), and their blood was collected by cardiac

puncture (Figure 1). The blood was maintained at room temperature for 30min. Once the blood coagulated, it was centrifuged at 2000 x g and 4°C for 15min to obtain the serum. The sera was inactivated at 56°C for 30min to avoid the risk of complement-mediated cell lysis and stored at -80°C until analysis. All of the methods were in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the University Rovira i Virgili (Tarragona, Spain).

Extraction of serum proanthocyanidins

Prior to the cell culture and chromatographic analysis, the rat serum samples were pretreated by off-line μ SPE following the methodology that was previously described by Martí et al. (2010) [26] using 30- μ m OASIS HLB μ Elution Plates (186001828BA, Waters, Barcelona, Spain). Briefly, the micro-cartridges were sequentially conditioned with 250 μ L of methanol and 250 μ L of 0.2% acetic acid. Prior to extraction, the serum was centrifuged at 2000 x g and 4°C for 5 min. Two serum aliquots (each of 350 μ L) were mixed, each of them, with 300 μ L of 4% phosphoric acid and 50 μ L of pyrocatechol (2000ppb) and then loaded onto two different plates. The two loaded plates were washed with 200 μ L of Milli-Q water and 200 μ L of 0.2% acetic acid. The retained flavanols on each plate were eluted with 2 x 50 μ L of an acetone/Milli-Q water/acetic acid (70:29.5:0.5, v:v:v) solution. The two elutions were mixed to obtain a final volume of 200 μ L. Part of the solution (25 μ L) was evaporated to dryness using a SpeedVac Concentrator SPD 2010 SAVANT (Thermo Scientific, USA) at room temperature and redissolved in 25 μ L of an acetone/Milli-Q water/acetic acid (70:29.5:0.5, v:v:v) solution. These samples were then directly injected in the LC-QqQ/MS² for chromatographic analysis; the sample volume used was 2.5 μ L. The remaining 175 μ L of the semi-purified serum was also evaporated to dryness at room temperature using the same procedure described above and then stored at -80°C until its use in the cell culture experiments (Figure 1).

Chromatographic analysis

The chromatographic analysis was performed using a 1200 LC Series coupled to a 6410 QqQ/MS² (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). The separations were achieved using a Zorbax C18 (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8- μ m particle size) chromatographic column from Agilent Technologies. The mobile phase consisted of 0.2% acetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 0.4 mL/min. The elution gradient was 0-10min, 5-55% B, 10-12 min, 55-80% B, 12-15min, 80% B isocratic, and 15-16min, 80-5% B. A post run of 10 min was applied. The ESI conditions were the following: drying gas temperature and flow rate of 350°C and 12L/min, respectively, nebuliser gas pressure of 45 psi, and capillary voltage of 4,000 V. The QqQ was operated in the negative mode. The QqQ acquisition was performed in the MRM mode for the analysis of the proanthocyanidins and their metabolites.

Method validation and sample quantification

To validate the quantitative method, the calibration curves, linearity, extraction recovery, precision, sensitivity, and the method detection and quantification limits were studied through an analysis of the standard solutions and blank serum samples that were spiked with standard flavanols. The calibration curves were obtained by plotting the analyte/IS peak abundance ratios and the corresponding analyte/IS concentration ratios. The extraction recovery was evaluated through a comparison of the responses of the spiked samples with the calibration curves of the standard solutions. The precision of the method was assessed from the relative standard deviation (RSD) in a triplicate analysis of a spiked sample. The sensitivity was evaluated by determining the limit of detection (LoD), which is defined as the concentration that corresponds to three times the signal-to-noise ratio, and the limit of quantification (LoQ), which is defined as the concentration that corresponds to 10 times the signal-to-noise ratio. The method detection and quantification limits (MDL and MQL, respectively) were calculated in the analysis of 350 μ L of a

sample. Table 1 shows the values that were obtained for each quality parameter.

To quantify the samples, eight spiked blank samples with different concentration levels were used to obtain the calibration curves. The standard compounds in the samples were then quantified through the interpolation of the analyte/IS peak abundance ratios in these curves. Due to the lack of appropriate standards, the catechin, epicatechin and epicatechin gallate metabolites were tentatively quantified using the calibration curves of the catechin, epicatechin and EGCG standards, respectively. Similarly, the proanthocyanidin B3 dimer and the proanthocyanidin trimer were quantified using the calibration curves of the proanthocyanidin B2 dimer.

Cell culture

The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC code HB-8065, Manassas, VA, USA) was cultured in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) foetal calf serum, 100U/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine in a cell culture flask at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The cells were fed every 2-3 days.

Lipid analysis

Once they reached 80-90% confluence, the HepG2 cells were seeded at a cell density of 500 x 10³ cell/ well in 12-well plates. The growth medium was replaced by supplemented culture media 12 hours before the addition of the treatments. In the first *in vitro* study, the HepG2 cells were treated with 25 mg/L of GSPE, CCX, or PYG, which was dissolved in 1% EtOH, or vehicle (1% EtOH), which was used as the negative control. In the second *in vitro* study, the HepG2 cells were treated with the semi-purified rat serum. The dried semi-purified serum was redissolved in supplemented culture medium and then added to the growth medium on the well (1:10, v/v). GSPE (25 mg/L) and EtOH (1%) were used as positive and negative controls, respectively. In both *in vitro*

studies, ^{14}C -acetate (0.6 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) was added to the cell culture medium at the same time as the treatment to assess the lipid synthesis.

After 6 hours of treatment with the different proanthocyanidin extracts or sera, the media and cells were collected. The lipid fractions were obtained through a hexane/isopropanol (3:2, v:v) extraction and separated through thin layer chromatography (TLC). The lipids analysed in both studies were cholesterol ester (CE), free cholesterol (FC) and triglycerides (TG). TLC was performed as previously described [27] with an additional separation using a hexane/MTBE/ NH_3 (30:20:0.1, v:v:v) solvent to obtain the TG fraction [16]. The obtained lipid fractions were separated, and the radioactivity was measured by scintillation counting. The values were corrected per milligram of protein, which was determined using the Bradford methodology [28].

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error (SEM) of the mean and were analysed by Student's t-test and one-way ANOVA using the SPSS software. The differences between the groups were assessed using the Bonferroni test (to correct for multiple comparisons). The differences between the means were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

Proanthocyanidin-rich extracts decrease lipid synthesis and excretion in HepG2 cells

All three tested proanthocyanidin-rich extracts (GSPE, CCX and PYC) induced a 50-60% decrease in the synthesis of CE in HepG2 cells; no differences were observed between the three extracts (Figure 2A). Furthermore, GSPE and PYC also induced a 40-50% decrease in the levels of both FC and TG. However, even though CCX also induced a decrease in the FC and TG levels, this decrease was not statistically significant (Figures 2B and 2C).

Moreover, no significant difference was measured in the amount of CE, FC and TG in the medium in response to any of the three proanthocyanidin-rich extracts. Therefore, the observed decrease in the synthesis of FC, CE and TG was due to a significant reduction of the lipids inside the cells (Figure 2).

Characterisation of the GSPE metabolites in the rat serum

To assess the bioactive compounds in GSPE that affect the *de novo* lipid synthesis and excretion, we characterised the proanthocyanidin metabolites that are present in the sera of GSPE-treated rats by LC-ESI-QqQ/MS. This analysis was performed 2 hours after the administration of 1 g/kg GSPE to the rats. Figure 3 illustrates the extracted ion chromatograms of the analysis of the flavonoids and their metabolites. The results of this analysis are shown in Table 2, which details the amount of each flavonoid and metabolite in the rat serum. Hence, 2 hours after GSPE ingestion, the main compounds detected in the rat sera were conjugated forms of the monomeric flavan-3-ols (catechin and epicatechin). Specifically, the flavan-3-ol metabolites (epi)catechin glucuronide, methyl-(epi)catechin-glucuronide, epicatechin-sulphate, methyl-epicatechin and methyl-(epi)catechin-sulphate were detected at concentrations of at least 0.15 μ M (Table 2). The glucuronidated forms were present in the sera at a substantially higher concentration than the concentrations of the methylated and sulphated conjugates. However, in contrast to the high amount of these compounds in the extract, free forms of unconjugated catechin, epicatechin and dimeric proanthocyanidins were detected in low amounts [29]. Moreover, other compounds that were also abundant in GSPE were not detected in the sera, such as monomeric gallate conjugates and trimeric proanthocyanidins. The retention times of each compound are shown in Figure 3.

The metabolites in the serum of GSPE-treated rats decrease lipid synthesis and excretion in HepG2 cells.

Two hours after the administration of GSPE, the rat serum was extracted, semi-purified and used to treat HepG2 cells as a source of bioactive GSPE metabolites. The results show that the metabolites in the serum extracted from GSPE-treated rats significantly reduced the total percentage of CE and FC in both the cells and the culture medium compared with the effect obtained with the sera of rats that were administered water (Figures 4A and 4B). The percentage of TG was also reduced inside the cell but not in the medium (Figure 4C). The GSPE metabolites induced 39%, 52% and 72% reductions in the cellular levels of CE, FC and TG.

4. Discussion

Dietary procyanidins are known to have numerous potential health benefits; these compounds present a protective role against different cardiovascular risk factors [30,31], including high serum lipid levels. In fact, our research group have reported a reduction in postprandial TG as a result of the administration of 25 mg/kg of grape seed proanthocyanidin extract to normolipidemic rats [16], mice [32] and rats that receive a high-fat diet [33]. In addition, the GSPE-induced suppression of some lipogenic enzymes, which are induced by a high-fat diet, has been described [33,34]. Moreover, a previous *in vitro* study reported the reduction of *de novo* TG synthesis and secretion in HepG2 cells that were treated with 50 mg/kg GSPE [16].

In our study, the GSPE-treated HepG2 cells exhibited hypolipidemic effects compared to the control cells. In particular, we found a significant reduction in the accumulation of intracellular ¹⁴C-lipids but no significant differences in the lipid contents in the media. This result is likely because the incorporated radioactivity was measured after 6 and not after 12 hours of treatment, as previously described [16]. Interestingly, our results show that half of the dose of GSPE (25 mg/L) and half of the treatment duration was sufficient to reduce lipid

synthesis and production. Similar results were observed with the other proanthocyanidin-rich extracts (CCX and PYC). However, CCX did not significantly decrease the syntheses and the amount (both the cell and medium contents) of FC and TG (Figures 4B and 4C, respectively); this difference is likely because of the different composition of the extracts.

The data obtained using non-bioactive molecules and extracts to treat cultured cells have been questioned [22]. More specifically, the *in vitro* results obtained using non-physiologically relevant forms and/or concentrations of flavonoids is considered an important limitation of the studies that aim to determine the *in vivo* bioactivity of these compounds [20,21]. An important feature of polyphenols is the changes that occur to these molecules during first-pass metabolism. Thus, the molecular forms that reach the peripheral circulation and tissues are different from those that are present in foods [20]. In addition, the microflora extensively affect polyphenol hydrolysis and hence further contribute to the variation in the molecular forms of the polyphenols that are found in the blood and tissues [12,35,36]. These findings suggests that the bioactive forms of polyphenols are different from those that are present in food and that *in vitro* experiments with food polyphenols do not necessarily capture the *in vivo* situation [37]. In fact, GSPE is rich in monomers, namely catechin and epicatechin, which are found both free and conjugated to a gallate moiety, and dimers [29]. However, these free forms are not found in a high concentration in the serum, which is predominantly composed of conjugated metabolites, such as catechin and epicatechin glucuronide. Moreover, only dimeric proanthocyanidins are detected in serum, whereas trimeric proanthocyanidins are not detected despite their abundance in GSPE [29]. The serum metabolites that were detected in this study are similar to those that were previously reported by other authors that analysed plasma after the administration of the same dose of GSPE [29]. Therefore, the bioactive flavanols in rat serum differ considerably from the compounds that are present in GSPE. Hence, it is important to perform flavan-3-ol functionality studies using the metabolites in the serum of GSPE-treated rats for the treatment of cells.

In this study, we combined *in vivo* and *in vitro* systems to establish the bioactivity of proanthocyanidins on *de novo* lipid synthesis and excretion. Thus, HepG2 cells were incubated with the physiological metabolites that are present in the serum of GSPE-treated rats. The rat serum was obtained 2 hours after the administration of the proanthocyanidin-rich extract because the highest plasma peak concentrations of flavanols are obtained 2 to 3 hours after the ingestion of the extract in a dose-dependent manner [38,39]. Specifically, the maximum peaks were obtained in the plasma of rats that received 1 g/kg of GSPE 1 to 2 hours post-administration [29]. Moreover, before its use for the treatment of HepG2 cells and chromatographic analysis, the sera were semi-purified using a micro-solid-phase extraction procedure (μ SPE), which is a standard method that has been used prior to the chromatographic analysis of the polyphenols in biological samples, such as plasma [40]. Through this method, the numerous interferences in the sera, which are mainly proteins, are reduced. In addition to the pretreatment of the plasma, this method pre-concentrates the phenolic compounds because these are present in the plasma and serum in trace amounts [40]. Therefore, we consider this semi-purification and pre-concentration step crucial to obtain mostly purified bioactive flavonoids and metabolites for both chromatographic analysis and *in vitro* cell treatment.

The results obtained using the metabolites in the sera of GSPE-treated rats, which were compared to the results obtained with the sera of rats that were orally administered water, showed a decrease in the *de novo* lipid synthesis and excretion in HepG2 cells, which indicates that the physiological forms of the GSPE flavonoids also exhibit hypolipidemic properties. It was recently postulated that orally administered quercetin and likely other flavonoids are conjugated in the intestine and liver prior to its transport to the bloodstream and that the flavonoid released from its glucuronidated metabolite is responsible for its activity [41,42]. Although our study has been performed with other cell types and using other flavonoids that are different from quercetin, as well as with extracts instead of pure compounds, the obtained results also show the bioactivity of the conjugated metabolites.

Moreover, unlike the results obtained with the GSPE extract-treated cells, the HepG2 cells that were grown in the semi-purified sera of GSPE-treated rats exhibited a significant reduction in ^{14}C -lipids accumulation compared to the cells that were treated with the semi-purified sera of rats that only received water. This reduction in the lipid accumulation was observed in both the cells and the medium, with the exception of TG, which exhibited no differences in the medium. This finding illustrates that the semi-purified serum of GSPE-treated rats affects not only *de novo* lipid synthesis but also lipid excretion. Interestingly, the reduction in TG synthesis in Hep G2 cells that were treated with the semi-purified serum of GSPE-treated rats was significantly higher than in the cells that were treated with GSPE directly (72% compared to 28%). Similarly, a marked decrease in the TG level was also observed in previous *in vivo* studies that administered GSPE to rats [15]. This marked reduction in lipid synthesis and excretion (especially TG synthesis and excretion) that is observed in cells that were treated with the metabolites of the serum of GSPE-treated rats is consistent with the results of other *in vivo* studies, which showed that GSPE induced a clear hypotriglyceride effect in animals.

In conclusion, this study demonstrates the high hypolipidemic *in vitro* effect of different proanthocyanidin-rich extracts. Furthermore, the bioactivity of the proanthocyanidin metabolites in the serum of GSPE-treated rats was also demonstrated in HepG2 cells, which exhibited a decrease in lipid synthesis and excretion.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (AGL 2008-00387/ALI) and the Universitat Rovira i Virgili-Banco Santander (2011 LINE-12 and 2011 LINE-13).

References

1. Smith SC, Jr. (2007) Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine* 120: S3-S11.
2. Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB (1996) Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochemical Society transactions* 24: 785-789.
3. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JAE, Stampfer MJ, Rimm EB, et al. (2001) The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 134: 1106-1114.
4. Liu S, Lee IM, Ajani U, Cole SR, Buring JE, et al. (2001) Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study. *International journal of epidemiology* 30: 130-135.
5. Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* 155: 381.
6. Ariga T (2004) The antioxidative function, preventive action on disease and utilization of proanthocyanidins. *Biofactors* 21: 197-201.
7. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L (2005) Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular nutrition & food research* 49: 159-174.
8. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, et al. (2008) Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88: 38-50.

9. Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH (2000) Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The Journal of nutrition* 130: 2086S-2092S.

10. Borriello A, Cucciolla V, Della Ragione F, Galletti P (2010) Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20: 618-625.

11. Bladé C, Arola L, Salvadó MJ (2010) Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Molecular nutrition & food research* 54: 37-59.

12. Gonthier MP, Donovan JL, Texier O, Felgines C, Remesy C, et al. (2003) Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine* 35: 837-844.

13. Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, et al. (2007) Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *The Journal of nutrition* 137: 1436-1441.

14. Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, et al. (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4604-4609.

15. Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay M, Ardèvol A, Salvadó MJ, et al. (2005) Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *The FASEB journal* 19: 479-481.

16. Del Bas JM, Ricketts ML, Baiges I, Quesada H, Ardevol A, et al. (2008) Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear

receptor small heterodimer partner. *Molecular nutrition & food research* 52: 1172-1181.

17. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition* 130: 2073S-2085S.

18. Tomas-Barberán FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo Á, et al. (2007) A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 3926-3935.

19. Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 829-837.

20. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, et al. (2004) How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *The American Journal of Clinical Nutrition* 80: 15-21.

21. Kay CD (2010) The future of flavonoid research. *British Journal of Nutrition* 104: 91.

22. del Bas JM, Laos S, Caimari A, Crescenti A, Arola L (2012) Detection of bioavailable PPAR γ modulators by a cell-based luciferase reporter system. *Analytical Biochemistry*.

23. Quiñones M, Miguel M, Muguerza B, Aleixandre A (2011) Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 2: 649-653.

24. Andújar I, Recio MC, Giner RM, Cienfuegos-Jovellanos E, Laghi S, et al. (2011) Inhibition of ulcerative colitis in mice after oral administration of a polyphenol-enriched cocoa extract is mediated by the inhibition of STAT1 and STAT3 phosphorylation in colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 6474-6483.

-
25. D'Andrea G (2010) Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 81: 724-736.
 26. Martí MP, Pantaleón A, Rozek A, Soler A, Valls J, et al. (2010) Rapid analysis of procyanidins and anthocyanins in plasma by microelution SPE and ultra-HPLC. *Journal of separation science* 33: 2841-2853.
 27. Pill J, Aufenanger J, Stegmeier K, Schmidt FH, Müller D (1987) Thin-layer chromatography of radioactively labelled cholesterol and precursors from biological material. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 327: 558-560.
 28. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
 29. Serra A, Maci A, Romero MP, Valls J, Blad C, et al. (2010) Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition* 103.
 30. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, et al. (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 1024-1029.
 31. Heiss C, Keen CL, Kelm M (2010) Flavanols and cardiovascular disease prevention. *European heart journal* 31: 2583-2592.
 32. Del Bas JM, Ricketts ML, Vaqué M, Sala E, Quesada H, et al. (2009) Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Molecular nutrition & food research* 53: 805-814.
 33. Quesada H, Del Bas JM, Pajuelo D, Diaz S, Fernandez-Larrea J, et al. (2009) Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a

high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *International journal of obesity* 33: 1007-1012.

34. Baiges I, Palmfeldt J, Blade C, Gregersen N, Arola L (2010) Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet. *Molecular & Cellular Proteomics* 9: 1499-1513.

35. Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics* 24: 117.

36. Dall'Asta M, Calani L, Tedeschi M, Jechiu L, Brighenti F, et al. (2012) Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition* 28: 197-203.

37. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MRA, et al. (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free radical research* 35: 941-952.

38. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, et al. (2003) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 424: 1013.

39. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, et al. (2000) Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of nutrition* 130: 2109S-2114S.

40. Suárez M, Romero MP, Macià A, Valls RM, Fernández S, et al. (2009) Improved method for identifying and quantifying olive oil phenolic compounds and their metabolites in human plasma by microelution solid-phase extraction plate and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 877: 4097-4106.

41. Menendez C, Dueñas M, Galindo P, González-Manzano S, Jimenez R, et al. (2011) Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: The flavonoid paradox revealed? *Molecular nutrition & food research*.

42. Galindo P, Rodriguez-Gómez I, González-Manzano S, Dueñas M, Jiménez R, et al. (2012) Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PloS one* 7: e32673.

Figure legends

Figure 1. Graphical representation of the *in vivo* and *in vitro* systems used in this study.

Figure 2. Effect of proanthocyanidin-rich extracts on lipid synthesis and secretion in HepG2 cells. Changes induced by GSPE, CCX and PYC on the *de novo* synthesis and secretion of CE (A), FC (B) and TG (C). The HepG2 cells were simultaneously incubated with ¹⁴C-labelled acetate and 25 mg/L of GSPE, CCX, PYG or vehicle (control). After 6 h of treatment, the radioactivity that was incorporated into the media and cellular lipids was measured. All of the values are the mean ± SEM of triplicates of three independent experiments; the bars with different letters indicate statistically significant differences compared to the control (p <0.05).

Figure 3. Extracted ion chromatograms of the compounds in Table 2. These chromatographs were used for the analysis of the serum of GSPE-treated rats. The serum was extracted 2 h after the administration of 1 g/kg of GSPE. The following compounds were analysed: (1) gallic acid; (2) B1 dimer; (3) B1+B3 dimer; (4) B2 dimer; (5) methyl- catechin-glucuronide; (6) methyl-epicatechin-glucuronide; (7) catechin glucuronide; (8) epicatechin glucuronide; (9) catechin; (10) epicatechin; (11) epicatechin sulphate; (12) epicatechin gallate; (13) methyl-catechin-O-sulphate; (14) methyl-epicatechin-O-sulphate; (15) 3-methyl-epicatechin; and (16) 4-methyl-epicatechin.

Figure 4. Effect of semi-purified serum from GSPE-treated rats on lipid synthesis and secretion in HepG2 cells. Changes induced by the semi-purified serum of GSPE-treated rats on the *de novo* synthesis and secretion of CE (A), FC (B) and TG (C). The serum was extracted 2 h after the administration of 1 g/kg of GSPE. The HepG2 cells were simultaneously incubated with ¹⁴C-labelled acetate and semi-purified rat serum. After 6 h of treatment, the radioactivity that was incorporated into the media and the cellular lipids was measured. All of the values are the mean ± SEM of triplicates of three independent experiments.

Table 1. Quality parameters of the quantitative method used for the determination of proanthocyanidins by LC-ESI-QqQ/MS².

Compound	Calibration curve	Determination coefficient	Linearity (μM)	Recover y (μM)	Precisión (%RDS, n=3)	LoD (μM)	LoQ (μM)	MDL ^a (μM)	MQL ^a (μM)
Catechin	$y=0.1472x$	0.9904	0.19-39	99	0.2981	0.0207	0.0689	0.0059	0.0197
Epicatechin	$y=0.1127x$	0.9955	0.18-36	80	1.0576	0.0124	0.0413	0.0035	0.0118
B2 Dimer	$y=0.2474x$	0.9974	0.04-9,0	92	0.2680	0.0069	0.0230	0.0020	0.0066
B1 Dimer	$y=0.3335x$	0.9984	0.04-8.6	69	0.8537	0.0311	0.1037	0.0089	0.0296
EGCG	$y=2.0337x$	0.9960	0.2-12	73	8.7665	0.0012	0.0040	0.0003	0.0011
Gallic Acid	$y=0.2719x$	0.9816	0.31-61	48	0.4225	0.0353	0.1176	0.0101	0.0336

^a Method detection and quantification limits are expressed in $\mu\text{mol/L}$ of fresh sample, which was calculated for the analysis of a 350- μl serum sample.

Abbreviations: EGCG, Epigallocatechin Gallate; LOD, Limit of Detection; LOQ, Limit of Quantification; MDL, Method Detection Limit; MQL, Method Quantification *Limit*

Table 2. Flavonoids and metabolites in the serum of rats that ingested an acute dose of 1 g/kg of grape seed proanthocyanidins extract (GSPE). The quantification was performed 2 h after the administration of GSPE. The data are presented as the mean (μM) \pm SEM (n=4).

Compound	Total amount (μM)
Catechin	0.08 \pm 0.02
Epicatechin	0.52 \pm 0.14
Procyanidin B1 dimer	0.10 \pm 0.06
Procyanidin B2 dimer	0.19 \pm 0.50
Procyanidin B3 dimer ⁽³⁾	0.10 \pm 0.02
Gallic acid	0.89 \pm 0.13
Epicatechin gallate ⁽⁴⁾	n.d
Dimer gallate ⁽³⁾	n.d
Trimer ⁽³⁾	n.d
EGCG	n.d
Metabolites	
Catechin - glucuronide ⁽¹⁾	>39 \pm 14.89
Epicatechin -glucuronide ⁽²⁾	>36 \pm 14.51
Methyl-catechin-glucuronide ⁽¹⁾	14.89 \pm 1.96
Methyl-epicatechin-glucuronide ⁽²⁾	12.35 \pm 1.16
Catechin-sulphate ⁽¹⁾	n.d
Epicatechin-sulphate ⁽²⁾	0.76 \pm 0.16
3- <i>o</i> -methyl-epicatechin ⁽²⁾	0.15 \pm 0.03
4- <i>o</i> -methyl-epicatechin ⁽²⁾	0.34 \pm 0.05
Methyl-catechin- <i>O</i> -sulfate ⁽¹⁾	1.50 \pm 0.30
Methylepicatechin- <i>O</i> -sulphate ⁽²⁾	3.91 \pm 0.63

Abbreviations:

n.d. = not detected;

n.d. = not quantified;

EGCG= Epigallocatechin Gallate

¹ Quantified as Catechin

² Quantified as Epicatechin

³ Quantified as Dimer B2

⁴ Quantified as EGCG

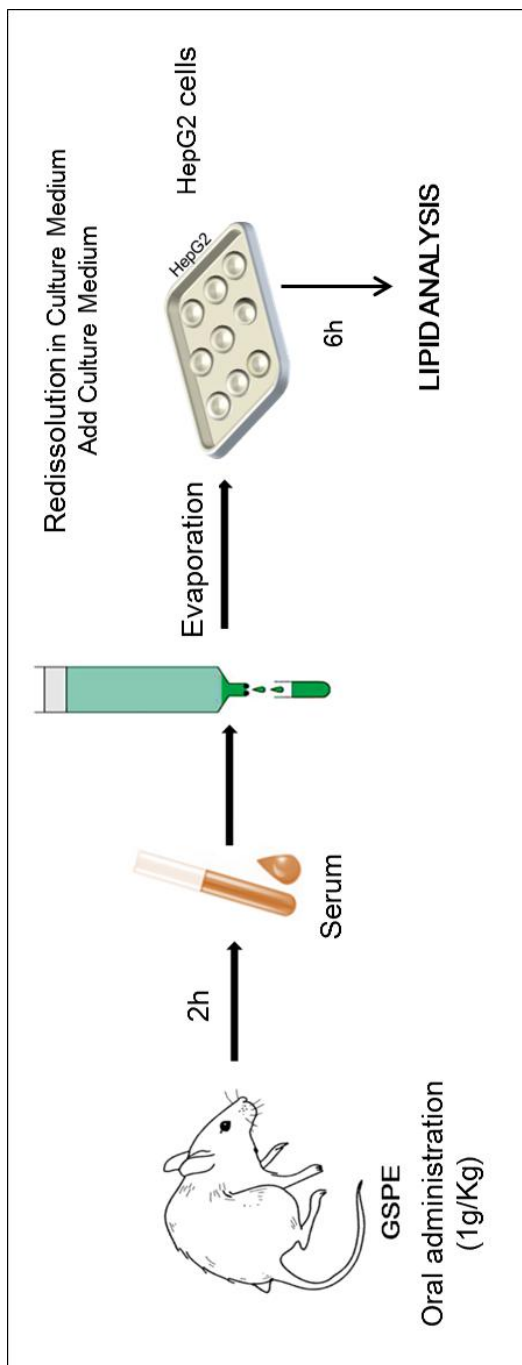


Figure 1. Graphical representation of the in vivo and in vitro systems used in this study

Figure 2.

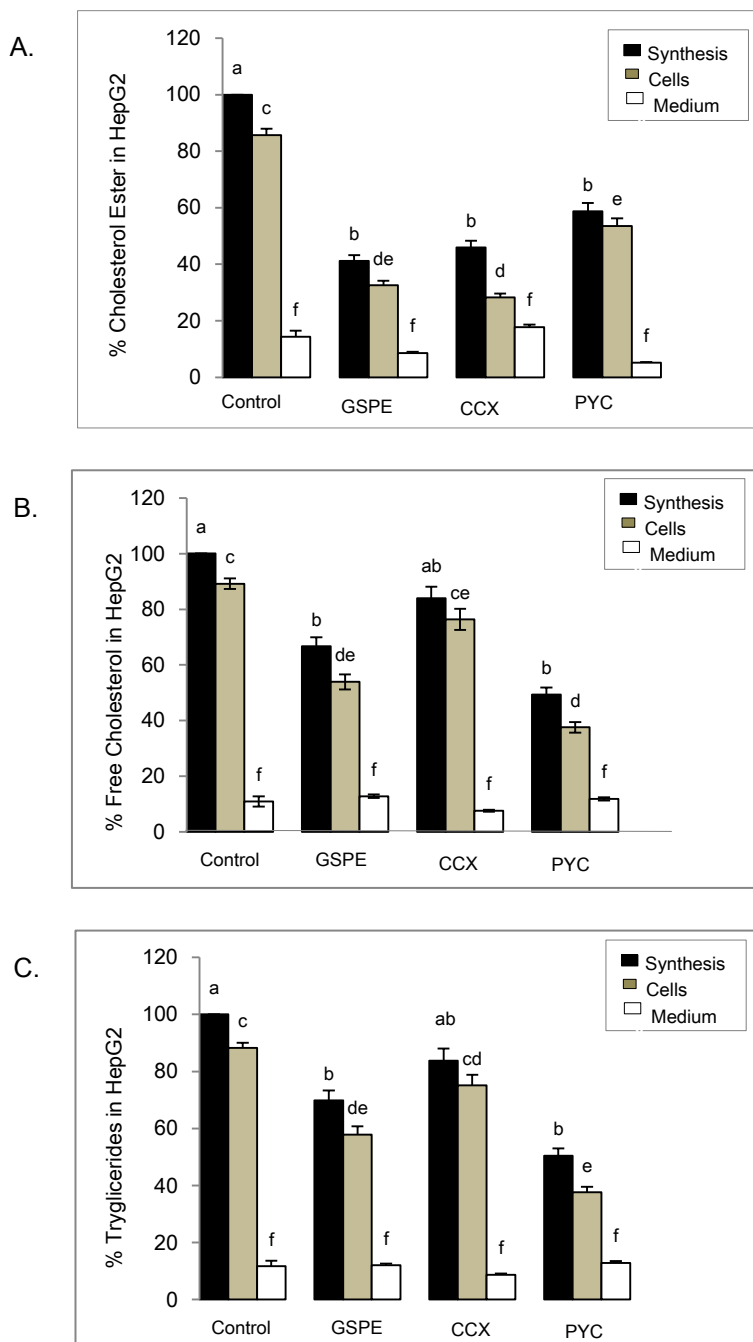


Figure 3.

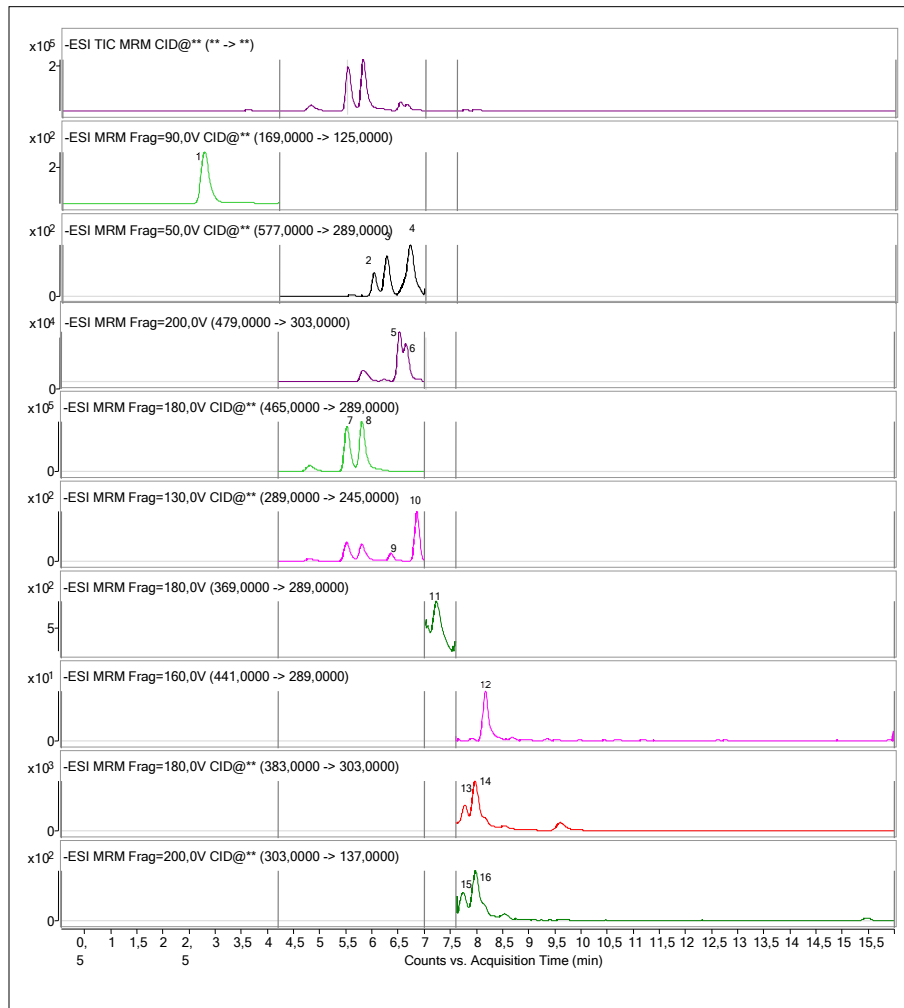
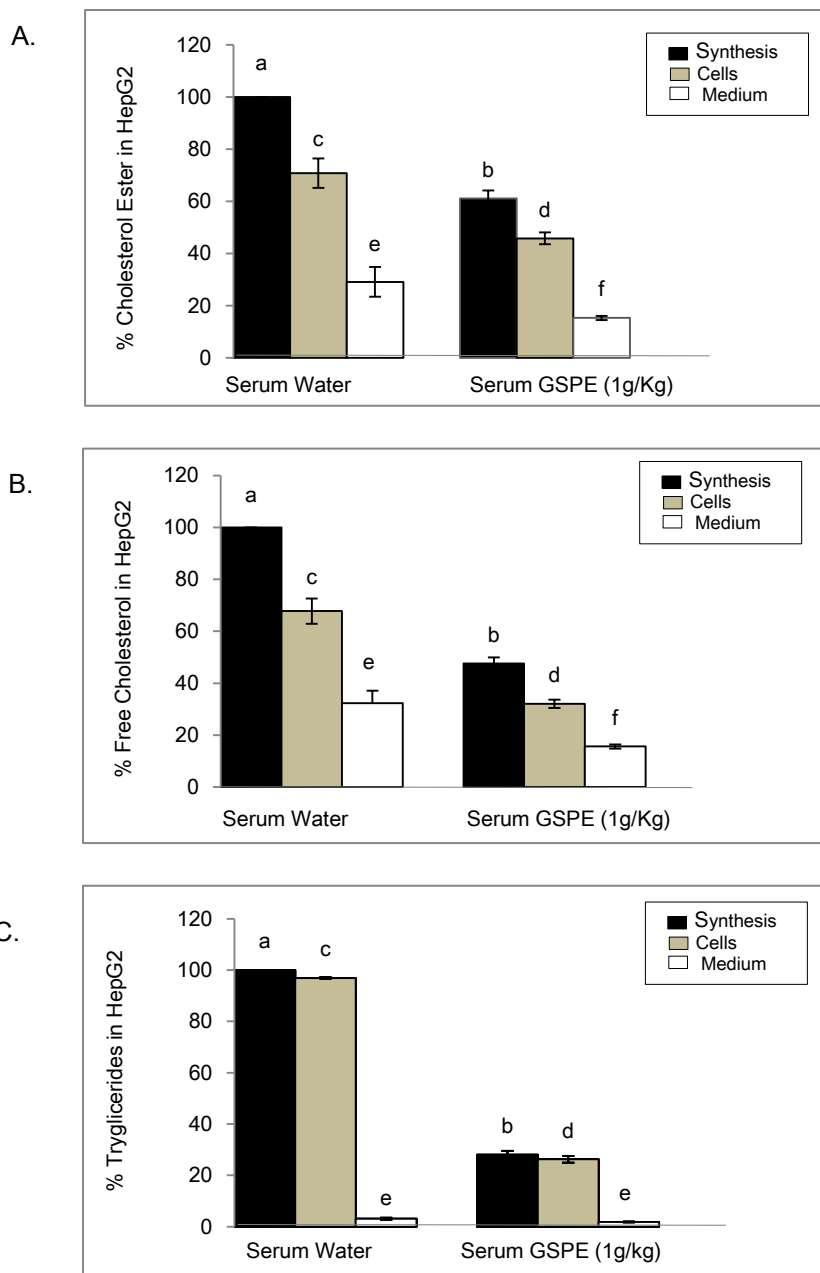


Figure 4.



DOCUMENTO 1

Efecto de los metabolitos de proantocianidinas presentes
en suero tras la administración de diferentes dosis de
GSPE sobre la síntesis y secreción de lípidos en células
HepG2

Guerrero L., Margalef M., Pons Z., Arola L.,
Arola-Arnal A., Muguerza, B.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Como ya se ha indicado, el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral se centra en la evaluación del efecto de diferentes PA y sus metabolitos sobre la síntesis y secreción de lípidos en células HepG2. Como parte de esta evaluación, y como ampliación del trabajo presentado como Manuscrito 1: *Serum metabolites from grape seed procyanidins decrease lipid synthesis in HepG2 cells*, se presentan los resultados sobre el metabolismo de los lípidos en células hepáticas, del efecto de las formas fisiológicas de las PA presentes en el suero de ratas a las que se han administrado diferentes dosis de GSPE.

EFFECTO DE LOS METABOLITOS DE PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EN SUERO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE DIFERENTES DOSIS DE GSPE SOBRE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LÍPIDOS EN CÉLULAS HEPG2

Materiales y métodos

Se utilizaron 12 ratas Wistar macho con edades comprendidas entre 17–20 semanas de vida y con un peso entre 300–326g. Los animales fueron obtenidos de Charles River Laboratory (Barcelona, España) y mantenidos en jaulas individuales a una temperatura de 22°C, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad; recibiendo agua del grifo y una dieta estándar (Panlab A04, Barcelona, España) *ad libitum* durante todo el experimento. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos a los que se les administró mediante una sonda gástrica 1mL de agua (n=3) o GSPE disuelto en 1mL de agua a diferentes dosis 125mg/kg (n=3), 250mg/Kg (n=3) y 375mg/Kg (n=3). La administración del agua o del GSPE se realizó entre las 9 y 10am, después de una noche de ayuno. Dos horas después de la administración, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (80mg/kg) y se recogió la sangre por el método de punción cardiaca. La sangre se dejó a temperatura ambiente durante 30min para su coagulación y luego fue centrifugada (2000g, 15min, 4°C) para obtener el suero. Los sueros se inactivaron a 56°C durante 30min para evitar el riesgo de lisis mediada por células del complemento y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Los procedimientos empleados con los animales siguieron las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España).

La extracción de las PA del suero, el análisis cromatográfico de las muestras, la validación del método, la cuantificación de las muestras y el análisis de los lípidos (ésteres de colesterol (EC), colesterol libre (FC) y triacilgliceroles (TG)) celulares se realizaron siguiendo los procedimientos descritos en el Manuscrito 1: *Serum metabolites from grape seed procyanidins decrease lipid synthesis in HepG2 cells*.

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (SEM) y se analizaron mediante las prueba de *t-Student* para muestras independientes y un ANOVA de una vía utilizando el software SPSS. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Bonferroni (para comparaciones múltiples). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$.

Resultados

Caracterización de los metabolitos séricos utilizando diferentes dosis de GSPE

Los metabolitos de las PA presentes en los sueros de las ratas a las 2 horas después de la administración oral de diferentes dosis del GSPE (375, 250 y 125mg/Kg) fueron caracterizadas por LC-ESI-QqQ/MS² con el objetivo de conocer las formas fisiológicas de las PA presentes en el GSPE que posteriormente fueron usadas para incubación con las células HepG2.

Del mismo modo que en el Manuscrito 1 se estudiaron los parámetros de calidad del método cuantitativo para la determinación de PA por LC-ESI-QqQ/MS². En la tabla 1 se muestran los parámetros de calidad relacionados con la linealidad y reproducibilidad de las analíticas.

Después de 2 horas de la ingestión de GSPE, los principales compuestos detectados para todas las dosis estudiadas fueron las formas conjugadas de los monómeros de flavan-3-oles (catequina y epicatequina). Específicamente, se detectaron los siguientes metabolitos: (epi)catequina- glucuronidada, metil-(epi)catequina glucuronidada, catequina-sulfato, metil-epicatequina y metil-(epi)catequina glucuronidada, en concentraciones mayores de 0.15 μ M para la

dosis de 375mg/Kg y con una reducción gradual con las otras 2 dosis (250 y 125mg/Kg).

Tabla 1. Parámetros de calidad del método cuantitativo usado para la determinación de PA mediante LC-ESI-QqQ/MS².

Compuesto	Curva de Calibración	Coefficiente de Determinación (R^2)	Linealidad (μM)	Recuperación (μM)	Precisión (%RDS, n=3)	LoD (μM)	LoQ (μM)	MDL ^a (μM)	MQL ^a (μM)
Catequina	y=0.5255x	0.9974	0.19-39	94	7.0218	0.0138	0.0459	0.0039	0.0131
Epicatequina	y=0.4115x	0.9966	0.18-36	81	4.8893	0.0124	0.0413	0.0035	0.0118
Dímero B2	y=4.7307x	0.9971	0.04-9.0	76	1.8267	0.0035	0.0115	0.0010	0.0033
Dímero B1	y=1.2580x	0.9932	0.04-8.6	64	3.6138	0.0104	0.0346	0.0030	0.0099
EGCG	y=3.3445x	0.9954	0.2-12	61	19.683	0.0012	0.0040	0.0003	0.0011
Ácido Gálico	y=0.2557x	0.9981	0.31-61	45	1.0080	0.0705	0.2351	0.0202	0.0672

Resultados expresados en $\mu\text{mol/L}$ de muestra fresca, calculado para 350 μL de muestra de suero
 Abreviaturas: EGCG (epigallocatequina galato); LoD (límite de detección); LoQ (límite de cuantificación),
 MDL (límite de detección); MQL (Límite de Cuantificación del Método).

En la figura 1 se presenta un cromatograma que muestra la separación de los compuestos presentes en el suero después de 2 horas de la administración de las diferentes dosis del GSPE. En color negro se representan los picos detectados con la dosis de 375mg/kg, en color rojo los correspondientes a la dosis de 250mg/kg y el color azul los observados con la dosis de 125mg/kg.

Los resultados de la cuantificación de flavanoles y sus metabolitos mostraron diferencias entre los sueros de las ratas a las que se administraron diferentes dosis de GSPE (tabla 2). Para todas las dosis estudiadas las formas glucuronidadas se encontraron presentes en el suero en una concentración sustancialmente mayor que los metabolitos metilados y sulfatados. Asimismo, se detectaron formas libres de catequina, epicatequina, dímeros de PA, ácidos fenólicos, como el ácido gálico en menores cantidades, variando su concentración desde 0,04 hasta 0,74 μM .

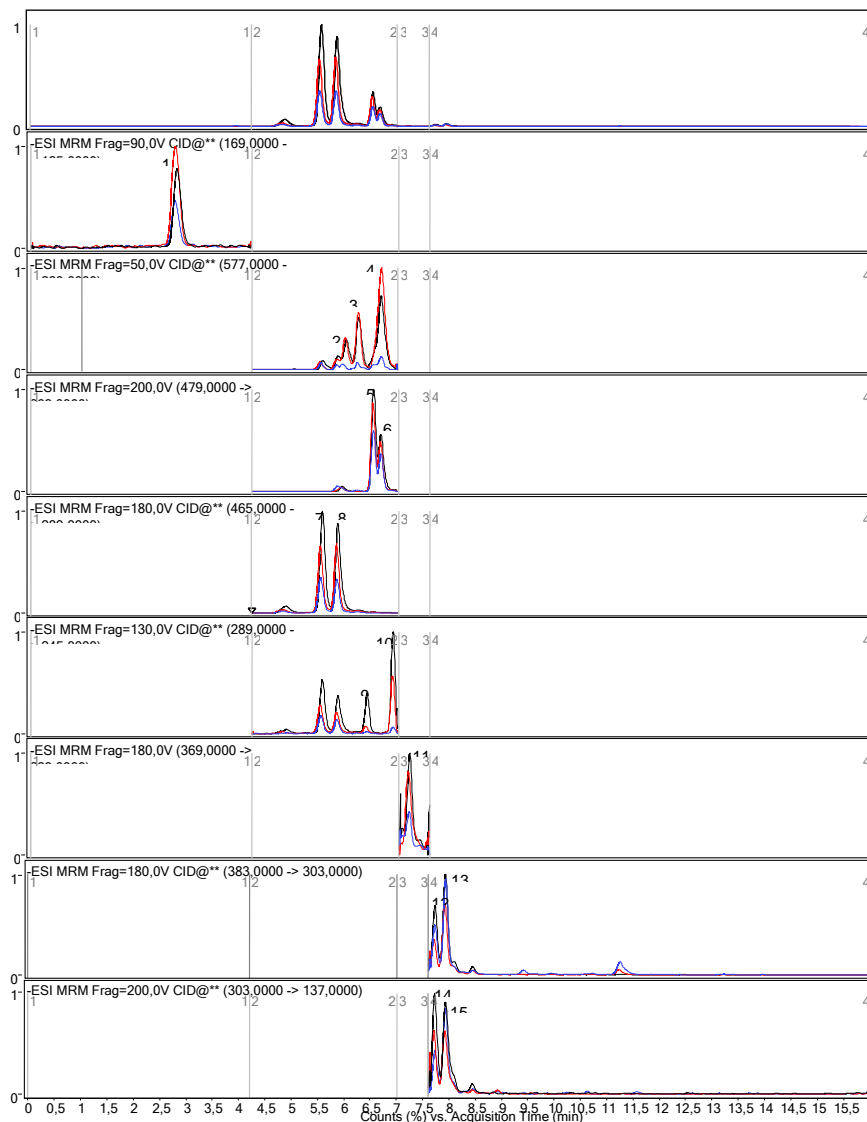


Figura 1: Cromatograma de los compuestos incluidos en la Tabla 2 para el análisis del extracto de suero 2 horas después de la administración de GSPE (375, 250 y 125mg/kg). El color negro muestra los picos relacionados con la dosis de 375mg/kg, el color rojo indica los picos relacionados con la dosis de 250mg/kg y el color azul muestran las picos relacionados con la dosis de 125mg/kg. (1)Ácido Gálico; (2)Dímero B1; (3)Dímero B3; (4)Dímero B2; (5)Metil-catequina-glucurónido; (6)Metil-epicatequina-glucurónido; (7)Catequina glucurónido; (8)Epicatequina glucurónido; (9)Catequina; (10)Epicatequina; (11)Epicatequina sulfato; (12)Metil-catequina-O-sulfato; (13)Metil-epicatequina-O-sulfato; (14)3-metil-epicatequina; (15)4-metil-epicatequina.

Tabla 2. Flavanoles y sus metabolitos cuantificados en suero de ratas 2 horas después de la ingestión de una dosis aguda del extracto de proantocianidinas de semillas de uva (375 mg/kg, 250 mg/kg o 125 mg/kg). Los datos se presentan como la media del SEM) (n = 4)

Compuesto	Cantidad total (μM)		
	375mg/Kg	250mg/Kg	125mg/Kg
Catequina	0.15 \pm 0.034 ^a	0.06 \pm 0.023 ^b	0.04 \pm 0.013 ^b
Epicatequina	0.74 \pm 0.148 ^a	0.56 \pm 0.188 ^{a,b}	0.24 \pm 0.051 ^b
Proantocianidina dímero B1	0.03 \pm 0.024 ^a	0.01 \pm 0.003 ^a	n.q
Proantocianidina dímero B2	0.03 \pm 0.019 ^a	0.01 \pm 0.003 ^a	n.q
Proantocianidina dímero B3 ⁽³⁾	0.012 \pm 0.004 ^a	n.q	n.q
Ácido gálico	0.58 \pm 0.238 ^a	0.46 \pm 0.034 ^a	0.21 \pm 0.087 ^a
Epicatequina galato ⁽⁴⁾	n.d	n.d	n.d
Dímero galato ⁽⁴⁾	n.d	n.d	n.d
Trímero ⁽³⁾	n.d	n.d	n.d
EGCG	n.d	n.d	n.d
Metabolitos			
Catequina-glucurónido ⁽¹⁾	>39 \pm 13.838	>39 \pm 1.273	32.43 \pm 7.789
Epicatequina-glucurónido ⁽²⁾	>36 \pm 25.968	>36 \pm 2.967	>36 \pm 9.990
Metil-catequina-glucurónido ⁽²⁾	22.04 \pm 1.678 ^a	17.71 \pm 1.673 ^b	12.58 \pm 1.037 ^b
Metil-epicatequina-glucurónido ⁽²⁾	19.02 \pm 2.749 ^a	12.46 \pm 0.858 ^{a,b}	9.73 \pm 1.064 ^b
Catequina-sulfato ⁽¹⁾	0.53 \pm 0.358 ^a	0.14 \pm 0.055 ^a	0.06 \pm 0.010 ^a
Epicatequina-sulfato ⁽²⁾	n.d	n.d	n.d
3- <i>O</i> -metil-epicatequina ⁽²⁾	0.33 \pm 0.094 ^a	0.11 \pm 0.025 ^a	0.12 \pm 0.010 ^a
4- <i>O</i> -metil-epicatequina ⁽²⁾	0.42 \pm 0.143 ^a	0.13 \pm 0.019 ^a	0.15 \pm 0.016 ^a
Metil-catequina- <i>O</i> -sulfato ⁽¹⁾	1.97 \pm 0.847 ^a	0.47 \pm 0.122 ^a	0.62 \pm 0.043 ^a
Metil-epicatequina- <i>O</i> -sulfato ⁽²⁾	4.49 \pm 1.553 ^a	1.48 \pm 0.329 ^a	1.55 \pm 0.308 ^a

Abreviaturas: n.d.=no detectado; n.q.=no cuantificado; EGCG=Epigallocatequina Galato

¹Cuantificada como Catequina;

²Cuantificada como Epicatequina;

³Cuantificada como Dímero B2;

⁴Cuantificada como EGCG

Efecto de diferentes dosis de metabolitos de GSPE sobre la síntesis de ésteres de colesterol en células HepG2

La incubación de las células HepG2 en presencia de los sueros de los animales a los que se administró GSPE produjo una disminución en la síntesis total de EC con respecto al suero de los animales a los que se administró agua (figura 2). Aunque solo con los sueros pertenecientes a las ratas a las que se administró la dosis más alta de GSPE (375mg/kg) la disminución en la síntesis de EC fue estadísticamente significativa con respecto a los animales control ($72 \pm 8,6\%$, considerando la síntesis de EC del grupo control como el 100%). Las diferencias observadas en la síntesis de EC fueron debidas a una disminución en los lípidos intracelulares. No se observaron diferencias en el porcentaje de EC secretado por la células al medio de cultivo, ni entre ninguna de las dosis estudiadas con respecto al control, tampoco hubo diferencia entre las dosis.

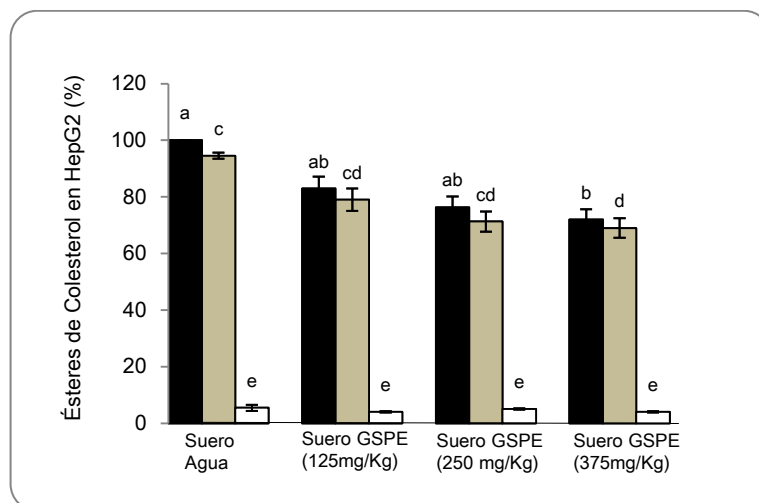


Figura 2: La gráfica indica la radioactividad incorporada en las células (■) y el medio de cultivo (□). La síntesis total representa la suma de la radioactividad presente en las células y en el medio de cultivo (▒). Los resultados se expresan como los valores medios \pm del SEM del triplicado de tres experimentos diferentes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) determinado por ANOVA.

Efecto de diferentes dosis de metabolitos de GSPE sobre la síntesis del colesterol libre en células HepG2

La cantidad total de FC sintetizado fue menor cuando las células se incubaron con los metabolitos presentes en los diferentes sueros estudiados, no encontrando diferencias entre las tres dosis, aunque sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para las dosis de 375mg/Kg y 125mg/Kg. También en el caso del FC las diferencias observadas en su síntesis son debidas a diferencias en la cuantificación de FC a nivel intracelular, en el cual tampoco aparecen diferencias entre dosis. El porcentaje de FC secretado por las células al medio de cultivo es similar tanto para las tres dosis estudiadas como para el control. Los resultados relativos al metabolismo del FC se muestran en la figura 3.

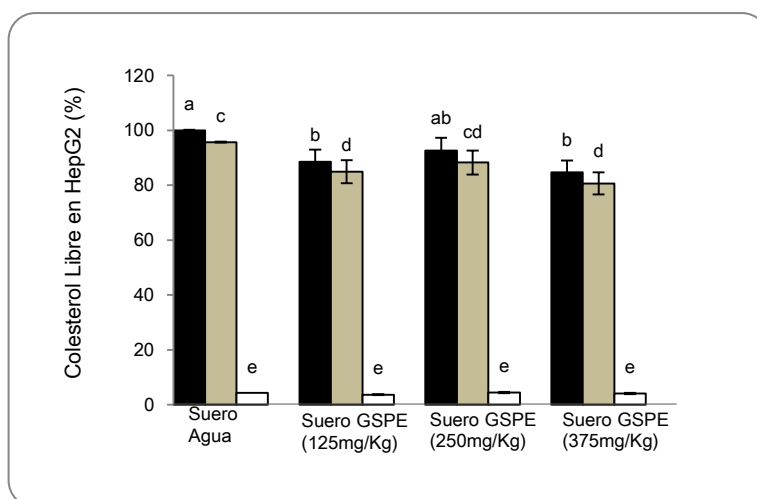


Figura 3: La gráfica indica la radioactividad incorporada en las células (■) y el medio de cultivo (□). La síntesis total representa la suma de la radioactividad presente en las células y en el medio de cultivo (■). Los resultados se expresan como los valores medios \pm del SEM del triplicado de tres experimentos diferentes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) determinado por ANOVA.

Efecto de diferentes dosis de metabolitos de GSPE sobre la síntesis de triacilgliceroles en células HepG2

Aunque para todas las dosis se puede observar una disminución de la síntesis de TG, solo en el caso de la dosis de 125mg/Kg las diferencias observadas fueron estadísticamente significativas con respecto al control ($73 \pm 4,0\%$, considerando que el valor del control corresponde al 100%). La secreción de TG en el medio de cultivo celular es similar tanto para las tres dosis de metabolitos como para el control.

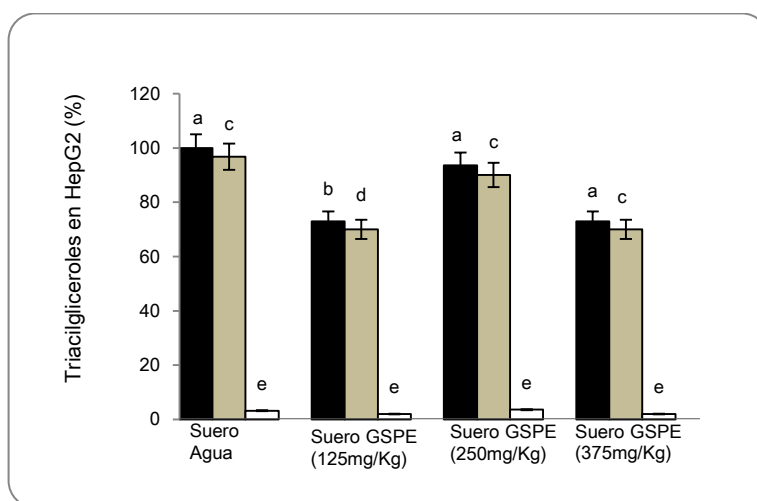


Figura 4: La gráfica indica la radioactividad incorporada en las células (■) y el medio de cultivo (□). La síntesis total representa la suma de la radioactividad presente en las células y en el medio de cultivo (■). Los resultados se expresan como los valores medios \pm del SEM del triplicado de tres experimentos diferentes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0,05$) determinado por ANOVA.

Discusión y conclusiones

El consumo regular de flavonoides en la dieta ha sido relacionado con una reducción de la mortalidad y morbilidad de las enfermedades cardiovasculares (CVD) [Crozier et al., 2000; Rasmussen et al., 2005]. Las PA, consideradas los flavonoides más abundantes de la dieta humana, son complejos polímeros de la clase flavan-3-oles [Bladé et al., 2010] y del mismo modo que sucede con otros flavonoides, sus efectos beneficiosos dependen tanto de la cantidad consumida como de su biodisponibilidad [Manach et al., 2004]. Diferentes estudios han determinado las concentraciones de flavanoles en plasma y orina posterior a la ingestión de diferentes alimentos como por ejemplo chocolate [Rein et al., 2000; Spencer et al., 2000; Baba et al., 2001], té verde y té negro [Yang et al., 1998; Warden et al., 2001; Wang et al., 2008.], vino tinto [Donovan et al., 1999; Bell et al., 2000] y extracto de semillas de uva [Tsang et al., 2005]. Se ha demostrado que las formas de menor peso molecular, especialmente los monómeros de flavan-3-oles y dímeros, son absorbidas a nivel del intestino delgado. Posteriormente, en las células epiteliales de la pared intestinal y en el tejido hepático los flavonoides son rápidamente conjugados, principalmente con ácido glucurónico [Hollman-Arts., 2000; Day et al., 2001]. Por lo tanto, los compuestos principales que aparecen en el plasma son sus metabolitos de fase II, principalmente formas glucuronidadas y en menor medida sulfatadas y metiladas [Shimoi et al., 1999; Moon et al., 2000; Day et al., 2001]. De esta forma, los compuestos bioactivos que llegan a los tejidos son sustancialmente diferentes de los inicialmente presentes en los alimentos [Kroon et al., 2004]. Los resultados incluidos en el Manuscrito 1 constatan este hecho, ya que la composición cuantitativa y cualitativa en PA difiere substancialmente entre el GSPE, y el suero de los animales a los que previamente se les había administrado una dosis de 1000mg/kg de este mismo extracto. Como consecuencia de estos cambios estructurales, muchos de los estudios realizados *in vitro* con formas no fisiológicas de los flavonoides, han sido cuestionados debido a que sus efectos beneficiosos estarían modulados por sus conjugados metabólicos [Kroon et al., 2004; Kay, 2010]. Tras la descripción de un sistema que permite el estudio de la funcionalidad de las formas

fisiológicas de las PA, y la comprobación de esta funcionalidad, reduciendo la síntesis *de novo* de lípidos, de las PA séricas con una dosis de 1000mg/kg de GSPE [Manuscrito 1], el objetivo de este segundo estudio fue conocer si las PA bioactivas, presentes en los sueros de animales sometidos a dosis menores de GSPE, eran también efectivas para disminuir la síntesis *de novo* de lípidos en células HepG2.

Los resultados obtenidos al realizar los análisis cromatográficos de los sueros mostraron que la presencia de las PA tanto en sus formas libres como conjugadas es dosis dependiente para todos los compuestos estudiados. Asimismo, en todas las dosis ensayadas en este estudio las formas glucuronidadas se encontraron presentes en el suero en una concentración muy superior a la de los metabolitos metilados y sulfatados. Estos resultados también son acordes con los presentados en el Manuscrito 1 y con los mostrados por otros autores [Serra et al., 2010]. En ambos casos, administrando a los animales dosis más elevadas de PA (1000mg/kg de GSPE) las formas predominantes en suero también seguían siendo las conjugadas, principalmente las glucuronidadas.

Las dosis de flavonoides ingeridas determinan el sitio primario de metabolismo; las dosis elevadas se metabolizan principalmente en el hígado, mientras que las dosis menores (ej. unos pocos mg) pueden ser metabolizadas por la mucosa intestinal [Scalbert-Williamson, 2000]. Las PA presentes en las dosis de GSPE usadas en este estudio no alcanzan concentraciones tan elevadas para saturar su metabolismo, como indicaría el hecho de que las especies circulantes están mayoritariamente en su forma conjugada. Así por ejemplo, se ha descrito que después de la administración de dosis muy elevadas de catequina (2g), aparece en el plasma la catequina en forma de aglicona después de sólo 30 minutos. Sin embargo, tras el consumo de pocos mg de catequina, se detecta catequina en plasma solamente en forma de conjugado [Bell et al., 2000]. En este estudio, y pese a que los monómeros libres son mayoritarios en el GSPE [Manuscrito 3], para todas las dosis ensayadas las formas libres de las PA en suero fueron detectadas en cantidades muy reducidas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos tras la administración de una dosis mayor de 1000mg/kg de GSPE [Manuscrito 1], se observa que la concentración de metabolitos conjugados cuantificados en suero no aumenta proporcionalmente con esta dosis con respecto a los cuantificados tras la administración de 375mg/kg de GSPE. Este hecho podría ser indicativo de que a esta dosis más alta de 1000mg/kg podría empezar a tener lugar una saturación del metabolismo de la PA, aunque también en este caso las formas predominantes en suero sigan siendo las conjugadas.

En cuanto a los resultados correspondientes al estudio de las diferentes dosis de GSPE sobre las células HepG2, se observa que en general se produce un efecto reductor de la síntesis *de novo* de lípidos. Sin embargo, los resultados no muestran mayor efecto reductor a dosis más altas de GSPE, incluso para los TG se observa como el mayor efecto se produce con la dosis más baja de 125mg/kg, indicando que dosis relativamente moderadas de 125mg/kg son efectivas.

Diversos estudios han mostrado los efectos beneficiosos de los flavonoides con respecto a la reducción de los niveles de TG tanto *in vitro* [Pal et al., 2003] como *in vivo* [Vinson et al., 2001; Auger et al., 2002]. Asimismo, no es la primera vez que se demuestra que el GSPE presenta efecto reductor en la síntesis de lípidos, especialmente de TG. De hecho, estudios *in vivo* realizados por nuestro grupo han mostrado una reducción en los niveles postprandiales de TG como resultado de la administración de 25mg/Kg de GSPE a ratas normolipémicas [Del Bas et al., 2008], ratones [Del Bas et al., 2009] y ratas que recibieron una dieta alta en grasa [Quesada et al., 2009]. También, en un estudio realizado *in vitro* con células HepG2 tratadas con una dosis de 50mg/L de GSPE, se observó una disminución en la síntesis *de novo* de los TG [Del Bas et al., 2008], y en el Manuscrito 1 de esta tesis, se muestra una disminución de la síntesis *de novo* para los TG, EC y FC en este mismo modelo celular, con una dosis de 25mg/L de GSPE. Sin embargo, sí es la primera vez, en el Manuscrito 1 y en el presente estudio, en el que se realizan los ensayos cultivando las células con las PA disponibles en el suero

semipurificado, lo cual permite representar de manera más fisiológica los procesos metabólicos y los efectos mediados por las PA.

Teniendo en cuenta la alta concentración de formas conjugadas presentes en el suero posiblemente sean estos metabolitos, y de forma más específica los conjugados con ácido glucurónico, los que están implicadas en el efecto reductor de la síntesis *de novo* de los lípidos en las células hepáticas. No obstante, puede que no sean directamente estas formas conjugadas las que actúen a nivel celular.

Estudios previos indican que no existe una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de los flavonoides y sus concentraciones en los tejidos diana, variando además la distribución entre sangre y tejidos dependiendo del flavonoide del que se trate [Hong et al., 2002; Maubach et al., 2003]. Asimismo, otros estudios sugieren que los metabolitos conjugados podrían ser deconjugados *in situ* en los tejidos mediante la enzima β -glucuronidasa, y que serían las formas agliconas las que se acumularían en los mismos [Bieger et al., 2008; Menendez et al., 2011]. De hecho, se ha propuesto que la actividad de los metabolitos de algunos flavonoides pudiera depender de su deconjugación *in situ* [Terao et al., 2011], actuando las formas conjugadas como vehículos del flavonoide que liberarían *in situ* el compuesto libre mediante deconjugación [Menendez et al., 2011; Galindo et al., 2012]. Así por ejemplo, se ha sugerido que uno de los posibles mecanismos involucrados en los efectos de los flavonoides *in vivo* podría ser la deconjugación de sus metabolitos glucuronidados por un aumento de la actividad β -glucuronidasa en el lugar de la inflamación [O'Leary et al., 2001; Shimoi et al., 2001].

También en cultivos *in vitro*, con células HepG2, O'Leary et al. demostraron que los flavonoides glucuronidados son deconjugados después de ser introducidos intactos dentro de las células mediante un transportador no identificado [O'Leary et al., 2003]. De hecho, las β -glucuronidasas se han encontrado en la fracción microsomal de varios tejidos, particularmente en el intestino y el hígado [Paigen, 1989; O'Leary et al., 2003].

El proceso posterior de deconjugación de los metabolitos glucuronidados en las formas bioactivas en el interior de las células HepG2, podría explicar que no encontremos una relación directa entre la concentración sérica de estos compuestos conjugados y su funcionalidad biológica, en este caso su efecto reductor de la síntesis *de novo* de lípidos. Por lo tanto, estos resultados apoyarían las propuestas recientemente publicadas de que no son las formas conjugadas que circulan en sangre las formas responsables del efecto final a nivel intracelular [Terao et al., 2011; Menendez et al., 2011; Galindo et al., 2012].

También, la presencia de otros compuestos que muestran una gran actividad sobre la síntesis lipídica y que no fueron identificados en los sueros estudiados, bien porque no han podido ser extraídos o bien porque su concentración sea muy baja, podría explicar esta falta de relación entre la concentración de metabolitos en suero y el efecto reductor de la síntesis de lípidos en HepG2. En este sentido, resultados previos del grupo muestran que la combinación de un trímero y un dímero galato es la óptima para conseguir modificar la homeostasis lipídica en el sentido buscado [Montagut et al., 2009].

En conclusión, en este estudio demostramos que las PA disponibles en el suero de rata 2 horas después de la administración de dosis bajas de GSPE, principalmente las formas glucuronidadas, presentan efecto reductor no dosis dependiente de la síntesis *de novo* de los lípidos, especialmente de los TG y mostramos también que dosis relativamente moderadas, de 125 mg/kg son efectivas.

Bibliografía

Auger, C.; Caporiccio, B.; Laundrault, N.; Teissedre, P. et al., Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J. Nutr.* **2002**. 132, 1207-1213.

Baba, S.; Osakabe, N., Natsume, M.; et al., Absorption and urinary excretion of (2)-epicatechin after administration of different levels of cocoa powder or (2)-epicatechin in rats. *J Agric Food Chem.* **2001**. 49, 6050–6056.

Bell, JR.; Donovan, JL.; Wong, R.; et al., (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr.* **2000**. 71, 103–108.

Bieger, J.; Cermak, R.; Blank, R.; de Boer, VC.; Hollman, PC.; Kamphues, J.; et al., Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr.* **2008**. 138, 1417-1420.

Bladé, C.; Arola, L.; Salvadó, M. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**. 54, 37–59.

Crozier, A.; Burns, J.; Aziz, A.; Stewart, A.; et al., Antioxidant flavonoles from fruit, vegetables and beverages: measurement and bioavailability. *Biol. Res.* **2000**. 33, 79 -89.

Day, A.; Mellon, FA.; Barron, D. et al., Human metabolism of flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res.* **2001**. 35, 941–952.

Del Bas, J.M.; Fernandez-Larrea, J.; Blay, M.; Ardevol, A.; et al., Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J.* **2005**. 19, 479-81.

Del Bas, J.M; Ricketts, M.; Baiges, I.; Quesada, H., Ardevol, A., Salvadó, M. et al., Dietary procyanidins lower triglycerides levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Molecular Nutrition and Food Research.* **2008**. 52, 1172-1181.

Del Bas, J.M; Ricketts, M.; Vaqué, M.; Sala, E. et al., Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**. 53, 805–814.

Donovan, JL.; Luthria, DL.; Stremple, P.; et al. Analysis of (+)-catechin, (2)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylatedanalogs. A comparison of sensitive methods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **1999**. 726, 277–283.

Galindo, P.; Rodríguez-Gómez, I.; Gonzáles-Manzano, S.; Dueñas, Montserrat.; Jiménez, R.; Menéndez, C.; Vargas, F.; Tamargo, J.; Santos-Buelga, C.; Pérez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *Plos One*. **2012**. 7(3), e32673. doi: 10.1371.

Hollman, PCH. and Arts, ICW.: Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric*. **2000**. 80: 1081–1093.

Hong, SJ.; Kim, SI.; Kwonm, SM.; Lee, JR.; Chung, BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J*. **2002**. 43(2), 236-241.

Kay. CD. The future of flavonoids research. *British Journal of Nutrition*. **2010**. 104, 91.

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

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. **2004**. 79, 727–747.

Maubach, J.; Bracke, ME.; Heyerick, A.; Depypere, HT.; Serreyn, RF.; Mareel, MM.; De Keukeleire, D. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **2003**. 784(1),137-144.

Menendez, C.; Dueñas, M.; Galindo, P.; González-Manzano, S.; Jimenez, R.; Moreno, L., Zarzuelo, MJ.; Rodríguez-Gómez, I.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C.; Perez-Vizcaino, F. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?. *Mol Nutr Food Res*. **2011**. 55(12), 1780-90.doi: 10.1002/mnfr.201100378.

Montagut, G.; Baiges, I.; Valls, J.; Terra, X.; Del Bas, J.; Vitrac, X.; Richard, T.; Mérillon, J.; Arola, L.; Blay, M.; Bladé, M.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Ardévol, A. A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food chemistry*. **2009**. 116, 265-270.

Moon, J.H.; Nakata, R.; Oshima, S.; Inakuma, T. and Terao. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *J. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. **2000**. 279, R461-R467.

O'Leary, K.; Day, A.J.; Needs, P.W.; Sly, W.S.; O'Brien, N.M. et al. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* **2001.** 503,103–106.

O'Leary, K.A.; Day, A.J.; Needs, P.W.; Mellon, F.A.; O'Brien, N.M. and Williamson, G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human [beta]-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O- methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **2003.** 65: 479–49.

Paigen, K.: Mammalian beta-glucuronidase: genetics, molecular biology, and cell biology. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1989.** 37: 155–205.

Pal, S.; Ho, N., Santos, C.; Dubois, P. et al., Red wine polyphenolic increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.* **2003.** 133, 700-706.

Pajuelo, D.; Quesada, H.; Díaz, S.; Fernández-Iglesias, A.; Arola-Arnal, A.; Bladé, C.; Salvadó, J.; Arola, L. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of BAT caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br. J. Nutr.* **2012.** 102, 170-178.

Quesada, H.; Del Bas, J.M.; Pajuelo, D.; Diaz, S., et al., Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes.* **2009.** 33, 1007-1012.

Rasmussen, S.E.; Frederiksen, H.; Struntze Krogholm, K.; Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res.* **2005.** 49, 159-174.

Rein, D.; Lotito, S and Holt, R.R. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* **2000.** 130, Suppl. 8, 2109S–2114S.

Scalbert, A. and Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* **2000.** 130, Suppl. 8, 2073S–2085S.

Serra, A.; Maci, A.; Romero, M.P.; Valls, J.; Blad, C, et al. Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in vitro and in vivo model. *British Journal of nutrition.* **2010.**103.

Shimoi, K.; Okada, H.; Furugori, M.; Goda, T.; Takase, S.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Yamamoto, H. and Kinae, N. *FEBS Lett.* **1998.** 438, 220-224.

Spencer, J.P.E.; Chaudry, F.; Pannala, A.S.; et al., Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun.* **2000.** 272, 236–241.

Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* **2011.** 2(1), 11-7. doi: 10.1039/c0fo00106f.

Tsang, C.; Auger, C., Mullen, W., et al. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br J Nutr.* **2005.** 94, 170–181.

Vinson, JA.; Teufel, K.; Wu, N. red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis.* **2001.** 156, 67-72.

Wang, J.; Luo, H.; Wang, P., et al. Validation of green tea polyphenol biomarkers in a phase II human intervention trial. *Food Chem Toxicol.* **2008.** 46, 232–240.

Warden, BA.; Smith, LS.; Beecher, GR.; et al. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr.* **2001.** 131, 1731–1737.

Yang, CS., Chen, L.; Lee, M., et al. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1998.** 7, 351–354.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

MANUSCRITO 2

Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by
Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies

Guerrero L., Castillo J., Quiñones M., Garcia-Vallvé S.,
Arola L., Pujadas G., Muguersa B.

Publicado en PLoS ONE 7(11): e49493.

doi:10.1371/journal.pone.0049493

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies

Ligia Guerrero^{1,2}, Julián Castillo³, Mar Quiñones¹, Santiago García-Vallvé^{1,4}, Lluís Arola^{1,4}, Gerard Pujadas^{1,4}, Begoña Muguera^{1,4*}

1 Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University, Tarragona, Spain, **2** Department of Research, Nutrition and Innovation, ALPINA S.A, Bogotá, Colombia, **3** Department of Research and Development, Nutrafur S.A., Murcia, Spain, **4** Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Avinguda Universitat, Reus, Catalonia, Spain

Abstract

Previous studies have demonstrated that certain flavonoids can have an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme (ACE) activity, which plays a key role in the regulation of arterial blood pressure. In the present study, 17 flavonoids belonging to five structural subtypes were evaluated *in vitro* for their ability to inhibit ACE in order to establish the structural basis of their bioactivity. The ACE inhibitory (ACEI) activity of these 17 flavonoids was determined by fluorimetric method at two concentrations (500 μ M and 100 μ M). Their inhibitory potencies ranged from 17 to 95% at 500 μ M and from 0 to 57% at 100 μ M. In both cases, the highest ACEI activity was obtained for luteolin. Following the determination of ACEI activity, the flavonoids with higher ACEI activity (*i.e.*, ACEI >60% at 500 μ M) were selected for further IC₅₀ determination. The IC₅₀ values for luteolin, quercetin, rutin, kaempferol, rhoifolin and apigenin K were 23, 43, 64, 178, 183 and 196 μ M, respectively. Our results suggest that flavonoids are an excellent source of functional antihypertensive products. Furthermore, our structure-activity relationship studies show that the combination of sub-structures on the flavonoid skeleton that increase ACEI activity is made up of the following elements: (a) the catechol group in the B-ring, (b) the double bond between C2 and C3 at the C-ring, and (c) the cetone group in C4 at the C-ring. Protein-ligand docking studies are used to understand the molecular basis for these results.

Citation: Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, García-Vallvé S, Arola L, et al. (2012) Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. PLoS ONE 7(11): e49493. doi:10.1371/journal.pone.0049493

Editor: Jian R. Lu, The University of Manchester, United Kingdom

Received: July 19, 2012; **Accepted:** October 9, 2012; **Published:** November 21, 2012

Copyright: © 2012 Guerrero et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (AGL 2008-00387/ALI) and from the Universitat Rovira i Virgili - Banco Santander (2011 LINE-12). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: begona.muguera@urv.cat

Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the most important cause of death among the industrialized societies [1]. Hypertension, which is estimated to affect one-third of the Western population, is one of the major risk factors for CVD [2]. In spite of its significance, hypertension remains poorly controlled [3], and approximately two-thirds of hypertension is undetected or inadequately treated [4]. Lifestyle modifications, including changes in dietary habits, have substantial effects on risk factors for CVD, such as hypertension [5].

The renin-angiotensin-aldosterone system is a key factor in the maintenance of arterial blood pressure. One of its main components is the angiotensin-converting enzyme (ACE) [EC 3.4.15.1] [6], which is a glycosylated zinc dipeptidyl-carboxypeptidase whose main function is to regulate arterial blood pressure and electrolyte balance through the renin-angiotensin-aldosterone system [7]. There are two isoforms of ACE that are transcribed from the same gene in a tissue-specific manner. In somatic tissues, ACE exists as a glycoprotein composed of a single large polypeptide chain of 1,277 amino acids, whereas in sperm cells, it occurs as a lower-molecular-mass glycoform of 701 amino acids. The somatic form consists of two homologous domains (the N and C domains), each of which contains an active site with a

conserved HEXXH zinc-binding motif [8], where the Zn²⁺ is bound to the two motif histidines as well as to a glutamate 24 residue downstream the last motif histidine [9]. The testis ACE (tACE) is identical to the C-terminal half of somatic ACE, with the exception of a unique 36-residue sequence that constitutes its amino terminus [10]. The two domains differ in their substrate specificities, inhibitor and chloride activation profiles, and physiological functions [11]. Thus, mice expressing only the N domain of ACE show a low blood pressure phenotype that is very similar to ACE knockout mice [12], and ACE inhibition with an N-domain-specific inhibitor (*i.e.*, RXP407) has no effect on blood pressure regulation [13]. On the other hand, mice that are homozygous for a mutation that inactivates the somatic ACE N domain, but not the C domain, retained a phenotype that was indistinguishable from that of wild-type mice with regards to blood pressure and renal function [14]. Therefore, the inhibition of the C domain appears to be necessary and sufficient for the control of blood pressure and cardiovascular function, which suggests that the C domain is the dominant angiotensin-converting site. As an exopeptidase, ACE catalyzes the conversion of angiotensin I into the potent vasoconstrictor angiotensin II [15]. In addition, ACE catalyzes the inactivation of the vasodilator bradykinin [16]. Therefore, the inhibition of this enzyme can generate an

antihypertensive effect. In fact, synthetic ACE inhibitors, such as captopril and enalapril, are widely used for the treatment of cardiovascular and renal disease, for the secondary prevention of coronary artery disease, and for the treatment of heart failure [17]. However, side effects such as cough, angioneurotic edema and deleterious effects in pregnancy have been associated with the clinical use of ACE inhibitors [18,19]. Therefore, the investigation of new, natural product-based ACE inhibitors could greatly benefit hypertensive patients.

A number of extracts and compounds obtained from plants have been identified as *in vitro* ACE inhibitors [20,21]. These beneficial effects have largely been ascribed to the presence of flavonoid molecules, which generation of chelate complexes within the active center of ACE [22]. Flavonoids are polyphenol molecules of low molecular weight; the basic structure is a 2-phenyl benzopyrone in which the three-carbon bridge between the phenyl groups is usually cyclized oxygen [23,24]. Flavonoids can be differentiated into several subfamilies according to their degree of unsaturation and the degree of oxidation of the oxygenated heterocycle and can be characterized as flavanones, flavones, flavonols, isoflavones, flavanols (essentially, flavan-3-ols) and anthocyanidins, all of which are the most relevant for the human diet [23,25]. Different studies have revealed the important role that flavonoid structure plays in its biological function; the position and number of substituents in the flavonoid basic structure significantly affects the antiproliferative, cytotoxic, antioxidant, and anti-enzymatic activities of such molecules [26–28].

Previous studies have shown that certain flavonoids exhibit a capacity to inhibit different zinc metalloproteinases [29,30], including ACE. In fact, micromolar concentrations of different flavonoids, such as anthocyanins [31,32], flavones [33], flavonols [33–35], and flavanols [36], have been shown to inhibit 50% of ACE activity. Furthermore, the ACE-inhibitory (ACEI) activity of different foods and plant extracts rich in flavonoids has also been

demonstrated by *in vitro* [37,38], studies and by *in vivo* studies in hypertensive rats [39,40] and humans [41]. The preliminary structure-activity relationships (SAR) studied in some flavonoids (flavanols and flavonols) generally attribute the observed effect either to the distribution of free hydroxyl groups [33,35,42] or in the number of monomers units forming the corresponding procyanidins [36]. However, the key molecular flavonoid substructures that dictate effective ACE inhibition activity have not yet been characterized.

The objective of this work was to define the key flavonoid structural elements that are required for ACE inhibition activity through the determination of the ability of 17 flavonoids belonging to five structural subtypes (*i.e.*, 5 flavanones, 2 flavan-3-ols, 1 isoflavone, 6 flavones and 3 flavonols; including potassium salts for 1 flavanone and for 1 flavone) to inhibit ACE. To achieve this goal, the *in vitro* ACE inhibition activity of these 17 flavonoids was measured, and the corresponding results were used to establish SAR for these molecules. Afterwards, protein-ligand docking studies were used to describe the molecular basis for most significant SAR results.

Materials and Methods

Chemicals

o-aminobenzoylglycyl-*p*-nitro-phenylalanylproline (*o*-ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro) was purchased from Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Switzerland). Five units of Angiotensin-I Converting Enzyme from rabbit lung and ZnCl₂ were obtained from Sigma (Barcelona, Spain). All flavonoids (assay >90% purity) used in this study were kindly provided by Nutrafur S.A. (Murcia, Spain), except for the catechin, luteolin and genistein, which came from Sigma-Aldrich Química (Barcelona, Spain). Flavonoids were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and prepared daily. In

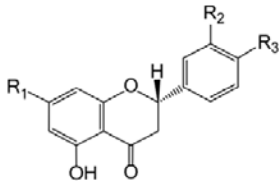
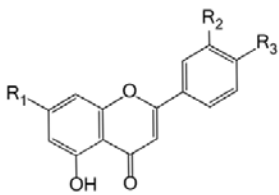
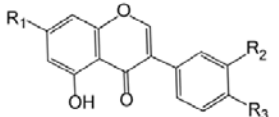
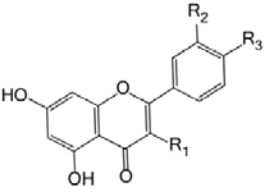
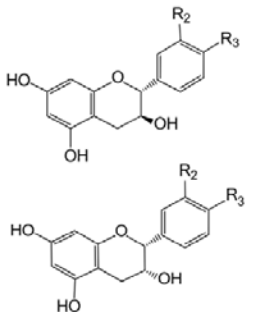
Table 1. HPLC analysis of the flavonoid samples used in the current study.

Compound	content (%) ¹	Main content of the minor flavonoids	
		(%) ²	Other minor flavonoids
Naringenin	94.7	Naringin (0.6)	Naringenin-7-glucoside
Naringenin K	93.8	Naringin (0.9)	Naringenin-7-glucoside
Naringin	95.2	Narirutin (1.1)	Poncirin, Naringenin
Apigenin	97.2	Rhoifolin (0.7)	Apigenin-7-glucoside
Apigenin K	96.5	Rhoifolin (0.8)	Apigenin-7-glucoside
Rhoifolin	96.1	Naringin (0.4)	Apigenin
Genistein	97.2	Daidzein (1.1)	Genistin
Luteolin	95.9	Eriodictyol (0.8)	Luteolin-7-glucoside
Hesperetin	94.7	Hesperidin (1.2)	Hesperetin-7-glucoside
Diosmetin	93.8	Diosmin (2)	Hesperidin
Diosmin	95.2	Hesperidin (1.8)	Hesperetin
Catechin	98.1		Other catechins
Epicatechin	98.5		Other catechins
Quercetin	95.7	Rutin (1.5)	Isoquercitrin
Rutin	97.1	Isoquercitrin (1.1)	Quercetin
Kaempferol	96.8	Quercetin (0.8)	Kaempferol-3-glucoside

¹Absolute value as is.

²The reference % assay is referred to the absolute content as is of the main flavonoid.

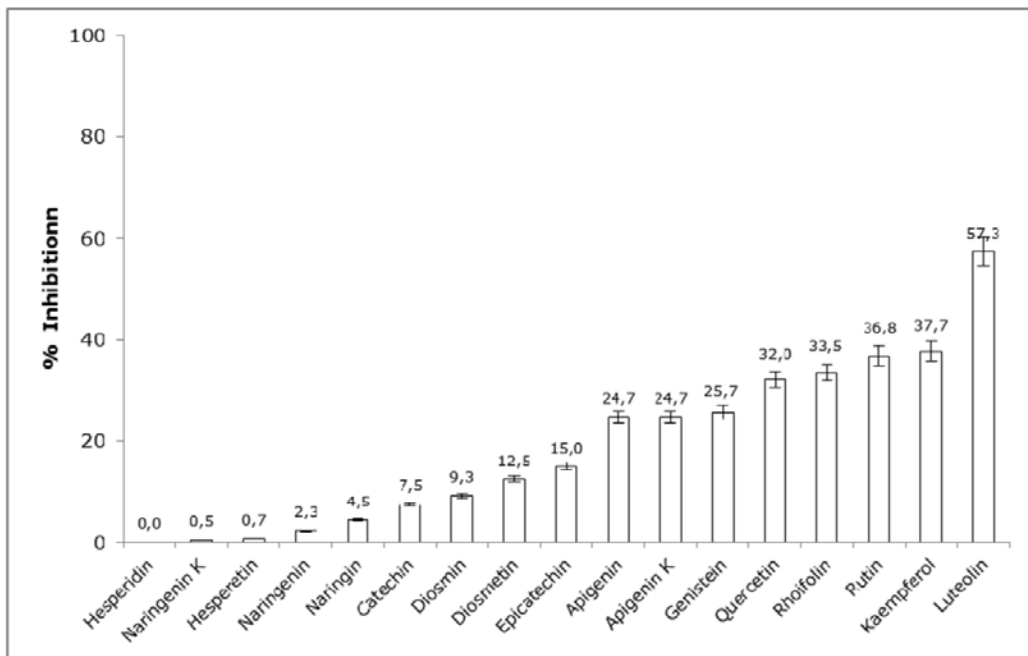
doi:10.1371/journal.pone.0049493.t001

Flavonone	R1	R2	R3	Structure
	OH	H	OH	Naringenin
	<i>O</i> -Nh [±]	H	OH	Naringin
	OH	OH	OMe ^o	Hesperetin
	Rut ^v	OH	OMe ^o	Hesperidin
	OH	OH	OMe ^o	Diosmetin
	Rut ^v	OH	OMe ^o	Diosmin
	OH	H	OH	Apigenin
	<i>O</i> -Nh [±]	H	OH	Rhoifolin
	OH	OH	OH	Luteolin
	OH	H	OH	Genistein
	OH	H	OH	Kaempferol
	OH	OH	OH	Quercetin
	RGlu ^a	OH	OH	Rutin
		OH	OH	Catechin
		OH	OH	Epicatechin

RGlu^a: Rhamnoglucose OMe^o: Methyl ether *O*-Nh[±]: *O*-neohesperoside Rut^v: Rutinose

Figure 1. Structures of the different flavonoids used in this study.
 doi:10.1371/journal.pone.0049493.g001

(A)



(B)

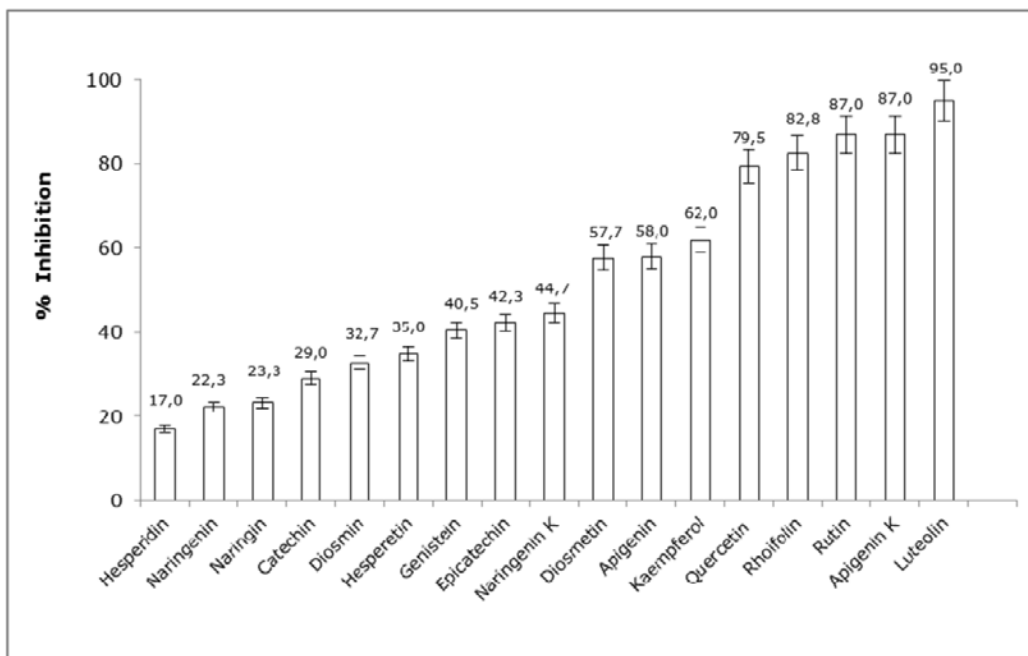


Figure 2. (A) Effect of different flavonoids on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity. Purified lung ACE was preincubated at 37°C for 30 min in the presence of 100 μM of flavonoids or DMSO as a control. The results are expressed as the percentage of ACE inhibition. The plot represents the mean result ± SD from three experiments. **(B) Effect of different flavonoids on Angiotensin Converting Enzyme (ACE) activity.** Purified lung ACE was preincubated at 37°C for 30 min in the presence of 500 μM of flavonoids or DMSO as a control. The results are expressed as the percentage of ACE inhibition. The plot represents the mean ± SD from three experiments.
 doi:10.1371/journal.pone.0049493.g002

all experiments, the final concentration of DMSO was 0.4%. Distilled water was obtained from a Millipore Milli-Q® system.

Preparation of Solutions

The 0.45 mM buffered substrate solution (*o*-Abz-Gly-p-Phe(NO₂)-Pro) and 150 mM Tris-acid buffer solution containing 1.125 M NaCl (pH 8.3) were prepared daily. Flavonoid solutions (100 and 500 μM) were prepared in DMSO (0.4%) daily. The 0.1 U/mL ACE solution stock was prepared in glycerol: water (1:1), aliquoted and stored at -20°C. The 0.1 μM ZnCl₂ stock solution was prepared and stored at 4°C. The ACE working solution was prepared daily by diluting it in 150 mM Tris buffer (pH 8.3) containing 0.1 μM ZnCl₂.

Chromatographic Analysis and Quantification of Flavonoid Compounds

For the elucidation and quantification of the main flavonoids present in each sample, we modified a previously published method [27]. All the samples were dissolved in DMSO in the ratio of 5 mg/mL, and the resulting solutions were filtered through a 0.45 μm nylon membrane. The HPLC equipment was a Hewlett-Packard Series HP 1100 equipped with a diode array detector. The stationary phase was a C18 LiChrospher 100 analytical column (250 × 4 mm i.d.) with a particle size of 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany) thermostated at 30°C. The flow rate was 1 mL/min and the absorbance changes were simultaneously monitored at 280 and 340 nm. The mobile phases for chromatographic analysis were: (A) acetic acid: water (2.5:97.5) and (B) acetonitrile. A linear gradient was run from 95% (A) and 5% (B) to 75% (A) and 25% (B) for 20 min; changed to 50% (A) and (B) for 20 min (40 min, total time); changed to 20% (A) and 80% (B) for 10 min (50 min, total time), and finally re-equilibrated for 10 min (60 min, total time) to the initial composition. Table 1 resumes the global HPLC profile of the different samples used in this study.

Measurement of ACE-inhibitory Activity

ACEI activity was measured by a fluorimetric assay following the method of Sentandreu and Toldrà [43] with some modifications [44]. A volume of 160 μL of 0.45 mM buffered substrate solution in 150 mM Tris-acid buffer containing 1.125 M NaCl, (pH 8.3) was mixed with 40 μL of the flavonoid solution (with

0.4% DMSO for the blank samples) and 40 μL of ACE solution (0.1 U/mL), and the mixture was incubated at 37°C. Fluorescence was measured after 30 min in 96-well microplates (Thermo Scientific, Rochester, NY) using a multiscan microplate fluorimeter (Biotek, FL×800). Microplates (Thermo Scientific, Rochester, NY) were used in this assay. The excitation and emission wavelengths were 360 and 430 nm, respectively. The activity of each sample was tested in technical and biological triplicate.

The ACEI activity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ Inhibitory activity} = 100 \times (A - C) / (A - B),$$

where A is the fluorescence without the flavonoid solution, B is the fluorescence without ACE and C is the fluorescence in the presence of both ACE and the flavonoid solution. A flavonoid solution of 500 μM was selected on the basis of previous studies [33,35], and the concentration of 100 μM was chosen because it is within the physiological concentration range. An ACEI activity higher than 60% at 500 μM concentration was used as a selection criterion for the IC₅₀ (the flavonoid concentration required to inhibit the original ACE activity by 50%). The IC₅₀ of each selected flavonoid was tested in technical and biological triplicate. The results from three experiments are expressed as the mean ± SD and were performed in different platelet samples.

Molecular Modeling Studies

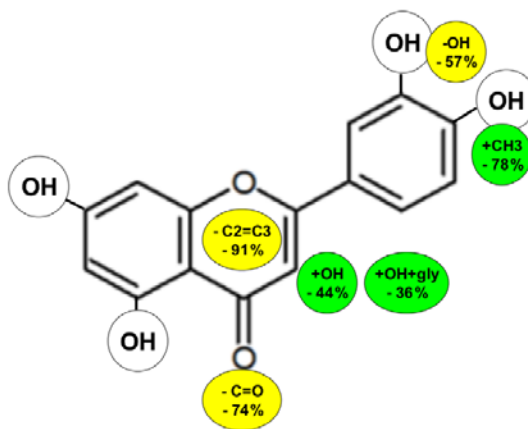


Figure 3. Structural diagram which quantitatively assesses the effect of the addition or elimination of different structural elements from the flavonoid core on the ACEI activity of luteolin at 100 μM. According to these data, the significance order was: double bond C2=C3 (absence: -91% activity by comparing naringenin vs. apigenin) >4'-O-methoxylation (presence: -78% by comparing diosmetin vs. luteolin) ≈ 4-carbonyl group (absence: -74% by comparing epicatechin vs. luteolin) >3'-hydroxylation (absence: -57% by comparing apigenin vs. luteolin) >3-hydroxylation (presence: -44% by comparing quercetin vs. luteolin) >3-O-glycosylation (presence: -36% by comparing rutin vs. luteolin).
 doi:10.1371/journal.pone.0049493.g003

Table 2. IC₅₀ values obtained for the selected flavonoids.

	IC ₅₀ value ¹ (μM)
Apigenin K	196
Rhoifolin (apigenin 7-O-glycoside)	183
Kaempferol	178
Rutin (quercetin 3-O-glycoside)	64
Quercetin	43
Luteolin	23

¹The IC₅₀ value represents the concentration of each compound that inhibits ACE activity by 50%.

doi:10.1371/journal.pone.0049493.t002

Table 3. Intermolecular interactions between ACE inhibitors and the tACE binding site.

		LISI- NOPRIL	ENAL- APRILAT	CAPTO- PRIL	RXP- A380	SELENO- CAPTOPRIL	KAF	KAW	lisW-S	FII-A	LUTE- OLIN	QUER- CETIN	RUTIN	KAEMP- FEROL	
S2'	Gln281	✓	✓	NE2	NE2	NE2	NE2	✓	H	H					
	Thr282										✓	✓	✓	✓	
	His353	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	✓	✓	✓	✓	
	Glu376									✓			✓		
	Asp453													✓	
	Lys511	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ					
	His513	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2	NE2					
	Tyr520	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH					
	S2'/S1'	Ser284													
		Val379										✓	✓	✓	✓
Val380		✓							✓	✓	✓	✓	✓	✓	
S1'	Glu162	✓											OE2		
	Asn277												✓		
	Asn374														
	Asp377													OD1	
S1	Glu143														
	Val351														
	Ala354	O	O	✓	✓	✓	✓	✓	O	✓	✓	✓	O	O	
	Ser355		✓		✓		✓	✓		✓	✓	✓	✓		
	Trp357														
	Lys368														
	Glu384	OE2	OE2	OE2	OE2	✓	OE2	OE2	OE2	OE2	✓	✓	✓		
	Phe512	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓					
	Ser516														
	Tyr523	OH	OH	✓	OH	✓	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	✓	
S1/S2	Val518	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓					
S2	Phe391				✓		✓	✓		✓					
	Glu403														
	Arg522														
Other	Thr166												✓		
	Trp279												✓		
	Ala356				N		N	N		N					
	His383	✓	✓	✓	NE2	✓	NE2	NE2	NE2	NE2				✓	
	His387	NE2	✓	✓	NE2		✓	✓	NE2	NE2					
	His410				✓		✓			✓					
	Glu411	✓	✓		✓		OE1	✓	✓				OE1		
	Asp415				✓			✓	OD2		✓	OD1	✓	✓	
	Lys454												NZ	NZ	
	Phe457	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓					
	Phe527								✓	✓			✓		

Data used for lisinopril, enalaprilat, captopril, RXPA380, selenocaptopril, KAF, KAW, lisW-S and FII-A was obtained from the LigPlot+ diagrams that are available at the PDBSum resource (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) for PDB files 1O86, 1UZE, 1UZF, 2OC2, 2YDM, 3BKK, 3BKL, 3L3N and 2XY9, respectively. Data for luteolin, quercetin, rutin and kaempferol was obtained by applying LigPlot+ to the structure of their predicted complexes with tACE. Hydrophobic contacts are indicated by a check mark whereas hydrogen bonds are indicated with the label of the protein atom that is involved.
 doi:10.1371/journal.pone.0049493.t003

Flavonoid structures were either obtained from ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) or drawn with Marvin Sketch v5.9.0 (ChemAxon Kft., Budapest, Hungary; <http://www.chemaxon.com/>). All flavonoid structures were further set up

with LigPrep v2.5 (Schrödinger LLC, Portland, USA; <http://www.schrodinger.com>) following three steps: (1) using Epik software [45] to generate all possible protonation states within a pH range of 4.0 ± 7.0 and selecting the "add metal binding states"

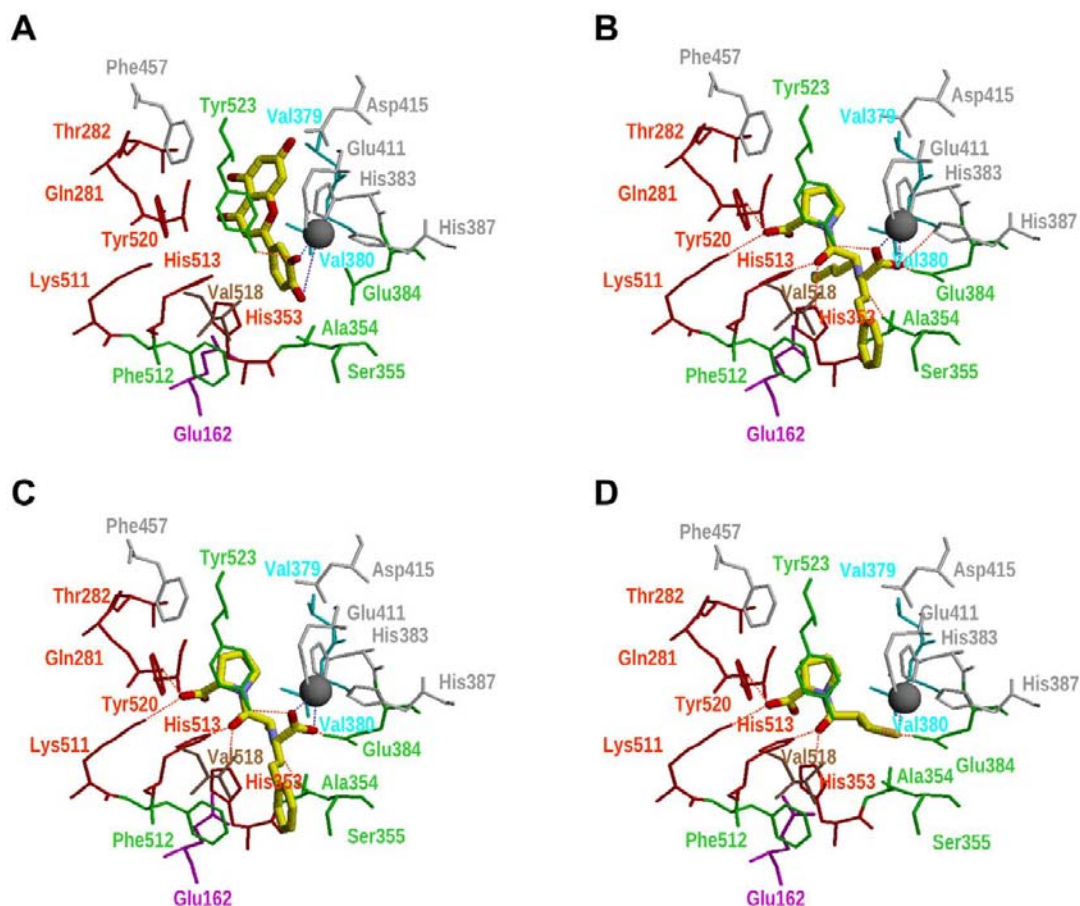


Figure 4. Best predicted pose for luteolin (panel A) at the tACE binding site and the relative location to experimental poses for the ACE inhibitors lisinopril (panel B), enalaprilat (panel C), and captopril (panel D). All of the panels in this figure are in the same relative orientation to allow for easier comparisons between the poses. Residues at the ACE binding site are colored according to the subsite where they belong (*i.e.*, residues from the S2', S2'/S1', S1', S1 and S1/S2 subsites are colored in red, cyan, magenta, green, brown, white and yellow, respectively). Other important residues that have not been classified in any pocket are colored in white. Carbon atoms for the ligands are shown in yellow to make them more easily distinguishable from the binding site residues. Dashed lines are used to show intermolecular hydrogen bonds (in red) or charge interactions (in blue).
doi:10.1371/journal.pone.0049493.g004

option to generate possible ligand-metal binding states among metalloproteins; (2) generating tautomers at the previously given pH range; and (3) determining chiralities from the ligand's 3D structure.

All the protein-ligand docking studies performed in this work were performed with Glide v5.7 (Schrodinger LLC., Portland, USA; <http://www.schrodinger.com>) [46,47] with extra precision (*i.e.*, with GlideXP; [48]). Before docking the flavonoids, the shape and properties of the ACE binding site were represented by several different sets of fields on a grid. This grid was made of a box that has default dimensions around the location of the experimental pose of the inhibitor (*i.e.*, RXP380), and the inhibitor forms a complex with tACE at PDB file 2OC2 [49]. No constraints were set while building the grid. Default settings for the rest of the grid set-up options were used. During the protein-ligand docking, a maximum number of 5 poses per ligand were obtained. Then, the

most reliable pose was selected (irrespective of its glide score) by taking advantage of the information provided by (1) the other experimental complexes between ACE and ACE inhibitors available in the PDB (Protein Data Bank) (<http://www.pdb.org>) and (2) the SAR results obtained in the current study for flavonoids. No constraints were imposed during the docking except for those flavonoids in which all docked poses were far from the area predicted for either luteolin or quercetin. In those cases, the AC ring location of their selected poses was used to restrict their docking (*i.e.*, luteolin was used during apigenin and diosmetin docking, whereas quercetin was used to restrict the docking of rutin and kaempferol). Restricted docking with rhoifolin failed as a consequence of the steric hindrance between the ACE binding site and the 7-O-glycoside substituent; therefore, no docking results are reported for rhoifolin. The results for predicted poses were compared with known experimental poses for ACE inhibitors by

comparing their intermolecular interactions with the ACE binding site. With that aim, LigPlot diagrams for the experimental ACE-inhibitor complexes were obtained from the PDBsum website (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) and compared with equivalent diagrams derived from LigPlot+ [50] for predicted ACE-flavonoid complexes.

Results and Discussion

Seventeen flavonoids were evaluated for their ACEI activity. The structures of all compounds studied are represented in Figure 1. All the flavonoids were studied at concentrations of 100 and 500 μM (see Figures 2A and 2B, respectively). The maximum inhibitory potencies were 57% at 100 μM and 95% at 500 μM . At both concentrations, the highest ACEI activity was exhibited by luteolin. The relative inhibitory potencies for the most active flavonoids (*i.e.*, ACEI higher than 30%) were luteolin>apigenin K>rutin>rhoifolin>quercetin>kaempferol>apigenin>diosmetin>naringenin K>epicatechin>genistein>hesperetin and diosmin for 500 μM ; and luteolin>kaempferol>rutin>rhoifolin>quercetin for 100 μM . The rest of the flavonoids exhibited ACEI activities lower than 30%. The IC_{50} value was obtained for each flavonoid that exhibited an ACEI activity higher than 60% at 500 μM (*i.e.*, luteolin, apigenin K, rutin, rhoifolin, quercetin and kaempferol; see Table 2). These IC_{50} values were found to be in the 23 to 196 μM range (with luteolin being the flavonoid with the highest ability to inhibit ACE activity).

In recent years, flavonoids have gained a great amount of interest with regards to their potential for cardiovascular protection. In fact, many epidemiological studies associate an increased consumption of foods and beverages rich in flavonoids with a reduced risk of CVD death [51–53]. Additionally, several of these flavonoids or their derivatives (*i.e.*, diosmin, rutin and quercetin) are widely used as pharmaceutical agents for their vasoprotective properties (*i.e.*, Daflon 500 and Venoruton) [54].

Flavonoids are based on the structure of phenyl-benzopyrone and differ from one another in terms of hydroxyl, methoxyl or glycosylated substituents, the position of the benzenoide (B-ring) substituent relative to the C-ring, the degree of unsaturation and the types of sugars that are attached [55]. We evaluated the inhibitory effects on the ACE activity of a group of flavonoids from five different structural types (see Figure 1). The inhibitory effects of certain flavonoids on ACE activity that have been reported in other studies were confirmed [37]. Many of the flavonoids that were tested could inhibit ACE in the micromolar range [22,56]. However, as was expected, significant differences were observed in the ACEI activity depending on the flavonoid structure [25,36]. Although the ACEI activity of these flavonoids does not reach the potency of drugs commonly used in the treatment of hypertension, food products with moderate ACEI activity (*i.e.*, an ACEI index higher than 70%) may be considered as naturally functional foods [57] if it is also taken into account that the regular dietary intake of polyphenols could be as high as 1 g/day [58,59]. Moreover, functional foods containing these natural compounds would not be expected to have the side effects associated with synthetic drugs used in hypertension control [60].

Our evaluation of the abilities of different flavonoids to inhibit the activity of ACE confirmed that the principal structural features for their inhibitory activity are as follows: (a) the double bond between C2 and C3 at the C-ring; (b) the catechol group in the B-ring (3',4'-dihydroxy) [61]; and (c) the ketone group at the C4 carbon on the C-ring [which is a functional group that has been observed to be essential for inhibiting ACE [62]. According to these general considerations, we analyzed and evaluated the SAR

derived from our results. Our data confirm that a distinguishing feature for ACE inhibition by flavonoids is the presence of an unsaturated 2–3 bond conjugated with a 4-oxo- function, aside from the 3',4'-catechol B-ring pattern, as occurs mainly in luteolin, quercetin and rutin. However, it is important to analyze the specific, qualitative and quantitative influence of each one of these three sub-structures in the SAR results.

The Significance of the C2 = C3 Double Bond in the C-ring: Flavone vs. Flavanone

As previously mentioned, the presence of a C2–C3 double bond seems to be essential for the molecule to exert a significant ACEI activity. Two main factors would explain this fact. First, the molecular electronic distribution would allow the maintenance of a definitive structural conjugation, from the B-ring to the A and C rings, in contrast to the flavanone structure, with which this definitive structural conjugation is not possible. Second, the spatial, or the maintenance of a nearly planar structure, would disappear if this bond was saturated, producing a flavonoid skeleton with an obtuse angle, which would be variable depending on the rest of the constituents of the molecule. Our data confirm previous findings that suggest that a nearly planar flavonoid structure is an important factor in the inhibition of ACE [55]. In fact, all flavanones included in this study, both aglycones (naringenin and hesperetin) and glycosides (naringin), are not as effective as flavones on ACEI activity. This difference can be observed, more specifically, by comparing the results between the flavone apigenin and its corresponding structurally similar flavanone, naringenin (and, although the difference is on another scale, between diosmetin and hesperetin) where the absence of the C2 = C3 double bond in naringenin involves a 91% reduction of ACEI activity at 100 μM *vs.* apigenin (see Figures 2A and 3).

B-ring Pattern: Catechol Group vs. Monohydroxy Group and O-methylation

The presence of several hydroxyl groups in the flavonoids seems to be important for the extent of inhibition of the zinc metalloproteinases [29]. Additionally, the exact position of this group has been revealed to be very important for ACE inhibition. Hydroxylation at the 4'-position of the B ring seems to be of particular relevance, and in addition, the presence of a catechol group in the B ring (3',4'-dihydroxy) appears to be fundamental to achieving an increased ACE inhibitory activity, as occurred in luteolin (as well as quercetin and rutin), which presented the highest ACEI efficiency (see Figure 2 and Table 2). Luteolin has also been described as the most effective flavonoid for inhibiting other metalloproteinases (aminopeptidases), such as MMP-1 and MMP-2 [30]. Consequently, the presence of a catechol at the B-ring should be considered to be very important; indeed, the absence of the 3' hydroxyl group in apigenin causes a 57% reduction of ACEI activity at 100 μM relative to the luteolin (see Figures 2A and 3). A similar reduction of activity occurs with the flavonols quercetin and kaempferol, where the absence of catechol in the kaempferol resulted in a 4-fold increase in the IC_{50} relative to quercetin (see Table 2).

Additionally, the characteristic esterification of flavonoids in the 4' position significantly reduces ACEI activity, as occurs when the 4'-hydroxyl group of luteolin is methylated to generate diosmetin (an esterification that causes a 78% reduction of ACEI activity at 100 μM ; see Figures 2A and 3).

The Absence of a Carbonyl Group in C4 (C-ring)

The absence of this functional group represents an important reduction in the capacity to inhibit ACE activity. This fact was evident in the case of flavan-3-ols, catechin and epicatechin in comparing their ACEI activities with the inhibition exerted by the luteolin, although all of them have a catechol structure in their B ring. However, it is important to keep in mind that the disappearance of the carbonyl group is simultaneously accompanied by the disappearance of the double bond C2=C3, the structural significance of which has been previously mentioned. This effect is perhaps related to the loss of planar spatial structure [26,62].

The Significance of 3-hydroxylation of the C-ring: Flavone vs. Flavonol

According to all the structural aspects mentioned above, the ACEI activity of flavonoids are related to a specific electronic distribution, the minimal alteration of this electronic distribution on the flavonoid skeleton, such as the transformation of flavone into flavonol by the addition of a hydroxyl group in the C-3 position of the C ring, thus, luteolin to quercetin, produced a 44% decrease in the ACEI activity at 100 μM (see Figures 2A and 3). However, a similar reduction in ACE activity does not occur when comparing the activity of apigenin and kaempferol because in this case, the flavonol exerts an increase in the ACEI activity with respect to the flavone at both the tested concentrations. This suggests that the absence of a catechol group in the B ring of apigenin and kaempferol also modifies the global electronic distribution, altering the significance of the hydroxylation at C-3.

The Significance of Glycosylation at 7-O (A-ring) and 3-O (C-ring) Positions

These two positions are the most typical locations for glycosyl radicals in the flavonoid skeleton (generally, rhamnose-glucose-aglycon). Table 2 shows that the flavonoids rhoifolin (7-O-gly) and rutin (3-O-gly) were almost as effective as their corresponding aglycons (*i.e.*, apigenin and quercetin, respectively) indicating that glycosylations at positions 7 or 3 do not produce steric hindrances that hamper them from binding to ACE in a way that is similar to the actions of their own aglycons.

These data show similarities in activity levels for the naringin-naringenin tests but demonstrate the opposite effects for diosmin-diosmetin (see Figure 2). This behavioral difference could be related to differences in the glycosylation pattern: neohesperidosyl (rha-1-2-glu) for rhoifolin and naringin, and rutinosyl (rha-1-6-glu) for diosmin. The neohesperidosyl structure has greater electronic interaction with the flavonoid skeleton (including intramolecular hydrogen bonds), with consequent influence on the overall electronic distribution. The fact that the 7-O-glucoside flavonoids (glucose-aglycon) were equal or even stronger inhibitors than the aglycons has already been reported with relation to the inhibition of the zinc metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 [30].

The Significance of the Position of B-ring in C-ring: Flavone (2-B-ring) vs. Isoflavone (3-B-ring)

The data from this study do not allow a definite assessment of ACEI activity in the tested compounds. Although the values obtained for the isoflavone genistein and the flavone apigenin show differences at 500 μM (40% *vs.* 58%, respectively), the responses were similar at the 100 μM concentration.

The Possible Significance of Potassium Salts

More research is needed to evaluate the use of flavonoids in which the hydroxyls in positions 7 and 4' are ionized (R-O-K). At 100 μM , apigenin and naringenin showed similar effects to those of their potassium salts, while at 500 μM , their potassium salts showed a significantly higher ACEI activity.

IC₅₀ Values for Selected Compounds

Independent of the comparative analysis of the results obtained at 100 and 500 μM , the determination of the IC₅₀ value for six selected compounds allows us to confirm the importance of the sub-structural elements of the SAR (see Table 2). Thus, the relative IC₅₀ ratios of these compounds (*i.e.*, luteolin (1)>quercetin (1.87)>rutin (2.78)>kaempferol (7.74)>rhoifolin (7.96)>apigenin K (8.52)] confirm the importance of the presence of the B-ring catechol group combined with the double bond and the carbonyl group of the C ring. In fact, the absence of the above-mentioned catechol group for kaempferol, rhoifolin and apigenin supposes an increase of the IC₅₀ up to values that are most likely within a range of physiological concentrations. Therefore, to reach the concentration of flavonoids necessary to inhibit the ACE, it would be necessary to apply them as pharmaceuticals agents or as dietary supplements which contain a sufficient flavonoid concentration to obtain *in vivo* efficacy. The apparent influence of 3-O-glycosylation (rutin *vs.* quercetin) would seem to be more logical, in that the existence of a certain steric impediment inhibits the interaction of the flavonoid with the active center of the enzyme, although the values for both flavonols are reasonably similar.

Prediction of Complexes between tACE and the Flavonoids with the Highest ACEI Activity

The intermolecular interactions between ACE's binding site residues and the predicted poses for the flavonoids with the highest ACEI activity are shown in Table 3 (together with results for experimental complexes at PDB between tACE and ACE inhibitors). The results in that table show how these flavonoids form intermolecular interactions with some of the ACE's binding site regions (*i.e.*, S2', S2'/S1' and S1) that are also involved in the binding of known ACE inhibitors. At this point, it is remarkable how these flavonoids share most of the intermolecular interactions at the ACE's S1 site that have been found for synthetic ACE inhibitors (*e.g.*, lisinopril, enalaprilat, captopril; see Table 3) and, therefore, suggest that binding to the ACE's S1 subsite is essential for ACEI activity.

Figure 4 shows the predicted pose for luteolin at the tACE binding site and its location relative to the experimental poses for the ACE inhibitors lisinopril, captopril and enalaprilat. In that pose, the two B-ring hydroxyls of luteolin are able to make charge-charge interactions with the active site Zn²⁺ (in a way that is similar to the interactions made by the carboxylic acid from lisinopril and enalaprilat; see Figure 4). Interestingly, the charge-charge interaction with the 3' hydroxyl is stronger than that of with the 4' interaction (*i.e.*, the distance between the Zn²⁺ ion and the hydroxyl oxygen is 2.1 and 4.3 Å for 3' and 4', respectively) which could explain why apigenin (see Figure 1) shows a decrease of approximately 50% of ACE inhibition relative to luteolin (see Figure 2).

Conclusions

In this study, we have demonstrated that changes in the flavonoid active core affect its capacity to inhibit the ACE, in a way that is similar to what has been described for other zinc metalloproteinases [29,30]. We provide additional examples of

flavonoid structure-activity relationships and establish the structural features needed for the ACEI activity of flavonoids. We show that at the physiological flavonoid concentration (*i.e.*, 100 μM), the relative effect of the different substructures on ACEI activity is as follows: double bond $\text{C2}=\text{C3}>4'\text{-O-methoxylation} \approx 4\text{-carbonyl group}>3'\text{-hydroxylation} >3\text{-hydroxylation} >3\text{-O-glycosylation}$. Through this study we can assess the influence of different structural groups, at the steric level, on inductive-mesomeric effects and the flavonoid molecular skeleton. Finally, we would like to remark that it is clear that the application of these flavonoids as inhibitors of ACE *in vivo* may be useful as nutritional supplements

or in pharmaceutical formulations to obtain a sufficient dose/response efficacy.

Acknowledgments

We thank Zara Pons and María Margalef for their technical assistance.

Author Contributions

Performed the experiments: JC LA BM. Analyzed the data: JC MQ LA GP BM. Contributed reagents/materials/analysis tools: LG MQ SG-V GP. Wrote the paper: JC MQ SG-V GP BM.

References

1. American Heart Association (2004) Heart Disease and Stroke Statistics: 2004 Update. Dallas, TX, American Heart Association.
2. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, et al. (2005) Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 365: 217–223.
3. Mancia G, Bombelli M, Lanzarotti A, Grassi G, Cesana G, et al. (2002) Systolic vs. diastolic blood pressure control in the hypertensive patients of the PAMELA population. *Arch Intern Med* 162: 582–586.
4. Romero JR (2007) Prevention of ischemic stroke: overview of traditional risk factors. *Curr Drug Targets* 8: 794–801.
5. Maruthur NM, Wang NY, Appel LJ (2009) Lifestyle interventions reduce coronary heart disease risk: results from the PREMIER Trial. *Circulation* 119: 2026–2031.
6. Ondetti MA, Rubín B, Cushman DW (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196: 441–444.
7. Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 35: 769–773.
8. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Huber J, Allegrini J, John M, et al. (1988) Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci* 85: 9386–9390.
9. Williams TA, Corvol P, Soubrier F (1994) Identification of two active site residues in human angiotensin I-converting enzyme. *J Biol Chem* 269: 29430–29434.
10. Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF (1989) Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 86: 7741–7745.
11. Wei L, Clauser E, Alhenc-Gelas F, Corvol P (1992) The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J Biol Chem* 267: 13398–13405.
12. Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, et al. (1997) The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest* 99: 2375–2385.
13. Junot C, Gonzales MF, Egan E, Cotton J, Vazeux G, et al. (2001) RXP 407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks *in vivo* the degradation of homeostatic peptide acyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 606–611.
14. Fuchs S, Xiao HD, Cole JM, Adams JW, Frenzel K, et al. (2004) Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice. *J Biol Chem* 279: 15946–15953.
15. Skeggs L, Kahn J, Shumway N (1956) The preparation and function of the hypertension-converting enzyme. *J Exp Med* 103: 295–299.
16. Dorer FE, Kahn JR, Lentz KE, Levine M, Skeggs LT (1974) Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme. *Circ Res* 34: 824–827.
17. Pfeiffer MA, Frohlich ED (2006) Improvements in clinical outcomes with the use of angiotensin-converting enzyme inhibitors: cross-fertilization between clinical and basic investigation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H2021–H2025.
18. Israeli ZH, Hall WD (1992) Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med* 117: 234–242.
19. Opie LH (1996) ACE inhibitors in pregnancy—how to avoid the sting in the tail. *S Afr Med J* 86: 326–327.
20. Nyman U, Joshi P, Madsen LB, Pedersen TB, Pinstrup M, et al. (1998) Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). *J Ethnopharmacol* 60: 247–263.
21. Park PJ, Je JY, Kim SK (2003) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitoooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *J Agric Food Chem* 51: 4930–4934.
22. Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, et al. (2007) Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excels* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res* 21: 32–36.
23. Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbio R, Samperi R, et al. (2011) Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat Prod Res* 5: 469–495.
24. Hughes R, Croley T, Metcalfe C, March R (2001) A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometry* 210/211: 371–385.
25. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435–445.
26. Navarro-Núñez L, Castillo J, Lozano M, Martínez C, Benavente-García O, et al. (2009) Tromboxane A2 receptor antagonist by flavonoids: structure-activity relationships. *J Agric Food Chem* 57: 1589–1594.
27. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Rio JA (2000) Antioxidant Activity Of Phenolics Extracted From *Olea Europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* 68: 457–462.
28. Amic D, Davidovic-Amic D, Beslo D, Rastija V, Lucia B, et al. (2007) SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr Med Chem* 14: 827–845.
29. Parellada J, Suárez G, Guinea M (1998) Inhibition of zinc metalloproteinases by flavonoids and related phenolic compounds: structure-activity relationships. *J Enzyme Inhib* 13: 347–359.
30. Ende C, Gebhardt R (2004) Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* 70: 1006–1008.
31. Ojeda D, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J, et al. (2010) Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol* 127: 7–10.
32. Kwon EK, Lee DY, Lee H, Kim DO, Baek NI, et al. (2010) Flavonoids from the buds of *Rosa damascena* inhibit the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase and angiotensin I-converting enzyme. *J Agric Food Chem* 58: 882–886.
33. Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, et al. (2007) Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excels* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res* 21: 32–36.
34. Kiss A, Kowalski J, Melzig MF (2004) Compounds from *Epilobium angustifolium* inhibit the specific metalloproteinases ACE, NEP, and APN. *Planta Med* 70: 919–923.
35. Oh H, Kang DG, Kwon JW, Kwon TO, Lee SY, et al. (2004) Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol Pharm Bull* 27: 2035–2037.
36. Ottaviani JJ, Actis-Goretta L, Villordo JJ, Fraga CG (2006) Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 88: 359–365.
37. Actis-Goretta L, Ottaviani JJ, Fraga CG (2006) Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 54: 229–234.
38. Balasuriya BWN, Rupasinghe HPV (2011) Plant flavonoids as angiotensin converting enzyme inhibitors in regulation of hypertension. *Functional Foods in Health and Disease* 5: 172–188.
39. Quiñones M, Sanchez D, Muguerza B, Miguel M, Alexandre A (2011) Mechanisms for antihypertensive effect of CacaoOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Res Int* 44: 1203–1208.
40. Gasparotto J, Junior A, Gasparotto FM, Lourenço EL, Crestani S, et al. (2011) Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J Ethnopharmacol* 134: 363–372.
41. Aviram M, Dornfeld L (2001) Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis* 158: 195–198.
42. Bormann H, Melzig MF (2000) Inhibition of metalloproteinases by flavonoids and related compounds. *Pharmazie* 55: 129–132.
43. Sentandreu MA, Toldrá F (2006) A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity. *Nat Protoc* 1: 2423–2437.
44. Quirós A, del Mar Contreras M, Ramos M, Amigo L, Recio I (2009) Stability to gastrointestinal enzymes and structure-activity relationship of beta-casein-peptides with antihypertensive properties. *Peptides* 30: 1848–1853.
45. Shelley JC, Chollet A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, et al. (2007) Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J Comput Aided Mol Des* 12: 681–691.

46. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Beard HS, Frye LL, et al. (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 7: 1739–49.
47. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, et al. (2004) Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *J Med Chem* 7: 1750–1759.
48. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, et al. (2006) Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 21: 6177–6196.
49. Anthony CS, Corradi HR, Schwager SL, Redelinghuys P, Goerziadis D, et al. (2010) The N domain of human angiotensin-I-converting enzyme: the role of N-glycosylation and the crystal structure in complex with an N domain-specific phosphinic inhibitor, RXP407. *J Biol Chem* 285: 35685–35693.
50. Laskowski RA, Swindells MB (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model* 10: 2778–2786.
51. Liu Z, Ma LP, Zhou B, Yang L, Liu ZL (2000) Antioxidative effects of green tea polyphenols on free radical initiated and photosensitized peroxidation of human low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 106: 53–63.
52. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm E, et al. (2001) The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 134: 1106–1114.
53. Kris-Etherton P, Keen C (2002) Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 13: 41–49.
54. Gohel MS, Davies AH (2009) Pharmacological agents in the treatment of venous disease: an update of the available evidence. *Curr Vasc Pharmacol* 3: 303–308.
55. Xu YC, Leung SW, Yeung DK, Hu LH, Chen GH, et al. (2007) Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 68: 1179–1188.
56. Olszanecki R, Bujak-Gizycka B, Madej J, Suski M, Wołkow PP, et al. (2008) Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme. *J Physiol Pharmacol* 59: 387–392.
57. Meisel H, Goepfert A, Günther S (1997) ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft* 52: 307–311.
58. Kuhnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117–191.
59. Manach C, Scalbert A, Morand C, Révész C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727–747.
60. FitzGerald RJ, Meisel H (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr* 84: 33S–37S.
61. Saragusti AC, Ortega MG, Cabrera JL, Estrin DA, Marti MA, et al. (2010) Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of the flavonoid-enzyme interaction. *Eur J Pharmacol* 644: 138–145.
62. Sartor L, Pezzato E, Dell’Aica I, Caniato R, Biggin S, et al. (2002) Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol* 64: 229–237.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

MANUSCRITO 3

Low-molecular procyanidin rich grape seed extract exert
antihypertensive effect in males spontaneously
hypertensive rats (SHR)

Quiñones M, Guerrero L, Suarez M, Pons Z, Aleixandre
A, Arola L, Muguerra B.

Aceptado para su publicación en
Food Research International

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

**Low-molecular procyanidin rich grape seed extract exert antihypertensive effect
in males spontaneously hypertensive rats (SHR)**

Quiñones M[†], Guerrero L[‡], Suarez M^{†§}, Pons Z[†], Aleixandre A[‡], Arola L^{†§},
Muguerza B^{†§*}.

[†] Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University,
Tarragona, 43007 Spain. [#] Department of Research, Nutrition and Innovation,
ALPINA S.A, Bogotá, Colombia. [§] Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS),
TECNIO, CEICS, Reus, 43204, Spain. [‡] Department of Pharmacology, Faculty
of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, 28040 Spain.

Running title: Grape seed extract effects in spontaneously hypertensive rats

*Dr. Begoña Muguerza

Dpto. Bioquímica y Biotecnología, University Rovira i Virgili, C/ Marcel·li
Domingo s/n 43007 Tarragona, Spain. [#]Centre Tecnològic de Nutrició i Salut
(CTNS), TECNIO, Reus, Spain.

Telephone: 34 977 559566

Fax: 34 977 558232

E-mail: begona.muguerza@urv.cat

1. Introduction

Hypertension (HTN) is a major risk factor for stroke and is the most common disease found in patients in primary care (Chobanian et al., 2003). It is estimated that by 2025, the incidence of hypertension will increase to 24% in developed countries and to 80% in developing countries (Messerli, Williams & Ritz, 2007). The current and common method for controlling hypertension is the use of long-term drug therapy. However, it is well known that drugs have many side effects, which may complicate the patient's medical condition. New strategies for treating hypertension based on natural products could greatly benefit hypertensive patients. In this context, there is evidence that a diet rich in vegetables and fruits, which are rich in flavonoids and phenolic compounds, helps to control arterial blood pressure. In fact, increased fruit and vegetable intake has been included recently in the guidelines for the management of arterial hypertension (Mancia et al., 2007).

Grapes and wine are well known as significant sources of flavonoids (Aherne & O'Brien, 2002), which exhibit several pharmacological properties, including vasodilator (Andriambelosen, Kleschyov, Muller, Beretz, Stoclet & Andriantsitohaina, 1997, Diebolt, Bucher & Andriantsitohaina, 2001, Moura et al., 2002, Zenebe, Pechanova & Andriantsitohaina, 2003), antihypertensive (Diebolt, Bucher & Andriantsitohaina, 2001, Jang & Lee, 2011) and antioxidant (Frankel, German, Kinsella, Parks & Kanner, 1993, Jang & Lee, 2011, Moura et al., 2002) activities. These activities have led to grapes and wine being considered as functional food candidates (Barreiro-Hurlé, Colombo & Cantos-Villar, 2008, Gollucke, 2010, Schieber, Stintzing & Carle, 2001, Shrikhande, 2000). Nevertheless, different grape products often widely vary in both the type and content of flavonoids, and the characterisation of the types of polyphenols present in a grape variety or grape-derived product is important for understanding the possible health-promoting effects associated with its consumption. In fact, grape botanical variety/species, cultivation area, harvesting season, cultural practice, sun exposure, environmental factors, grape maturity, and manufacturing factors may affect the flavonoid content of

grapes, grape extracts or wine (Aherne & O'Brien, 2002, Downey, Dokoozlian & Krstic, 2006, Yang, Martinson & Liu, 2009). In addition, the phenolic distribution in the juice, pulp, skins and seeds is very different; the phenolic contents of these components are approximately 5%, 1%, 30% and 64%, respectively (Singleton, 1981, Singleton & Esau, 1969). Moreover, in the grape fruit, flavonoids, such as anthocyanins and resveratrol, are mainly localised in the skins, whereas the procyanidins or flavanols are principally located in the seeds (Yang, Martinson & Liu, 2009).

Grape seeds are a by-product of the grape/wine industry, but they are one of the richest sources of procyanidins (Nakamura, Tsuji & Tonogai, 2003), and their beneficial effects have been extensively investigated. Our research group has demonstrated that a grape seed procyanidin-rich extract (GSPE) exhibits antioxidant capacity (Puiggròs, Llópez, Ardévol, Bladé, Arola & Salvadó, 2005), improves lipid metabolism (Del Bas et al., 2005), limits adipogenesis (Pinent et al., 2005), acts as an insulin-mimetic agent (Pinent, Blay, Blade, Salvado, Arola & Ardevol, 2004) and reduces inflammation (Terra et al., 2011).

Procyanidin-rich foods, such as cocoa, have demonstrated antihypertensive properties (Buijsse, Feskens, Kok & Kromhout, 2006, Taubert, Roesen, Lehmann, Jung & Schömig, 2007). The antihypertensive properties of procyanidins are associated with different biological activities, such as nitric oxide-mediated vasodilation (Duffy et al., 2001, Fisher, Hughes, Gerhard-Herman & Hollenberg, 2003, Mukai & Sato, 2009, Schroeter et al., 2006, Stein, Keevil, Wiebe, Aeschlimann & Foltz, 1999, Yamamoto, Suzuki & Hase, 2008), angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition (Actis-Goretta, Ottaviani, Keen & Fraga, 2003, Actis-Goretta, Ottaviani & Fraga, 2006, Dong, Xu, Liang, Head & Bennett, 2011, Ottaviani, Actis-Goretta, Villordo & Fraga, 2006) and reduction of oxidative stress (Mane, Loonis, Juhel, Dufour & Malien-Aubert, 2011, Ramiro-Puig et al., 2007). Although there are evidences in human studies that the whole grape fruit improves blood pressure and other factors related to vascular function in men with metabolic syndrome (Barona, Aristizabal, Blesso, Volek & Fernandez, 2012) no investigation has yet been performed on the antihypertensive effects of GSPE in male hypertensive rats. As has been

explained above, the phenolic composition of the grape seed differs from the composition of the whole grape. Therefore, it is necessary to extensively characterize the grape seed extract to better relate the resulting effects with the specific combination and concentration of molecules present in the extract.

The aims of the present study were to characterise and quantify both the flavonoid content present in GSPE and the total antioxidant capacity of this extract. We also evaluated the short-term effects of GSPE in an experimental model of hypertension. The underlying mechanisms involved in the antihypertensive effects of procyanidins have not been clarified in detail, but a better understanding of these mechanisms will allow a rational development of functional foods rich in polyphenols for blood pressure control. Therefore, in this study, we also investigated the possible mechanisms involved in the antihypertensive effects of GSPE.

2. Material and Methods

2.1. Grape seed procyanidin-rich extract

The grape seed procyanidin-rich extract (GSPE) was obtained from white grape seeds and was kindly provided by Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, France). According to the manufacturer, the procyanidin profile of the extract was composed of monomers or flavan-3-ols (21.3%), dimers (17.4%), trimers (16.3%), tetramers (13.3%) and oligomers (5–13 units; 31.7%) of procyanidins.

2.2 Characterisation of GSPE

2.2.1. Solvents and Phenolic Standards

The following commercial standards were used for quantitative determination by HPLC: protocatechuic acid, eriodictyol-7-*O*-glucoside, chlorogenic acid, quercetin-3-*O*-galactoside, quercetin-4-*O*-glucoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, naringenin-7-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-rutinoside, kaempferol-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, eriodictyol,

isorhamnetin and procyanidin B2, which were purchased from Extrasynthese (Genay, France). (+)-Catechin and (-)-epicatechin were purchased from Fluka Co. (Buchs, Switzerland), and naringenin, kaempferol, vanillic acid, *p*-coumaric acid, 3-hydroxybenzoic acid, gallic acid, rutin, and (-)-epigallocatechin gallate were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). 2,2'-Azo-bis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) was purchased from Acros Organics. Fluorescein was purchased from Fluka/Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and Folin-Ciocalteu's reagent and Trolox were purchased from Sigma (Barcelona, Spain). Organic solvents (high performance liquid chromatography [HPLC]-grade) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain) and Merck (Darmstadt, Germany).

2.2.2. Quantification of the total phenolic content of GSPE

The total phenolic content of GSPE was estimated spectrophotometrically using a Hitachi U-1900 Spectrophotometer by means of the Folin-Ciocalteu assay at 725 nm (Singleton & Esau, 1969). The assay was performed in triplicate, and the samples were dissolved in ethanol:water (1:1). The results were expressed as mg of gallic acid per g of fresh GSPE extract.

2.2.3. Analysis of individual phenolic compounds of GSPE by reverse phase chromatography coupled to mass spectrometry

To study the extract in greater detail, individual phenolic compounds of the GSPE (both flavan-3-ols and phenolic acids) were characterised by an HPLC coupled to a UV detector (Agilent 1200 Series) and a time-of-flight mass spectrometer (TOF 6210, Agilent). The HPLC-MS system consisted of an Agilent 1200 Series instrument (Agilent Technologies) with a Zorbax SB-Aq column (3.5 · m, 150 mm x 2.1 mm internal diameter [i.d.]) equipped with a Pre-Column Zorbax SB-C18 (3.5 · m, 15 mm x 2.1 mm i.d.), which was also from Agilent, and Masshunter software. During the analysis, the column was kept at 30°C and the flow rate was 0.21 mL/min. The solvent composition of solvent A was Milli-Q water/acetic acid (99.8:0.2 v/v), and that of solvent B was acetonitrile/acetic acid (99.8:0.2 v/v). Initially, 2% solvent B was used. The

proportion of solvent B was gradually increased, reaching 20% at 33 minutes, 22.5% at 34.2 min, 23.2% at 40 min, 25% at 63 min and 100% at 72 min. Then, solvent B was reduced to the initial proportion at 75 min and maintained at this level until 90 min to re-equilibrate the column at these initial conditions. The injection volume was 9.4 μL , and all the freeze-dried samples were re-dissolved in water:acetone:acetic acid (27.5:70:0.5 v/v/v).

The wavelength of the UV detector was set at 280 nm. Ionisation in the mass spectrometer was performed by electrospray (ESI) in the negative mode, and the source parameters were as follows: capillary voltage, 4 kV; fragmentor, 125 V, source temperature, 150°C; desolvation gas temperature, 350°C, with a flow rate of 9 L/min and a drying gas flow rate of 12 L/min. Nitrogen was used as the cone gas.

Individual phenols were quantified with a six-point regression curve by using standards obtained from commercial suppliers.

2.2.4. Oxygen radical absorbance capacity assay

The characterisation of the GSPE was completed with the evaluation of its antioxidant activity in terms of its hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC assay). The ORAC assay was performed according to the methodology reported previously (Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan & Prior, 2002) with some modifications (Suárez, Romero, Ramo, Macià & Motilva, 2009). This method analyses the peroxy radical-scavenging activity of the samples. The assay was performed in 96-well microplates with an FLx800 Fluorescence Microplate Reader (Bio-Tek - IZASA, Barcelona, Spain) with an excitation filter set at 485 nm and an emission filter set at 520 nm. The Gen5™ Data Analysis Software controlled the fluorescence plate reader. The experiment was performed at 37°C in phosphate buffer at pH 7.4. The reaction mixture consisted of 150 μL of 68 nM fluorescein solution (substrate), 25 μL of 74 mM initiator solution (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride [AAPH]; prepared immediately before use in the assay buffer at 37° C), and 25 μL of either GSPE or Trolox at different concentrations (ranging from 0.25 to 5

$\mu\text{g/mL}$ of the phenolic extract and from 12.5 to 100 μM Trolox). The assay buffer was used as a blank. The ORAC values were calculated by using the area-under-curve (AUC) results for Trolox, expressed as micromoles of Trolox equivalents per gram of the phenolic extract, and the sample calibration curves obtained in each analysis.

2.3. Experimental Procedure in Rats

2.3.1. General protocol

In this study, we used 17-22-week-old male, spontaneously hypertensive rats (SHR) weighing 307.18 ± 1.64 g and 17-20-week-old male, normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats weighing 343.75 ± 2.75 g. All of these animals were obtained from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). The animals were maintained at 23°C with 12-hour light/dark cycles and were given tap water and a standard diet (A04 Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum* during the experiments. GSPE was dissolved in water and orally administered by gastric intubation, between 9 and 10 a.m. Water was used as a negative control, and Captopril (Sigma, USA) (50 mg/kg), a known antihypertensive drug, was given as a positive control. Different doses of GSPE (250, 375 and 500 mg/kg) were administered to the SHR, and 375 mg/kg GSPE was also evaluated in the Wistar-Kyoto rats. The time-length of both studies was 48 hours. The animals were always orally administered either 1 mL of water or 1 mL of the appropriate solution of GSPE or Captopril. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were recorded in the rats by the tail-cuff method (Buñag, 1973) before administration and at 2, 4, 6, 8, 24 and 48 hours post-administration. Before the measurements, the rats were maintained at 38°C for 10 min to detect the pulsations of the tail artery. Five measurements of SBP and DBP were taken, and their averages were calculated. To minimise stress-induced variations in blood pressure, all measurements were taken by the same person in the same peaceful environment. Moreover, to guarantee the reliability of the measurements, we established a training period of two weeks prior to the actual trial to allow the rats to become acclimated to this procedure.

Additionally, fifteen 22-week-old SHR were sacrificed by decapitation after overnight fasting. Eight of these animals were administered 375 mg/kg GSPE six hours before being sacrificed, and the remaining animals (seven) were administered water six hours before being sacrificed. The GSPE and water were orally administered by gastric intubation, between 9 and 10 a.m. Blood samples were obtained from the sacrificed rats to analyse plasma ACE activity. Liver samples were obtained from these rats to assess malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels. The procedures used to evaluate all of these parameters are described below.

All the above-mentioned experiments were performed as authorised for scientific research (European Directive 86/609/CEE and Royal Decree 223/1988 of the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food).

2.3.2. Biochemical assays

2.3.2.1. Plasma and liver preparations for biochemical assays

Blood samples from the sacrificed animals were collected in tubes containing sodium heparin as an anticoagulant. These samples were centrifuged at 2500 *g* for 20 min at 4°C to obtain the plasma, which was divided into aliquots and stored at -80°C until analysis of ACE activity.

The liver tissue was homogenised at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS, 0.27 mM KCl, 0.15 M NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂PO₄·H₂O, pH 7.4) with teflon beats (Lysing Matrix D, MP biomedicals, Barcelona, Spain) in a Fast-Prep instrument (MP Biomedicals, Barcelona, Spain). The homogenates were centrifuged at 5000 *g* for 15 min at 4°C, and the supernatants of the centrifuged samples were stored at -80°C until use. The protein content of the homogenates was determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with bovine serum albumin as the standard.

2.3.2.2. Malondialdehyde analysis

The MDA levels in the liver were measured by a thiobarbituric acid assay based on one proposed in the literature (Rodriguez-Martinez & Ruiz-Torres, 1992), which was modified as previously described (Manso, Miguel, Even, Hernández, Aleixandre & López-Fandiño, 2008). The liver homogenate was mixed with 20% trichloroacetic acid in 0.6 M HCl (1:1, v/v), and the sample tubes were kept on ice for 20 min to precipitate the plasma components and thus avoid any interference. The samples were centrifuged at 1500 *g* for 15 min before adding thiobarbituric acid (120 mM in Tris 260 mM, pH 7) to the supernatant in a ratio of 1:5 (v/v). The mixture was subsequently boiled at 97°C for 30 min. Spectrophotometric measurements at 540 nm were made at 20°C. The plasma MDA values were expressed as nmol MDA/g tissue protein.

2.3.2.3. Reduced glutathione assay

The GSH level in the liver was measured by the monochlorobimane fluorimetric method (Kamencic, Lyon, Paterson & Juurlink, 2000). For this analysis, 90 μ L of homogenised supernatant from the liver was mixed with monochlorobimane (100 mM; Sigma, Barcelona, Spain) and 10 μ L of the catalyst (glutathione S-transferase) solution (1U/mL), which was obtained from horse liver (Sigma, Barcelona, Spain). The levels of GSH were quantified using a fluorimeter FLx800 Fluorescence Microplate Reader (Bio-Tek-IZASA, Barcelona, Spain) and were expressed as μ mol/g tissue protein.

2.3.2.4. Determination of ACE activity in plasma

The ACE activity in plasma was measured using a fluorimetric method, as previously reported (Miguel, Alonso, Salaices, Aleixandre & López-Fandiño, 2007). Briefly, plasma aliquots were incubated in triplicate for 15 min at 37°C with 40 μ L of assay buffer containing the ACE substrate (5 mM of Hip-His-Leu; 0,1 M sodium tetraborate decahydrate, 300 mM NaCl; pH 8.3; Sigma, Barcelona, Spain). The reaction was quenched by the addition of 190 μ L of 0.35 M NaOH. The concentration of the product, His-Leu, was measured fluorimetrically after 30 min of incubation with 17 μ L of 2% *O*-phthaldialdehyde

in methanol. The fluorescence measurements were performed at 37°C in a FLx800 Fluorescence Microplate Reader (Bio-Tek-IZASA, Barcelona, Spain) with 350-nm excitation and 520-nm emission filters and Gen5™ Data Analysis Software. Black 96-well polystyrene microplates (Thermo Scientific, MERCK, Barcelona, Spain) were used. A calibration curve was constructed by adding different concentration of rabbit lung ACE (Sigma, Barcelona, Spain) to each plate. The ACE activity was expressed as mU ACE/mL of plasma.

2.4. Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analysed by one-way and two-way analyses of variance (ANOVA) by using the GraphPad Prism software. Differences between the groups were assessed with the Bonferroni test. Differences between the means were considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Characterisation of GSPE

The Folin-Ciocalteu assay revealed a total phenolic content of 516.8 ± 12.1 mg gallic acid equivalents/g of fresh GSPE. Figure 1 shows the results of the analysis of the individual phenolic compounds (both flavan-3-ols and phenolic acids) by means of reversed phase HPLC-UV-MS (TOF). Table 1 presents the amounts of the identified compounds quantified using calibration curves constructed with commercial standards.

GSPE had an activity of $16,935 \pm 651$ μ mol Trolox equivalents/g of fresh GSPE as determined by the ORAC assay.

3.2. Effects of GSPE on arterial blood pressure

Before administration of the different treatments, the SHR had a SBP of 210.60 ± 4.63 mm Hg and a DBP of 182.22 ± 4.78 mm Hg. Figure 2 shows the changes in SBP (figure 2A) and DBP (figure 2B) observed in SHR before and

after the administration of water, Captopril or different doses of GSPE. The values of SBP and DBP obtained before and after oral administration of water were very similar. Captopril (50 mg/kg) caused an obvious decrease in arterial blood pressure in SHR, and the maximum decreases in SBP and DBP were observed 4 hours post-administration. These variables returned to baseline 48 hours after the administration of this drug. The oral administration of GSPE also resulted in significant decreases in SBP and DBP in the SHR. The decrease in SBP caused by GSPE was dose-dependent up to 375 mg/kg, and the decrease corresponding to this dose (-48.20 ± 6.28 mm Hg), which was observed 6 hours post-administration, was the maximum observed for this extract. Nevertheless, as for Captopril, SBP returned to baseline 48 hours after the administration of 375 mg/kg GSPE. In contrast to the results in SHR, the 375 mg/kg dose of the extract did not affect the arterial blood pressure in normotensive WKY rats (Figure 3). The maximum decrease in SBP caused by 250 mg/kg GSPE (-31.77 ± 8.78 mm Hg) occurred 2 hours post-administration. The decreases in DBP caused by the 375 and 250 mg/kg GSPE doses were even greater than the decrease in DBP caused by 50 mg/kg Captopril. The maximum decrease in DBP (-57.39 ± 7.98 mm Hg) caused by 375 mg/kg GSPE was observed 6 hours post-administration in SHR. Paradoxically, 500 mg/kg GSPE exerted the lowest antihypertensive effect in SHR, as the largest changes in SBP (-19.85 ± 6.35 mm Hg) and DBP (-12.78 ± 6.25 mm Hg) caused by this dose of GSPE were less than the changes in these variables caused by the lower doses of the extract.

3.3. MDA, GSH and ACE assays

The MDA and reduced GSH levels as well as plasma ACE activity were measured in both untreated SHR and in SHR treated with 375 mg/kg GSPE 6 hours after administration. The livers of GSPE-treated and untreated SHR had very similar MDA levels (Figure 4A). The levels of reduced GSH were increased in the livers of treated SHR (Figure 4B), whereas plasma ACE activity was similar in untreated and GSPE-treated rats 6 hours after administration of 375 mg/kg GSPE (Figure 4C).

4. Discussion

Grapes, wine and other products obtained from grapes have demonstrated many beneficial effects (Dell'Agli, Buscialà & Bosisio, 2004, Xia, Deng, Guo & Li, 2010), including antihypertensive activity in rats (Diebolt, Bucher & Andriantsitohaina, 2001, Moura et al., 2002, Peng, Clark, Prasain, Kim, White & Wyss, 2005, Sarr et al., 2006) and humans (Flechtner-Mors, Biesalski, Jenkinson, Adler & Ditschuneit, 2004, Hansen, Marckmann, Dragsted, Nielsen, Nielsen & Grønbaek, 2005, Park, Kim & Kang, 2004). Polyphenols are considered to be major contributors to the health benefits of grapes (Diebolt, Bucher & Andriantsitohaina, 2001, Jang & Lee, 2011). However, it is important to note that not all polyphenols exhibit the same bioactivity (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy & Jiménez, 2004, Williamson & Manach, 2005). In fact, as different grape products do not contain the same amounts or types of polyphenols (Bunea, Pop, Babeş, Matea, Dulf & Bunea, 2012, Liang et al., 2011, Liang, Yang, Cheng & Zhong, 2012), the beneficial properties of these different grape products will also not be equivalent. This fact necessitates the characterisation of these grape products to identify their bioactive constituents.

In this study, the results of the total phenolic content assay showed that phenolic compounds constituted 52% of GSPE, which supports to the substantial potential of this extract. In fact, the total polyphenol content of GSPE was 2.3 times higher than that reported for grape seeds (Pastrana-Bonilla, Akoh, Sellappan & Krewer, 2003). The reverse-phase LC-MS analysis of the individual phenolic compounds of GSPE revealed that the most abundant phenols in GSPE are monomers, namely catechin (90.7 mg/g GSPE) and epicatechin (55.0 mg/g GSPE), and dimers, both in their free forms and linked to gallate (144.1 and 39.7 mg/g, respectively). Reverse-phase chromatographic analysis is suitable for small compounds (up to trimers), whereas the degree of polymerisation can be determined by normal-phase chromatography (Yang & Chien, 2000). Therefore, the information obtained from our analysis is a very useful complement to the characterisation provided by the manufacturer, which indicated the extent of polymerisation.

The most abundant phenolic acid in GSPE was gallic acid (17.7 mg/g), followed by protocatechuic acid (1 mg/g). In addition, the large amounts of epicatechin and its derivatives (dimers and gallates) found in the extract are noteworthy due to the beneficial effects of these compounds, which have been demonstrated in previous studies. In fact, any concentration of plasma epicatechin is accompanied by a dose-dependent increase in the plasma antioxidant capacity (Rein, Lotito, Holt, Keen, Schmitz & Fraga, 2000, Serafini, Bugianesi, Maiani, Valtuena, De Santis & Crozier, 2003). Also, a decrease in the plasma lipid oxidation (Rein, Lotito, Holt, Keen, Schmitz & Fraga, 2000, Serafini, Bugianesi, Maiani, Valtuena, De Santis & Crozier, 2003), a beneficial effect on vascular function (Schroeter et al., 2006) and a significant reduction in the serum oxidative stress (Flammer et al., 2007) is proportionally related with epicatechin plasma concentration. In addition, recent studies have shown the antihypertensive properties of epicatechin in different rat models of hypertension (Gómez-Guzmán et al., 2011a, Gómez-Guzmán et al., 2011b).

With regard to the antioxidant activity of GSPE, it is important to state that our result of $16935 \pm 651 \cdot \text{mole Trolox equivalents/g}$ of fresh GSPE from the ORAC assay is in agreement with an earlier result (Corrales, García, Butz & Tauscher, 2009) of $17180 \pm 129 \cdot \text{mole Trolox equivalents/g}$ of extract obtained from the seeds of the Riesling grape in an antioxidant assay using 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). Moreover, the antioxidant activity of GSPE extract was higher than the antioxidant activity of an antihypertensive cocoa extract used in a previous study by our research group ($12134 \pm 379 \mu\text{mole Trolox equivalents/g}$ of dry extract) (Quiñones, Miguel, Muguerza & Aleixandre, 2011).

Antioxidant therapy has been extensively studied in hypertensive patients (Kitiyakara & Wilcox, 1998), and polyphenols are well-known antioxidants (Dudonné, Vitrac, Coutière, Woillez & Mérillon, 2009, Scalbert, Johnson & Saltmarsh, 2005). In this study, GSPE was evaluated in SHR, the experimental animal model that best mimics essential hypertension in humans (FitzGerald, Murray & Walsh, 2004, Okamoto & Aoki, 1963). These *in vivo* trials revealed an obvious decrease in arterial blood pressure 6 hours post-administration of 375

mg/kg GSPE in SHR. This observed decrease (approximately 50 mm Hg) was a promising result because small reductions in blood pressure may have an important impact on cardiovascular events in the hypertensive population (2-3% reduction in risk for each mm Hg) (Turnbull et al., 2003). The effect of 375 mg/kg GSPE in SHR was quite similar to that of 50 mg/kg of Captopril, which is considered a very effective antihypertensive treatment in clinical practice. Therefore, we believe that GSPE could be used as an ingredient in functional foods, with potential therapeutic benefits regarding the prevention and treatment of hypertension. Nevertheless, the quantity of GSPE necessary to decrease arterial blood pressure in humans should be definitively established when clinical trials were conducted.

Paradoxically, 500 mg/kg GSPE, the highest dose of GSPE used in this study, demonstrated poorer antihypertensive effects in SHR than did the lower doses of this extract. A similar paradox could be observed with different doses of a cocoa powder and of a cocoa extract, both of which are rich in procyanidins, in SHR (Cienfuegos-Jovellanos, Quiñones, Muguerza, Moulay, Miguel & Alexandre, 2009, Quiñones, Miguel, Muguerza & Alexandre, 2011). Some researchers have proposed that a high quantity of polyphenols could exhibit pro-oxidant properties instead of antioxidant properties (Azam, Hadi, Khan & Hadi, 2004, Cotelle, 2001, Lahouel et al., 2006). The poorer antihypertensive effect observed with increased doses of the GSPE could be attributed to this proposed effect.

The association between free radical production, lipid peroxidation, oxidative stress and hypertension is well known (Corrales, García, Butz & Tauscher, 2009, Martínez-Revelles et al., 2012, Quiñones, Sánchez, Muguerza, Miguel & Alexandre, 2011, Rodrigo, González & Paoletto, 2011, Schulz, Gori & Münzel, 2011). Nevertheless, it is controversial whether the antioxidant properties of polyphenols could explain their health benefits. Although monomeric flavan-3-ols are among those polyphenols showing higher bioavailability (Tomas-Barberán et al., 2007), they appear in the plasma not as the parent compounds, but as phase II metabolites. Moreover, considerable

quantities of the ingested procyanidins reach the large intestine where they are degraded by colonic microbiota, giving origin to other smaller molecules that are also absorbed into the body (Del Rio, Mateos, Spencer, Massimiliano, Borges, & Crozier, 2012). Therefore, all these metabolites will be responsible of the biological effects of procyanidins, and they physiological properties are different than the original compounds ingested, including their antioxidant activities.

Many different molecular targets and mechanisms have been proposed to explain the cardiovascular effects of polyphenols. However, experimental data indicate that polyphenols present in fruits and vegetables affect endothelial function, and hence, blood pressure, by regulating the bioavailability of nitric oxide, which is known to destroy reactive oxygen species (Galleano, Pechanova & G Fraga, 2010, Quiñones, Muguerza, Miguel & Aleixandre, 2011). In addition, activation of the deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (Li, Xia & Förstermann, 2012, Mattagajasingh et al., 2007, Wallerath et al., 2002, Zhang et al., 2008) have also been proposed to explain the cardiovascular effects of polyphenols. The effects of polyphenols could also be attributed to the induction of antioxidant enzymes in cardiovascular tissues and the increased expression of γ -glutamylcysteine synthetase, the rate-limiting enzyme for glutathione synthesis (Cao & Li, 2004, Li, Xia & Förstermann, 2012, Li, Cao & Zhu, 2006). In this study, the administration of 375 mg/kg GSPE increased liver GSH, although the levels of MDA, a biomarker of lipid peroxidation, were similar in both the GSPE-treated and untreated (water-treated) groups of SHR. Nevertheless, the rapid increase in hepatic GSH, observed only 6 hours post-administration in the GSPE group of SHR, is an important result as this antioxidant molecule plays a protective role against oxidative stress and free radical damage.

Other mechanisms, such as the inhibition of ACE activity, could also explain the antihypertensive effect of GSPE. ACE plays a key role in the regulation of arterial blood pressure and procyanidins can decrease both *in vitro* (Actis-Goretta, Ottaviani, Keen & Fraga, 2003, Ottaviani, Actis-Goretta, Villordo & Fraga, 2006) and *in vivo* ACE activity (Quiñones, Miguel, Muguerza & Aleixandre, 2011). Although our research group has previously shown that

GSPE inhibited *in vitro* ACE activity (Guerrero et al., 2012), plasma ACE activity in the GSPE-treated SHR in the present study was very similar to the corresponding value in untreated SHR. These results could be explained by the short period of time that had elapsed after GSPE administration, which was potentially insufficient to allow the observation of changes in the activity of this enzyme.

This study demonstrates the antihypertensive effect of GSPE in SHR but not in normotensive Wistar-Kyoto rats, establishing the specific effects of GSPE on the hypertensive condition.

5. Conclusion

In conclusion, GSPE could be a potential antihypertensive ingredient for functional foods, and the improvement of oxidative stress may be one of the mechanisms involved in its beneficial effects on arterial blood pressure. Nevertheless, additional research is needed to determine the real clinical value of GSPE. Being hypertension a chronic pathology that needs chronic treatment, future studies are in particular needed to study the long-term effect of this extract, but we believe also recommendable to better clarify the mechanisms involved in its antihypertensive effect.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (AGL 2008-00387/ALI) and the Universitat Rovira i Virgili-Banco Santander (2011 LINE-12).

References

- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., & Fraga, C. G. (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 229-234.
- Actis-Goretta, L., Ottaviani, J. I., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2003). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS letters*, 555(3), 597-600.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1), 75-81.
- Andriambeloson, E., Kleschyov, A. L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J. C., & Andriantsitohaina, R. (1997). Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *British journal of pharmacology*, 120(6), 1053-1058.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro*, 18(5), 555-561.
- Barona, J.; Aristizabal, J.C.; Blesso, C.N.; Volek, J.S.; Fernandez, M.L. (2012). Grape Polyphenols Reduce Blood Pressure and Increase Flow-Mediated Vasodilation in Men with Metabolic Syndrome. *Journal of Nutrition*, 142(9), 1626-1632.
- Barreiro-Hurlé, J., Colombo, S., & Cantos-Villar, E. (2008). Is there a market for functional wines? Consumer preferences and willingness to pay for resveratrol-enriched red wine. *Food Quality and Preference*, 19(4), 360-371.
- Buijsse, B., Feskens, E. J. M., Kok, F. J., & Kromhout, D. (2006). Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine*, 166(4), 411.
- Buñag, R. D. (1973). Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of applied physiology*, 34(2), 279-282.
- Bunea, C. I., Pop, N., Babeş, A. C., Matea, C., Dulf, F. V., & Bunea, A. (2012). Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (*Vitis vinifera*) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 66.

Cao, Z., & Li, Y. (2004). Protecting against peroxynitrite-mediated cytotoxicity in vascular smooth muscle cells via upregulating endogenous glutathione biosynthesis by 3H-1, 2-dithiole-3-thione. *Cardiovascular Toxicology*, 4(4), 339-353.

Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., & Wright, J. T. (2003). Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*, 42(6), 1206-1252.

Cienfuegos-Jovellanos, E., Quiñones, M. M., Muguera, B., Moulay, L., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2009). Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6156-6162.

Corrales, M., García, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90(4), 415-421.

Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 569-590.

Del Bas, J. M., Fernández-Larrea, J., Blay, M., Ardèvol, A., Salvadó, M. J., Arola, L., & Bladé, C. (2005). Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *The FASEB journal*, 19(3), 479-481.

Del Rio, D., Mateos, A. M. R., Spencer, J. P. E., Massimiliano, T., Borges, G., & Crozier, A. (2012). Dietary (Poly) phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 00, 000-000.

Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular research*, 63(4), 593-602.

Diebolt, M., Bucher, B., & Andriantsitohaina, R. (2001). Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension*, 38(2), 159-165.

Dong, J., Xu, X., Liang, Y., Head, R., & Bennett, L. (2011). Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by polyphenols from tea (*Camellia sinensis*) and links to processing method. *Food Funct.*, 2(6), 310-319.

Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., & Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: a review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 257-268.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1768-1774.

Duffy, S. J., Keaney Jr, J. F., Holbrook, M., Gokce, N., Swerdloff, P. L., Frei, B., & Vita, J. A. (2001). Short-and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104(2), 151-156.

Fisher, N. D. L., Hughes, M., Gerhard-Herman, M., & Hollenberg, N. K. (2003). Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of hypertension*, 21(12), 2281.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*, 134(4), 980S-988S.

Flammer, A. J., Hermann, F., Sudano, I., Spieker, L., Hermann, M., Cooper, K. A., Serafini, M., Lüscher, T. F., Ruschitzka, F., & Noll, G. (2007). Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation*, 116(21), 2376-2382.

Flechtner-Mors, M., Biesalski, H., Jenkinson, C., Adler, G., & Ditschuneit, H. (2004). Effects of moderate consumption of white wine on weight loss in overweight and obese subjects. *International journal of obesity*, 28(11), 1420-1426.

Frankel, E., German, J., Kinsella, J., Parks, E., & Kanner, J. (1993). Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, 341(8843), 454-457.

Galleano, M., Pechanova, O., & G Fraga, C. (2010). Hypertension, nitric oxide, oxidants, and dietary plant polyphenols. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(8), 837-848.

Gollucke, A. P. (2010). Recent applications of grape polyphenols in foods, beverages and supplements. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 2(2), 105-109.

Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Romero, M., O'Valle, F., Lopez-Sepulveda, R., Quintela, A. M., Galindo, P., Zarzuelo, M. J., & Bailón, E. (2011a). Chronic (J)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide deficient rats. *British Journal of Nutrition*, 106, 1337-1348.

Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Zarzuelo, M. J., Galindo, P., Quintela, A. M., López-Sepúlveda, R., Romero, M., Tamargo, J., & Vargas, F. (2011b). Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function and decreases oxidative stress, Endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*.

Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., & Muguerza, B. (2012). Inhibition of antiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-activity relationship studies. *PlosONE [in press]*.

Hansen, A. S., Marckmann, P., Dragsted, L., Nielsen, I. L. F., Nielsen, S., & Grønbaek, M. (2005). Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *European journal of clinical nutrition*, 59(3), 449-455.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.

Jang, J. H., & Lee, J. S. (2011). Antihypertensive Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity and Antioxidant Activity of Vitis hybrid-Vitis coignetiae Red Wine Made with Saccharomyces cerevisiae. *Mycobiology*, 39(2), 137-139.

Kamencic, H., Lyon, A., Paterson, P. G., & Juurlink, B. H. J. (2000). Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*, 286(1), 35-37.

Kitiyakara, C., & Wilcox, C. S. (1998). Antioxidants for hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 7(5), 531.

Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benyache, F., Leghouchi, E., & Bousseboua, H. (2006). The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxydant effect and flavonoids concentration. *Therapie*, 61(4), 347-355.

Li, H., Xia, N., & Förstermann, U. (2012). Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. *Nitric Oxide*.

Li, Y., Cao, Z., & Zhu, H. (2006). Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacological research*, 53(1), 6-15.

Liang, Z., Yang, Y., Cheng, L., & Zhong, G. Y. (2012). Characterization of polyphenolic metabolites in the seeds of *Vitis* germplasm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Liang, Z., Sang, M., Fan, P., Wu, B., Wang, L., Duan, W., & Li, S. (2011). Changes of Polyphenols, Sugars, and Organic Acid in 5 *Vitis* Genotypes during Berry Ripening. *Journal of Food Science*, 76(9), C1231-C1238.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A. M., Kjeldsen, S. E., & Laurent, S. (2007). 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of hypertension*, 25(6), 1105.

Mane, C., Loonis, M., Juhel, C., Dufour, C., & Malien-Aubert, C. (2011). Food grade lingonberry extract: polyphenolic composition and in vivo protective effect against oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 3330-3339. Manso, M. A., Miguel, M., Even, J., Hernández, R., Aleixandre, A., & López-Fandiño, R. (2008). Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 109(2), 361-367.

Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Álvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J. V., García-Redondo, L., Esteban, V., Redondo, J. M., & Alonso, M. J. (2012). Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*(ja).

Mattagajasingh, I., Kim, C. S., Naqvi, A., Yamamori, T., Hoffman, T. A., Jung, S. B., DeRicco, J., Kasuno, K., & Irani, K. (2007). SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(37), 14855.

Messerli, F. H., Williams, B., & Ritz, E. (2007). Essential hypertension. *The Lancet*, 370(9587), 591-603.

Miguel, M., Alonso, M. J., Salaices, M., Alexandre, A., & López-Fandiño, R. (2007). Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. *Food Chemistry*, 104(1), 163-168.

Moura, R. S., Viana, F., Souza, M., Kovary, K., Guedes, D., Oliveira, E., Rubenich, L., Carvalho, L., Oliveira, R., & Tano, T. (2002). Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54(11), 1515-1520.

Mukai, Y., & Sato, S. (2009). Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(7), 491-497.

Nakamura, Y., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2003). Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *Journal of Health Science*, 49(1), 45-54.

Okamoto, K., & Aoki, K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*, 27(3), 282-293.

Ottaviani, J. I., Actis-Goretta, L., Villordo, J. J., & Fraga, C. G. (2006). Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie*, 88(3), 359-365.

Park, Y. K., Kim, J. S., & Kang, M. H. (2004). Concord grape juice supplementation reduces blood pressure in Korean hypertensive men: Double blind, placebo controlled intervention trial. *Biofactors*, 22(1-4), 145-147.

Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5497-5503.

Peng, N., Clark, J. T., Prasain, J., Kim, H., White, C. R., & Wyss, J. M. (2005). Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(3), R771-R775.

Pinent, M., Blade, M., Salvado, M., Arola, L., Hackl, H., Quackenbush, J., Trajanoski, Z., & Ardevol, A. (2005). Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *International journal of obesity*, 29(8), 934-941.

Pinent, M., Blay, M., Blade, M., Salvado, M., Arola, L., & Ardevol, A. (2004). Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*, 145(11), 4985-4990.

Puiggròs, F., Llópiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, M. J. (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 6080-6086.

Quiñones, M., Miguel, M., Muguerza, B., & Aleixandre, A. (2011). Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.*, 2(11), 649-653.

Quiñones, M., Muguerza, B., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2011). Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research*.

Quiñones, M., Sánchez, D., Muguerza, B., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2011). Mechanisms for antihypertensive effect of CoccoanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 44(5), 1203-1208.

Ramiro-Puig, E., Urpí-Sardà, M., Pérez-Cano, F. J., Franch, À., Castellote, C., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., & Castell, M. (2007). Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6431-6438.

Rein, D., Lotito, S., Holt, R. R., Keen, C. L., Schmitz, H. H., & Fraga, C. G. (2000). Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of nutrition*, 130(8), 2109S-2114S.

Rodrigo, R., González, J., & Paoletto, F. (2011). The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertension Research*, 34(4), 431-440.

Rodriguez-Martinez, M., & Ruiz-Torres, A. (1992). Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mechanisms of ageing and development*, 66(2), 213-222.

Sarr, M., Chataigneau, M., Martins, S., Schott, C., El Bedoui, J., Oak, M. H., Muller, B., Chataigneau, T., & Schini-Kerth, V. B. (2006). Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research*, 71(4), 794-802.

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 215S-217S.

Schieber, A., Stintzing, F., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds--recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 401-413.

Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H., & Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4), 1024-1029.

Schulz, E., Gori, T., & Münzel, T. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertension Research*, 34(6), 665-673.

Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., De Santis, S., & Crozier, A. (2003). Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, 424(6952), 1013.

Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33(6), 469-474.

Singleton, V. L. (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advances in Food Research*, 27, 149-242.

Singleton, V. L., & Esau, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in food research. Supplement*, 1, 1-261.

Stein, J. H., Keevil, J. G., Wiebe, D. A., Aeschlimann, S., & Folts, J. D. (1999). Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 100(10), 1050-1055.

Suárez, M., Romero, M. P., Ramo, T., Macià, A., & Motilva, M. J. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1463-1472.

Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., & Schömig, E. (2007). Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 298(1), 49-60.

Terra, X., Pallarés, V., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., & Blay, M. (2011). Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(4), 380-387.

Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, Á., Cerdá, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., & Ibarra, A. (2007). A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3926-3935.

Turnbull, F., Neal, B., Algert, C., Chalmers, J., Woodward, M., MacMahon, S., Baigent, C., Cutler, J., Fagard, R., & Whelton, P. (2003). Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*, 362(9395), 1527-1535.

Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., & Förstermann, U. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine,

enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(13), 1652-1658.

Williamson, G., & Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 243S-255S.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 622-646.

Yamamoto, M., Suzuki, A., & Hase, T. (2008). Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 54(1), 95-98.

Yang, J., Martinson, T. E., & Liu, R. H. (2009). Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry*, 116(1), 332-339.

Yang, Y., & Chien, M. (2000). Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3990-3996.

Zenebe, W., Pechanova, O., & Andriantsitohaina, R. (2003). Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res*, 52(4), 425-432.

Zhang, Q., Wang, Z., Chen, H., Zhou, S., Zheng, W., Liu, G., Wei, Y., Cai, H., Liu, D., & Liang, C. (2008). Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovascular research*, 80(2), 191-199.

Figure legends

Figure 1. UV-detected (280 nm) and extracted ion chromatograms (LC-TOF) of phenolic compounds from GSPE extract: (A) the HPLC-UV chromatogram of the GSPE extract at a wavelength of 280 nm and (B) the extracted ion chromatogram of the compounds included in Table 1. The results are presented as the means of three replicates, and the values in Table 1 are expressed as mg compound/g of fresh extract using the calibration curves of commercial standards. See Table 1 for codification of the peak numbers.

Figure 2. Decrease in systolic blood pressure (SBP) (A) and diastolic blood pressure (DBP) (B) caused in spontaneously hypertensive rats after the administration of water (○), Captopril (50 mg/kg) (□) or different doses of GSPE: 250 mg/kg (▲), 375 mg/kg (◆), 500 mg/kg (■). Data are expressed as the mean ± SEM. All of the experimental groups include a minimum of 8 animals. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$). p was estimated by two-way ANOVA.

Figure 3. Decrease in systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) in Wistar-Kyoto rats after administration of water (○) or 375 mg/kg GSPE (◆). Data are expressed as the mean ± SEM. Both experimental groups have a minimum of 6 animals. No significant differences were observed.

Figure 4. Histograms of (A) liver malondialdehyde (MDA), (B) liver reduced glutathione and (C) plasma angiotensin-converting enzyme activity (ACE) in spontaneously hypertensive rats 6 hours after administration of 375 mg/kg GSPE (■) or water (□). Data are expressed as the mean ± SEM. The experimental groups include a minimum of 7 animals. Different letters represent significant differences ($p < 0.05$). p was estimated by one-way ANOVA.

Table 1. Individual phenolic compounds of GSPE (flavanols and phenolic acids) by reverse-phase HPLC-MS. Values are expressed as mg compound/g extract and are means of 3 samples.

Number	Phenolic compound	[M-H]-	Calibration curve	Total amount (mg/g)
1	Gallic acid	1.690.136	y = 501094x	17.7 ± 2.0
2	Protocatechuic acid	1.530.187	y = 1370971.97x	1.0 ± 0.1
3	Vanillic acid	1.670.342	y = 553787x	0.1 ± 0.0
4, 6, 8, 13, 17	Procyanidin dimer ^a	5.771.346	y = 250456x	144.2 ± 32.2
5	Catechin	2.890.712	y = 494478x	90.7 ± 7.6
7	Epicatechin	2.890.712	y = 556794x	55.0 ± 0.8
9	p-coumaric acid	1.630.395	y = 1943720.52x	0.1 ± 0.0
10, 14, 16, 20, 23	Dimer gallate ^a	7.291.455	y = 250456x	39.7 ± 7.1
11	Epigallocatechin gallate	4.570.770	y = 136996x	0.4 ± 0.1
12	Procyanidin trimer ^a	8.651.979	y = 250456x	28.4 ± 2.0
15	Procyanidin tetramer ^a	11.532.613	y = 250456x	2.0 ± 0.2
18	Epicatechin gallate ^b	4.410.821	y = 556794x	55.3 ± 1.5
19	Quercetin-3-O-galactoside	4.630.877	y = 453509x	0.2 ± 0.0
21	Naringenin-7-glucoside	4.331.135	y = 188637x	0.1 ± 0.0
22	Kaempferol-3-glucoside	4.470.927	y = 489454x	0.1 ± 0.0
24	Quercetin	3.010.348	y = 704090x	0.3 ± 0.0

^a Quantified using the calibration curve of procyanidin B2.

^b Quantified using the calibration curve of epigallocatechin gallate.

Figure 1.

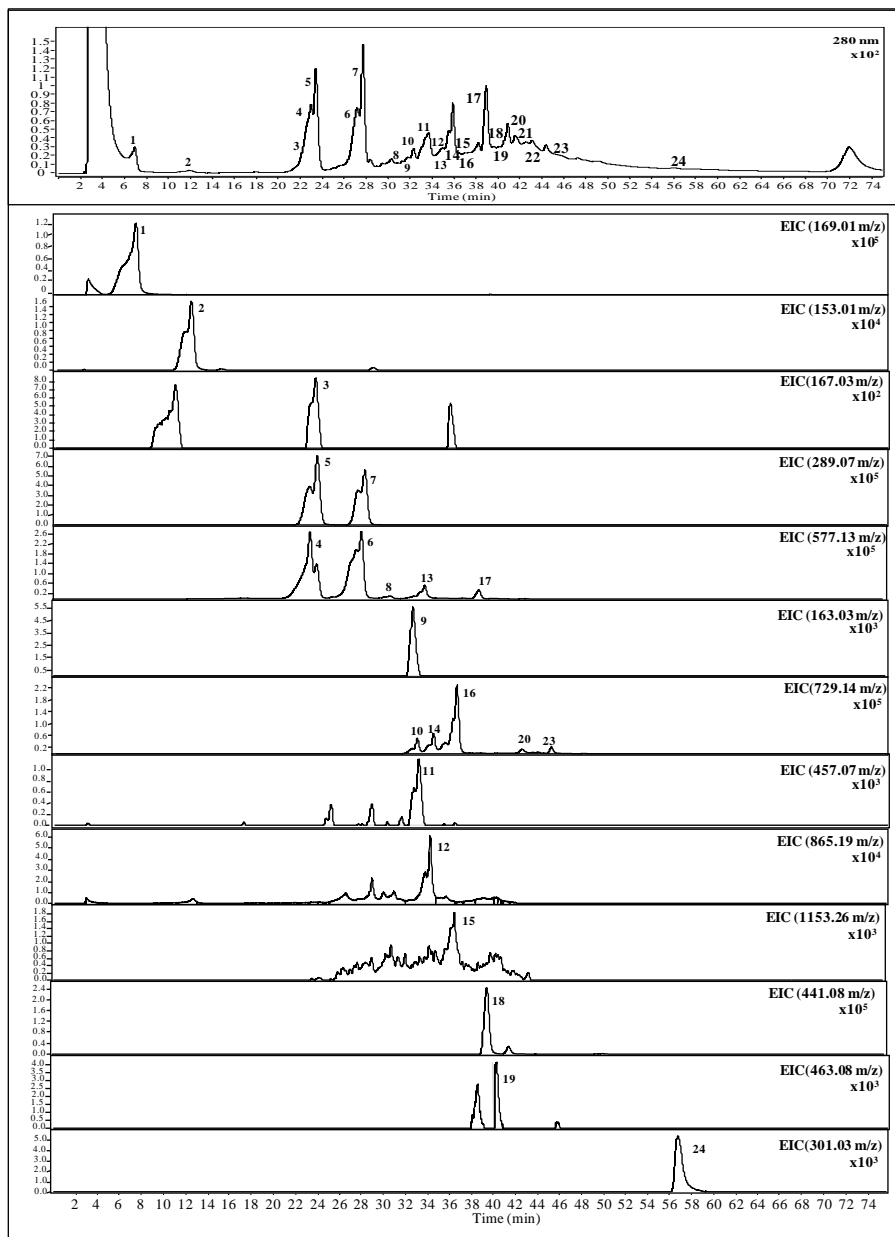


Figure 2.

A.

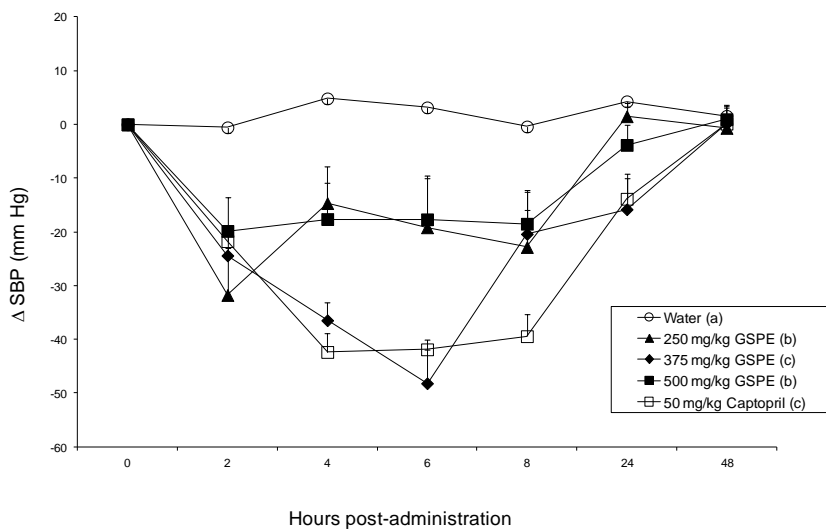


Figure 2.

B.

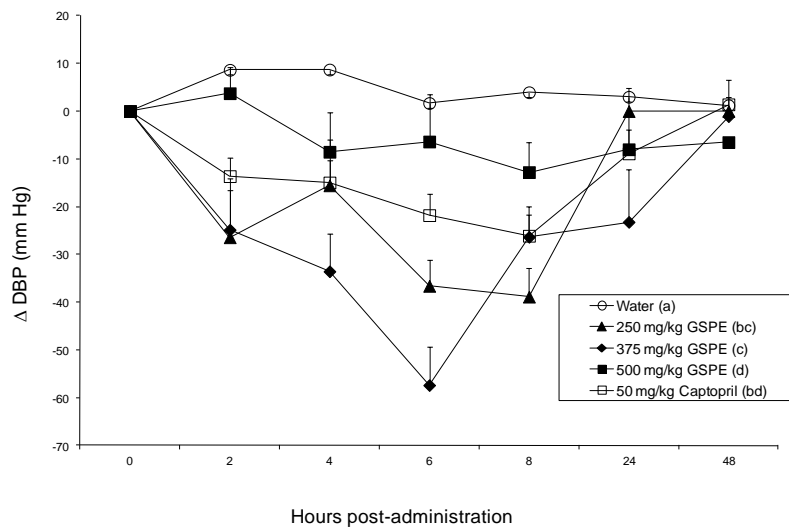


Figure 3.

A.

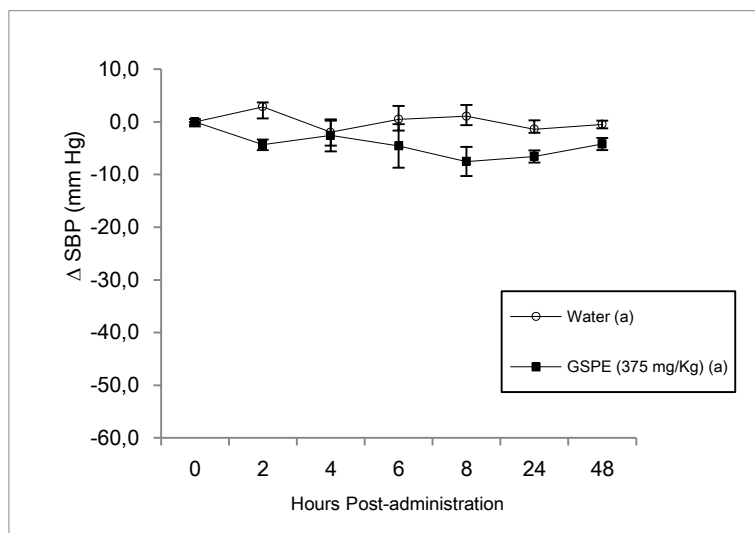


Figure 3.

B.

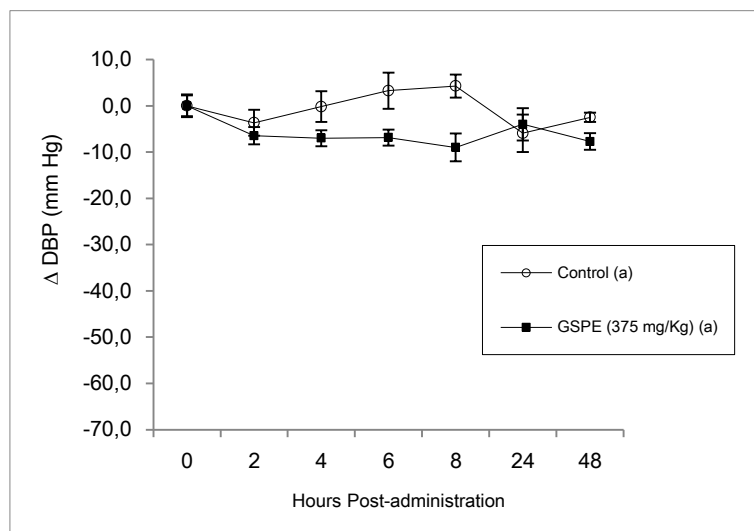


Figure 4.

A.

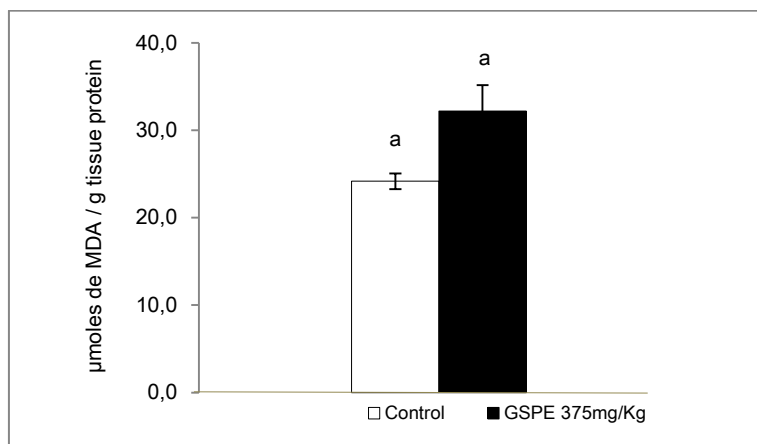


Figure 4.

B,

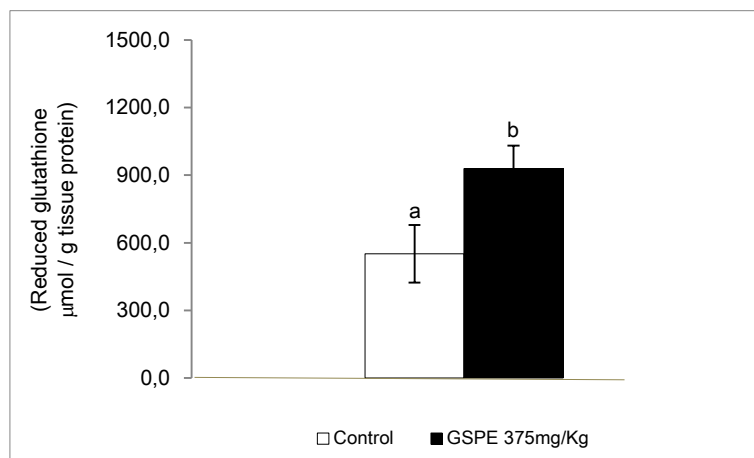
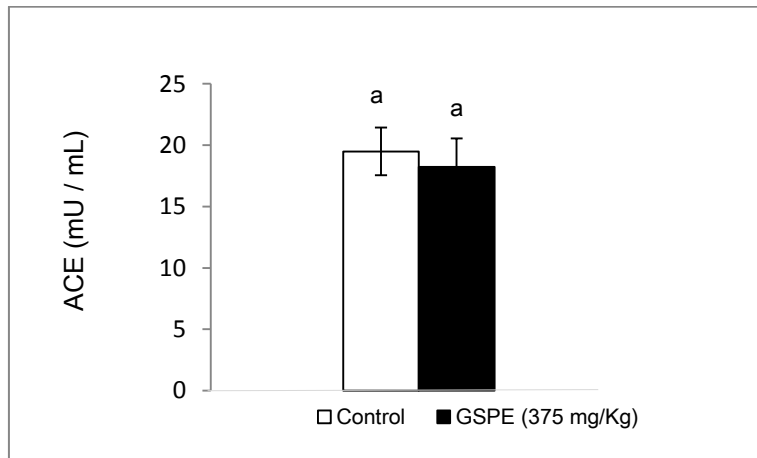


Figure 4.

C,



MANUSCRITO 4

Endothelial factor involvement in the antihypertensive
effect of a grape seed procyanidin extract in spontaneously
hypertensive rats

Quiñones M, Guerrero L, S. Fernández Vallinasa S, Pons
Z, Arola L, Aleixandre A, and Mugerza B

Enviado para su publicación

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

**Endothelial factor involvement in the antihypertensive effect of a grape seed
procyanidin extract in spontaneously hypertensive rats**

Quiñones M[†], Guerrero L^{†#}, S. Fernández Vallinasa S[‡], Pons Z[†], Arola L^{†§},
Aleixandre A[‡], and Muguera B^{†§*}.

[†] Department of Biochemistry and Biotechnology, Rovira i Virgili University,
Tarragona, Spain.

[#] Department of Research, Nutrition and Innovation, ALPINA S.A, Bogotá,
Colombia.

[‡] Department of Pharmacology, Complutense University, Madrid, Spain.

[§] Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS), TECNIO, CEICS, Catalonia,
Spain

Running title: The antihypertensive mechanism of a grape seed procyanidin
extract

*Dra. Begoña Muguera

Dpto. Bioquímica y Biotecnología, U. Rovira i Virgili, C/ Marcel·li Domingo s/n
43007 Tarragona, Spain. Centre Tecnològic de Nutrició i Salut (CTNS)
(TECNIO), Avda. Universitat, 1 43204 Reus, Spain.

Telephone: 34-977 55 9566

Fax: 34-977 55 8232

E-mail: begona.muguera@urv.cat

Abstract

The grape seed procyanidins are known to exert beneficial effects on health. Our research group has previously demonstrated the short-term antihypertensive effect of a grape seed procyanidin-rich extract (GSPE) in spontaneously hypertensive rats (SHRs). The aim of this study was to discern the involvement of endothelial vasodilatory factors in combating hypertension.

Thirty 17-20-week-old male SHRs were used, and 2 groups of 15 animals were administered water or 375 mg/kg GSPE by intragastric gavage. Both groups were divided into 3 subgroups (n=5) that were intraperitoneally treated with 1 mL of saline, 30 mg/kg N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (an inhibitor of nitric oxide (NO) synthesis), or 5 mg/kg indomethacin (an inhibitor of prostacyclin synthesis). Rat systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were recorded before and 6 hours after oral administration. Additional trials were conducted by administering water or 375 mg/kg GSPE to two different groups of 22-week-old SHRs, which were sacrificed by decapitation 6 hours post-treatment. The plasma concentration of 6-keto prostaglandin F_{1α} (PGF_{1α}), a stable metabolite of prostacyclin, was evaluated. In addition, we used different preparations of aorta rings from the untreated SHRs to evaluate the relaxation caused by GSPE.

GSPE caused a significant decrease in the SBP (-35.68 ± 5.39 mm Hg; $p < 0.05$) and DBP (-34.52 ± 5.45 mm Hg; $p < 0.05$). L-NAME caused a clear increase in both the SBP ($+15.77 \pm 4.09$ mm Hg; $p < 0.05$) and DBP ($+10.21 \pm 1.62$ mm Hg; $p < 0.05$) in water-treated rats. The antihypertensive effect of GSPE was completely abolished by an intraperitoneal injection of L-NAME, and the animals that were treated with both compounds experienced an increase in their SBP ($+5.67 \pm 5.94$ mm Hg; $p < 0.05$) and DBP ($+11.13 \pm 5.19$ mm Hg; $p < 0.05$). The antihypertensive effect of GSPE was also partially inhibited when the rats were treated with 5 mg/kg indomethacin, and the animals that received both compounds had slight decreases in their SBP (-12.13 ± 3.69 mm Hg; $p < 0.05$) and DBP (-12.44 ± 5.15 mm Hg; $p < 0.05$). In addition, plasma PGF_{1α} was increased in the GSPE-treated rats. Finally, the grape seed extract relaxed the intact aorta preparations but did not relax the endothelium-denuded aorta rings

from the untreated SHR. L-NAME inhibited the relaxation caused by GSPE in the SHR aorta rings, but indomethacin did not.

We postulate that the antihypertensive effect of GSPE on SHRs is endothelium dependent, and it could be primarily mediated by changes in endothelium-derived NO bioavailability. Our results suggest that GSPE affects endothelial NO synthesis in these animals. Nevertheless, our results indicate that the release of endothelial prostacyclin could also contribute to the effect of grape seed extract on arterial blood pressure.

Key words: Grape seed procyanidin extract; Nitric oxide; Polyphenols; Prostacyclin, Spontaneously hypertensive rats.

1. Introduction

Endothelial tissue regulates vascular tone and exerts finely tuned control over cardiovascular homeostasis, with nitric oxide (NO) being one of the best characterised vasodilator endothelial factors. NO is synthesised in the endothelial cells by a Ca^{2+} -dependent constitutive isoform of the enzyme NO synthase (eNOS), which can be up-regulated by an elevation in arterial blood pressure or by the presence of insulin or hormones such as adiponectin, oestrogens or thyroid hormone [1]. In fact, the inhibition of eNOS synthesis will increase blood pressure, as has been previously demonstrated in animal experimental models [2]. The diet is also an important factor in the up-regulation of eNOS. It is known that flavonoid consumption potentiates NO endothelium-dependent relaxation [3-8].

Prostaglandin I₂ (PGI₂), which is known as prostacyclin, is also an important vasodilator endothelial factor. PGI₂ is synthesised in the endothelial cells by cyclooxygenase 2, and this prostaglandin also plays an important role in limiting platelet-mediated thrombosis because it is also a potent inhibitor of platelet aggregation. Previous studies have suggested that a decrease in arterial blood pressure was caused by procyanidins and could be mediated at least in part by endothelial vascular relaxing factors [9,10].

We have evaluated the effects of grape seed procyanidin extract (GSPE), which has a proven antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats (SHRs), in animals that had been alternatively treated with N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of NO synthesis, or with indomethacin, an inhibitor of prostacyclin synthesis. Plasma PGI₂ concentrations were evaluated in GSPE-administered rats. We also studied the involvement of endothelial factors on the vasorelaxing effect of GSPE in the aorta rings of untreated SHRs.

2. Materials and Methods

2.1. Products

The procyanidin extract that was used in this study (GSPE) was obtained from grape seeds by Les Dériveés Résiniques et Terpéniques, Dax, France.

This extract has been previously characterized and their antihypertensive properties were proven in SHR [11].

N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and indomethacin were purchased from Sigma (Barcelona, Spain).

2.2. Experimental Procedure in Rats

Thirty 17-20-week-old male SHRs with an average weight of 319.07 ± 2.38 g were used for the *in vivo* experiments. All these animals were obtained from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain). The rats were maintained at a temperature of 22 °C in 12-hour light/dark cycles. They received tap water and a standard diet (A04 Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum* during the experiments and were divided into two groups that were administered distilled water or 375 mg/kg of GSPE dissolved in distilled water by gastric intubation between 9 and 10 am. The total orally administered volume was always 1 mL, whether it was water or GSPE water solution. Four hours after oral administration, 5 of the animals from each group were given 1 mL intraperitoneal saline, 30 mg/kg of L-NAME dissolved in 1 mL of saline or 5 mg/kg indomethacin dissolved in 1 mL of saline. Rat systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were taken by the tail cuff method before the initial oral administration and again at 6 hours afterwards. The rats were kept at 38°C for 10 minutes before the measurement to detect the pulse of the tail artery. The original method for measuring arterial blood pressure using the tail cuff provides only SBP values [12], but the equipment used in this study, an LE 5001 (Letica, Spain), has a high sensitivity pulse transducer coupled with an accurate microprocessor program, which allowed us to distinguish between the SBP and the DBP. Five measurements were averaged to establish the values of the SBP and DBP. All measurements were taken by the same person in the same peaceful environment to minimise stress-induced variations in blood pressure. Moreover, to guarantee the reliability of the measurements, we established a training period of two weeks before the actual trial time, and the rats became accustomed to the procedure during this period.

Additionally, fifteen 22-week-old SHR_s were sacrificed by decapitation after overnight fasting. Eight of them were treated with 375 mg/kg GSPE 6 hours before being sacrificed, and the remaining animals (seven) were given water 6 hours before being sacrificed. The GSPE and water were orally administered by gastric intubation between 9 and 10 am. Blood samples were collected from the sacrificed rats to quantify 6-keto prostaglandin F₁α (PGF₁α, a stable metabolite of PGI₂). The procedures that were used to evaluate all of these parameters are described below.

2.3. Prostacyclin determination

Blood samples from the sacrificed animals were collected in tubes containing the anticoagulant lithium heparin. These samples were centrifuged at 2000 g for 15 minutes at 4°C to obtain the plasma, which was divided into aliquots and stored at -80°C until the analysis. We measured the concentration of 6-keto prostaglandin F₁α (PGF₁α, a stable metabolite of PGI₂), by using a 6-keto prostaglandin F₁α EIA (enzyme immunoassay) kit (Cayman Chemical Company, Tallinn, Estonia). The results are expressed as pg/mL of PGF₁α.

2.4. Experiments in aorta rings

We used 17-22-week-old SHR_s for these experiments. The animals were sacrificed by decapitation. The thorax was opened, and the aorta was rapidly excised from the aortic arch to the diaphragm. Excess fat and connective tissue were removed from the aorta, and the tissue was cut into rings (approximately 4 mm in length). The aortic rings were mounted between two steel hooks in isolated tissue chambers containing Krebs-Henseleit solution with the following composition (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; and glucose, 10.0. The medium was maintained at 37°C and was continuously bubbled with a 95% O₂ and 5% CO₂ mixture with a pH of 7.4. An optimal resting tension of 2 g was applied to all the aortic segments. This tension was adjusted every 15 min during a 60-90 min equilibration period before adding the drugs. The isometric tension was recorded by using an

isometric force displacement transducer connected to an acquisition system (Protos 5, Panlab, Spain). After the equilibration period, the rings were contracted with 80 mM KCl to assess their functionality, and when the contraction had reached a steady state (approximately 15 min after administration), the preparations were washed until their basal tension was recovered. The rings were then exposed to 10^{-6} M methoxamine, and GSPE dose-response curves (10^{-6} - 10^{-1} mg/mL) were performed in the methoxamine-precontracted rings. Relaxant responses to GSPE are expressed as a percentage of the precontraction induced by methoxamine. The previously described procedure was applied to intact and endothelium-denuded tissue. It was also applied to another two groups of intact preparations; one with the addition of N^W-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10^{-4} M), and the other with the addition of indomethacin (10^{-5} M). Both drugs were added to the organ bath 30 minutes before methoxamine administration. The denuded endothelium preparations were prepared by gently rubbing the tissue before it was cut into rings. The efficacy of the procedure that was used to remove the endothelial cells was judged by the loss of acetylcholine-induced relaxation when the aorta preparations were precontracted with methoxamine. According to a study by Furchgott in 1980, the endothelial cells are necessary for this response [13].

All the above-mentioned experiments were performed as authorised (European Directive 86/609/CEE and Royal Decree 223/1988 of the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food).

2.5 Statistical analysis

The blood pressure results are expressed as the mean values \pm the standard error of the mean (SEM), and they were analysed with a one-way analysis of variance (ANOVA) in GraphPad Prism software. The differences between the groups were assessed with the Bonferroni test. Plasma PGF 1α data are also expressed as the mean values \pm SEM, but they were analysed with Student's t-test. Finally, the aorta ring results are expressed as the mean values \pm SEM for at least 5 preparations and 5 animals. P values were estimated with a two-way ANOVA (Bonferroni Test).

Differences between the means were always considered to be significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of GSPE on blood pressure in SHR that were pretreated with N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and indomethacin

The initial values of SBP and DBP in the SHR were 201.99 ± 4.18 mm Hg and 181.22 ± 1.91 mm Hg, respectively. As expected, the rats that only received water or saline did not experience changes in their SBP and DBP, but the administration of 375 mg/kg GSPE caused a significant decrease in the SBP (-35.68 ± 5.39 mmHg; $p < 0.05$) and DBP (-34.52 ± 5.45 mm Hg; $p < 0.05$). These decreases were evident 6 hours post-GSPE administration and are represented in Figure 1. Figure 1 also shows that 30 mg of L-NAME caused a clear increase in the SBP ($+15.77 \pm 4.09$ mm Hg; $p < 0.05$) and DBP ($+10.21 \pm 1.62$ mm Hg; $p < 0.05$) of the rats. The L-NAME effect was clearly evident two hours after the intraperitoneal administration of this arginine derivative. In addition, the GSPE effect was not observed when the rats were treated four hours later with 30 mg/kg L-NAME. In fact, the antihypertensive effect of GSPE was completely abolished by the intraperitoneal injection of this arginine derivative, and the animals that received GSPE and L-NAME had increased SBP ($+5.67 \pm 5.94$ mm Hg; $p < 0.05$) and DBP values ($+11.13 \pm 5.19$ mm Hg; $p < 0.05$), as shown in Figures 1A and 1B.

Figures 2A and 2B demonstrate that the antihypertensive effect of GSPE was also attenuated when the rats were treated with 5 mg/kg indomethacin four hours later, with SBP values of -12.13 ± 3.69 mm Hg ($p < 0.05$) and DBP values of -12.44 ± 5.15 mm Hg ($p < 0.05$). However, the intraperitoneal injection of this prostacyclin inhibitor did not modify arterial blood pressure in these animals in the group of rats that received water.

3.2. Effects of GSPE on plasma prostacyclin concentration

As Figure 3 shows, the 6-keto prostaglandin F1 α plasma levels in GSPE-treated rats were significantly higher (27.68 ± 6.1 pg/mL) than in the water-administered rats (13.28 ± 2.5 pg/mL).

3.3. Effects of GSPE in aorta rings

GSPE induced the dose-dependent relaxation of the intact aorta ring preparations from untreated SHR, but GSPE did not relax the endothelium-denuded aorta ring preparations from these animals. In addition, the relaxation caused by GSPE in the intact aorta ring preparations was completely abolished when the tissue had been exposed to 10^{-4} M L-NAME, mimicking the effect that was obtained in the endothelium-denuded aorta ring preparations. However, the presence of 10^{-5} M indomethacin in the bath solution did not modify the relaxations induced by GSPE in the aorta tissue (see Figure 4).

Discussion

The present study provides clear evidence for the participation of NO in the vasodilator and antihypertensive effects of GSPE. Our results are in accordance with the majority of available data, which support the idea that flavonoid-rich foods can improve NO release or NO availability in several animal models [14,15]. In previous studies, GSPE has been known to induce endothelium-dependent relaxation in rabbit aortic rings [16].

L-NAME is an *in vivo* and *in vitro* inhibitor of eNOS [17,18] and a clear increase in SBP and DBP was observed in the L-NAME-treated SHR of this study. The inhibition of basal NO synthesis by L-NAME in these animals could justify these results, but in order to fulfil the aim of the present study, the most important finding was the observed inhibition of the GSPE antihypertensive effect in the L-NAME-treated SHR. These results provide clear evidence that GSPE would facilitate NO release in the SHR. A previous study carried out by

Quiñones et al. (2011) [19] has already suggested that the blood pressure-lowering effect of procyanidin-rich cocoa powder was mediated through NO. These results agree with those described for other flavonoids such as quercetin [20] or resveratrol [21]. Edirisinghe (2008) also demonstrated that a GSPE endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta rings was mediated by eNOS phosphorylation through a redox-sensitive mechanism [16]. Moreover, other polyphenols such as epigallocatechin-3-gallate, delphinidin, resveratrol and procyanidins from grape skin have been reported to increase eNOS activation through a phosphorylation-mediated mechanism [22]. Recent reports indicate that (-)-epicatechin activates eNOS via serine 633 and serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation in endothelial cells [23].

The aorta ring preparation results corroborate the importance of NO in the vascular effects of GSPE and support our *in vivo* results with this extract. The effect of GSPE was, in fact, endothelium dependent because GSPE did not relax the endothelium-denuded aorta ring preparations from SHR. Moreover, the effect of GSPE on the aorta preparations was impaired when NOS was inhibited, and we were able to correlate the GSPE activity in this tissue with the increased release of NO.

The endothelium also secretes other vasodilator agents than NO such as PGI₂. In fact, PGI₂ was the first described endothelium-derived relaxing substance. This prostaglandin is produced by the cyclooxygenase enzyme (COX) and PGI₂ synthase [24], and it is the major product of arachidonic acid metabolism in the vascular endothelium. PGI₂ is continuously released into the circulation by the lungs to counter platelet aggregation from the release of thromboxane A₂. The importance of PGI₂ is therefore not in doubt, but at the present time, NO is considered to be the more important vasodilator endothelial factor. We have also evaluated the effect of GSPE in SHR that were intraperitoneally injected with indomethacin, an inhibitor of COX enzyme and endothelial prostanoid biosynthesis. Indomethacin treatment did not modify SBP and DBP in the SHR, but this compound partially abolished the GSPE antihypertensive effect (Figure 2). Some studies have shown an increase in the release of PGI₂ in procyanidin-treated human aortic endothelial cells [25] and increased the levels of prostacyclin in human plasma [25] and in the plasma of

rats that were fed a diet rich in procyanidins [26]. In our study, we have demonstrated an increased plasma concentration of PGF1 α in the GSPE-treated rats, and we know that PGF1 α is a stable metabolite of PGI $_2$. The rats that were treated with grape extract most likely also had increased plasma concentrations of PGI $_2$.

However, our results from the aorta ring preparations indicated that the vasodilator effect of GSPE in this tissue was not mediated by PGI $_2$. In fact, GSPE clearly relaxed the aorta tissue when the cyclooxygenase inhibitor indomethacin was present in the organ bath. Our *in vivo* and *in vitro* results are therefore not in accordance with results from our examination of the involvement of PGI $_2$ on the vascular effects of GSPE, but we should not forget that the aorta is a conduit artery and resistance arteries determine the arterial blood pressure more than the large vessels. Therefore, we believe that PGI $_2$ may be involved in the GSPE antihypertensive effect even if we could not demonstrate the involvement of this mediator in the extract effects within an actual artery. In any case, the vasodilator effect of PGI $_2$ could be a complementary that justifies the effect of this extract on the arterial blood pressure of SHRs.

Endothelial dysfunction could at least in part justify the increased arterial blood pressure of hypertensive subjects, and this study has demonstrated that the antihypertensive effect of GSPE in SHRs is an endothelium-dependent effect that is mainly mediated by changes in endothelium-derived NO bioavailability. The vasodilator effect of PGI $_2$ may also be involved in the antihypertensive effect of GSPE, but more studies are recommended to clarify the involvement of PGI $_2$ on the effects of this extract.

Acknowledgement

This study was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government (AGL 2008-00387/ALI) and the Universitat Rovira i Virgili-Banco Santander (2011 LINE-12).

References

- [1] Montagut, G., Baiges, I., Valls, J., Terra, X., et al. A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food Chem.* 2009, *116*,265-270.
- [2] Zhang, Q., Wang, Z., Chen, H., Zhou, S., et al. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc.Res.* 2008, *80*,191-199.
- [3] Egert, S., Rimbach, G. Which sources of flavonoids: complex diets or dietary supplements?. *Advances in Nutrition: An International Review Journal.* 2011, *2*,8-14.
- [4] Forester, S.C., Waterhouse, A.L. Metabolites are key to understanding health effects of wine polyphenolics. *J.Nutr.* 2009, *139*,1824S-1831S.
- [5] AE Hagerman, A.E. Chemistry of tannin-protein complexation - Chemistry and Significance of Condensed tannins, Plenum Press New York 1989,pp. 323-333.
- [6] Herrmann, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A.* 1988, *186*,1-5.
- [7] Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet.* 1997, *349*,699.
- [8] Serra, A., Macià, A., Romero, M.P., Reguant, J., et al. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem.* 2012, *130*,383-393.
- [9] Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?. *Am.J.Clin.Nutr.* 2004, *80*,15-21.
- [10] Taubert, D., Roesen, R., Lehmann, C., Jung, N., Schömig, E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide. *JAMA.* 2007, *298*,49-60.

[11] Quiñones, M., Guerrero, L., Suarez, M., Pons, Z., et al. Low-molecular procyanidin rich grape seed extract exert antihypertensive effect in males spontaneously hypertensive rats (SHR). *Food Intent Res.* 2013, [in press].

[12] Buñag, R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J.Appl.Physiol.* 1973,34,279-282.

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

[14] Jiménez, R., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F. Epicatechin: Endothelial Function and Blood Pressure. *J.Agric.Food Chem.* 2012,60,8823.

[15] Quiñones, M., Sánchez, D., Muguerza, B., Miguel, M., Aleixandre, A. Mechanisms for antihypertensive effect of CocomanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Res.Int.* 2011,44,1203-1208.

[16] Dall'Asta, M., Calani, L., Tedeschi, M., Jechiu, L., et al. Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition.* 2012,28,197-203.

[17] Moncada, S., Palmer, R., Higgs, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 1991,43,109-142.

[18] Rees, D.D., Schulz, R., Hodson, H.F., Palmer, R., Moncada, Identification of some novel inhibitors of the vascular nitric oxide synthase in vivo and in vitro - Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Proceedings of a Symposium Held at the Royal Society, London, 14-15 September, Elsevier Amsterdam 1990,pp. 485-487.

[19] Quiñones, M., Muguerza, B., Miguel, M., Aleixandre, A. Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacological Research.* 2011,64,478-481.

[20] Gusman, J., Malonne, H., Atassi, G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis.* 2001,22,1111-1117.

[21] Gresele, P., Pignatelli, P., Guglielmini, G., Carnevale, R., et al. Resveratrol, at concentrations attainable with moderate wine consumption, stimulates human platelet nitric oxide production. *J.Nutr.* 2008, *138*,1602-1608.

[22] Auger, C., Chaabi, M., Anselm, E., Lobstein, A., Schini-Kerth, V.B. The red wine extract-induced activation of endothelial nitric oxide synthase is mediated by a great variety of polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, *54*,S171-S183.

[23] Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., Villarreal, F. (-)-Epicatechin Activation of Endothelial Cell Endothelial Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Related Signaling Pathways. *Hypertension.* 2010, *55*,1398-1405.

[24] Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: Structure-activity relationship studies. *PlosONE.* 2012 [in press].

[25] Schramm, D.D., Wang, J.F., Holt, R.R., Ensunsa, J.L., et al. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001, *73*,36-40.

[26] Maffei, R., Carini, M., Aldini, G., Berti, F., et al. Diet enriched with procyanidins enhances antioxidant activity and reduces myocardial post-ischaemic damage in rats. *Life Sciences.* 1999, *64*,627-642.

Figure legends

Figure 1. Changes in systolic blood pressure (SBP) (A) and diastolic blood pressure (DBP) (B) caused in spontaneously hypertensive rats after different treatments: water + saline (□), 375 mg/kg GSPE + saline (■), water + 30 mg/kg L-NAME (▣) or 375 mg/kg GSPE + 30 mg/kg L-NAME (◻). Data are expressed as the mean ± SEM. The experimental groups always had 7 animals each. Different letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$). P was estimated by one-way ANOVA.

Figure 2. Changes in systolic blood pressure (SBP) (A) and diastolic blood pressure (DBP) (B) caused in spontaneously hypertensive rats after different treatments: water + saline (□), 375 mg/kg GSPE + saline (■), water + 5 mg/kg indomethacin (▣) or 375 mg/kg GSPE + 5 mg/kg indomethacin (◻). Data are expressed as the mean ± SEM. The experimental groups always had 7 animals. Different letters represent statistically significant differences ($p < 0.05$). P was estimated by one-way ANOVA.

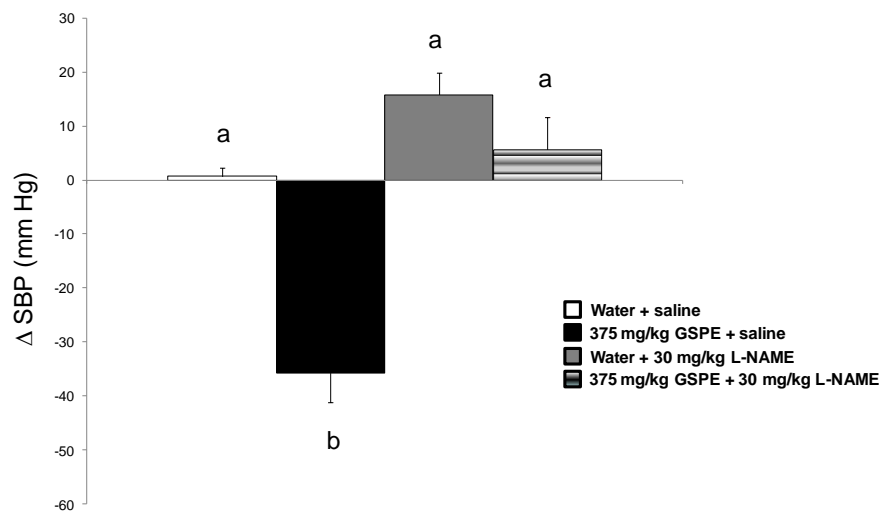
Figure 3. The plasma 6-keto prostaglandin F1 α (PGF1 α) concentration in spontaneously hypertensive rats treated with 375 mg/kg GSPE-treated SHR (■) or water (□). Data are expressed as the mean ± SEM. The experimental group had 8 animals and the water group had 7 animals. The results were analysed with Student's t test, and the differences between the means were considered significant when $p < 0.05$. The asterisk indicates statistically significant differences.

Figure 4. Grape Seed Procyanidin Extract (GSPE) relaxation in different aorta ring preparations from spontaneously hypertensive rats: intact (■), endothelium denuded (□), intact incubated with L-NAME (10^{-4} M) (▲), intact incubated with indomethacin (10^{-5} M) (●). The aorta rings were precontracted with 10^{-6} mol/L methoxamine. Data are the mean values ± SEM for at least 5 preparations with 5 animals per group. P was estimated by two-way ANOVA (Bonferroni Test), and we considered the difference to be significant when $P < 0.05$. Similar letters represent no statistically significant differences.

Resultados y Discusión

Figure 1

A.



B.

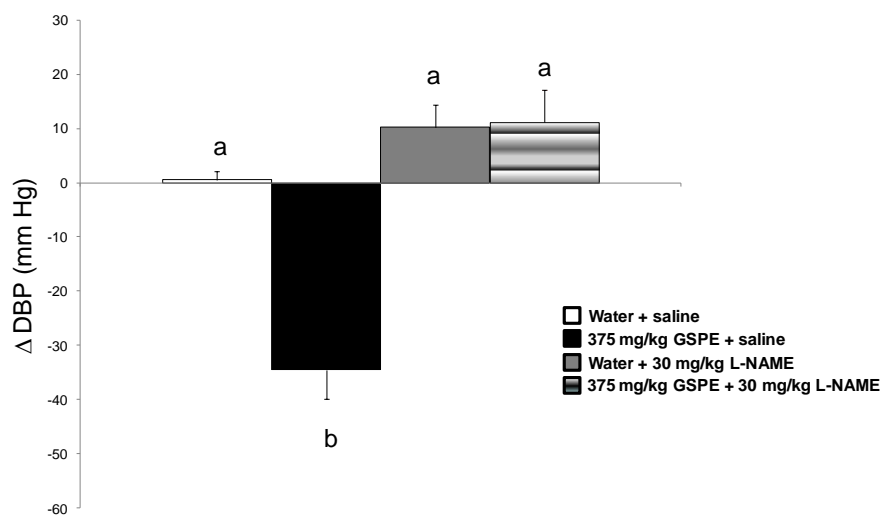


Figure 2

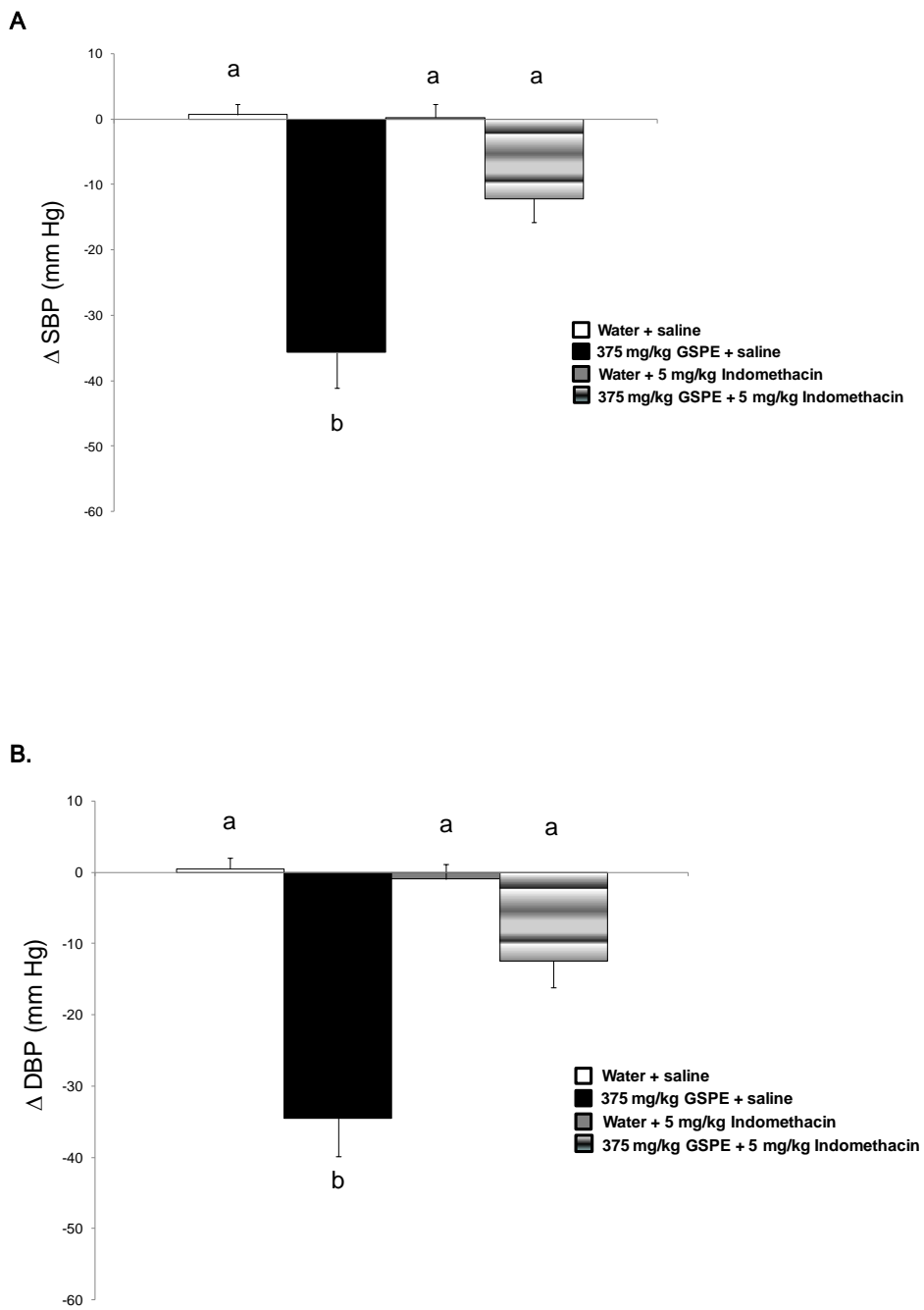


Figure 3

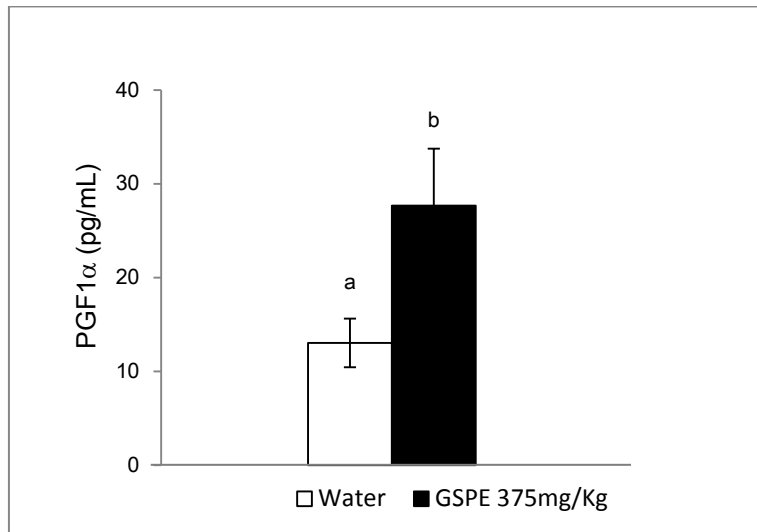
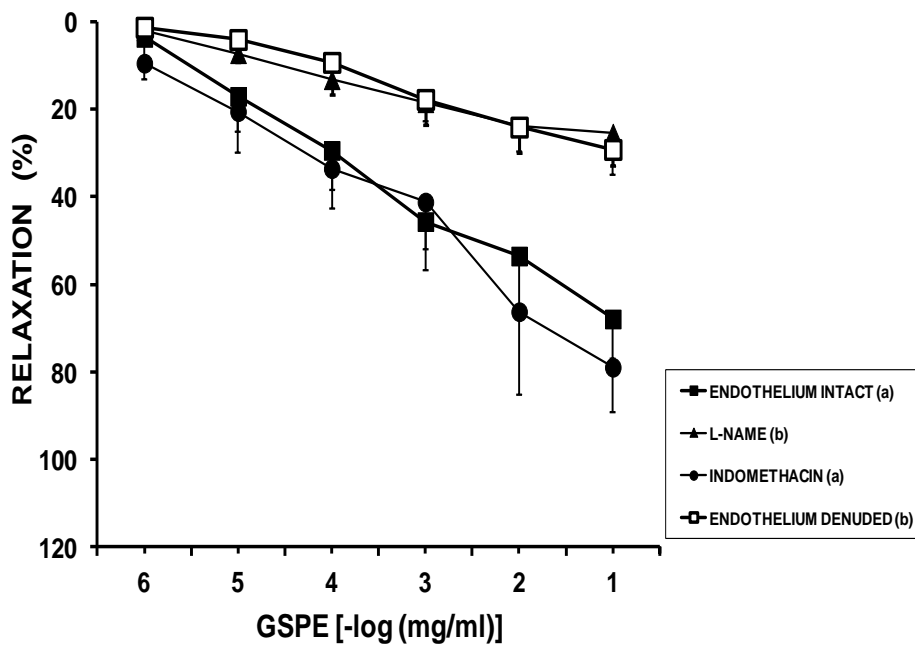


Figure 4



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

DOCUMENTO 2

Efecto de las proantocianidinas de semillas de uva sobre la
la presión arterial y la homeostasis de los lípidos en un
modelo animal de síndrome metabólico

Guerrero L., Pons Z., Margalef M., Arola L.,

Arola-Arnal A., Muguerza, B.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

En el documento 2 se presentan los resultados obtenidos en un estudio inicial, donde se evalúa simultáneamente el efecto de las PA de semillas de uva sobre la homeostasis de los lípidos y la presión arterial (BP) en un modelo animal de síndrome metabólico, para dar respuesta al objetivo 6 de la presente Tesis Doctoral.

EFFECTO DE LAS PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLAS DE UVA SOBRE LA PRESION ARTERIAL Y LA HOMEOSTASIS DE LOS LÍPIDOS EN UN MODELO ANIMAL DE SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico (SM) constituye un desorden multifactorial que incluye factores de riesgo como la hipertensión, la dislipidemia, la obesidad y la hiperglicemia, todos altamente involucrados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular [Nikolopoulou-Kadoglou, 2012]. Este síndrome no puede contemplarse como una enfermedad única, sino que más bien puede definirse como una asociación de problemas de salud causados por factores genéticos y ambientales [Lakka et al., 2002; Esposito et al., 2007], que induce cambios fisiopatológicos a nivel corporal. Los modelos animales a los cuales se les induce SM mediante una dieta desequilibrada son los más aceptados y confiables para el estudio de las consideraciones metabólicas de este desorden [Panchal–Brown, 2011].

Nuestro grupo ha demostrado que las PA presentes en el extracto de GSPE exhiben diferentes propiedades beneficiosas sobre algunos de los parámetros relacionados con el SM actuando como antioxidantes [Puiggròs et al., 2005], reduciendo la síntesis *de novo* de lípidos hepáticos, principalmente de TG [Del Bas et al., 2008, Manuscrito 1 y Documento 1 de la presente Tesis Doctoral], limitando la adipogénesis [Pinent et al., 2005] y presentando propiedades como agentes antiinflamatorios [Martínez-Micaelo et al., 2012] e insulinomiméticos [Castell-Auví et al., 2012]. Además, en la presente Tesis Doctoral se demuestra que el GSPE presenta propiedades antihipertensivas *in vivo* en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas [Manuscritos 3 y 4].

En los apartados anteriores de esta Tesis Doctoral se ha podido demostrar que el extracto de pepita de uva utilizado tiene propiedades al menos sobre dos de los principales factores de riesgo del SM: la hipertensión y la dislipemia. En ésta parte final del trabajo se ha querido comprobar, en un modelo experimental de SM reproducido al utilizar un modelo de animales alimentados con la denominada dieta de cafetería, el efecto simultáneo del GSPE sobre la hipertensión y la dislipemia, 2 de los principales componentes asociados al SM.

Mariales y métodos

Extracto de proantocianidinas de semillas de uva (GSPE)

El extracto de proantocianidinas de semillas de uva fue suministrado por Les Dérives Résiniques et Terpéniques (Dax, France). El extracto contiene 16.55% de monómeros, 18.77% de dímeros, 16% de trímeros, 9,3% de tetrameros y 35,7% de oligómeros (>5) de PA. De acuerdo con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, el total de polifenoles es del 92%. Una caracterización en mayor profundidad del GSPE se muestra en el Manuscrito 3.

Modelo animal

Los animales utilizados fueron ratas machos Wistar de 8 semanas de vida, con un peso de 151-175g obtenidos en Charles River Laboratory (Barcelona, España). Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales a una temperatura de 22°C con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad; después de 1 semana de cuarentena recibiendo agua y dieta estándar PanLab A04 ad libitum (Panlab, Barcelona, España) con el siguiente contenido nutricional: 60.5% de hidratos de carbono, 2.9% de lípidos, 15.4% de proteína, 12% de agua, 5.3% de minerales y 3.9% de fibra; se inició la administración de la denominada dieta de cafetería a un grupo de animales (n=8), mientras que el resto de animales siguió alimentándose con dieta estándar (n=8, grupo control). Ésta dieta se encuentra compuesta de galletas con paté, galletas con queso, magdalenas, beicon, zanahorias y leche con azúcar. Su contenido nutricional es: 35.2% de

hidratos de carbono, 23.4% de lípidos, 11.7% de proteína, 28.4% de agua y 1.31% de fibra [Pajuelo et al., 2012]. Los animales recibían la dieta a las 7 pm y les era retirada a las 9 am del día siguiente, este grupo además de la dieta de cafetería también recibía dieta estándar y agua *ad libitum*. Los procedimientos empleados con los animales siguen las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona, España).

Medida de la presión arterial

Después de las 10 semanas de administración de la dieta de cafetería comenzaron los ensayos agudos de administración del GSPE. Los animales fueron divididos en 2 grupos y se les administró mediante sonda intragástrica agua destilada o GSPE (375mg/kg), siempre entre las 9 y 10 am. El volumen administrado oralmente a las ratas, tanto de agua como de la solución de GSPE, fue siempre de 1 mL. Los valores de la presión arterial sistólica (SBP) y la presión arterial diastólica (DBP) se midieron por el método del *tail-cuff* (método del manguito en la cola) [Buñag, 1973; Manuscrito 2 y Manuscrito 3] entre las 9 y las 11 de la mañana. Antes de la medición, las ratas se mantuvieron a 38°C durante 10 minutos con el fin de incrementar la vasodilatación en la arteria de la cola. Se tomaron un mínimo de 6 medidas de la BP, estando la rata completamente relajada y siendo las pulsaciones constantes. Con el fin de garantizar la veracidad de los resultados los animales fueron sometidos al procedimiento experimental durante 2 semanas previas al ensayo, con el objetivo de adaptarlos al protocolo de medición y disminuir los errores inducidos por el estrés del animal durante la prueba.

Determinación de la concentración de lípidos en plasma e hígado

Los animales fueron sacrificados por decapitación, previa autorización del comité de ética de la Universidad Rovira i Virgili. El plasma fue obtenido por centrifugación, el hígado extraído y congelado en nitrógeno líquido; tanto el tejido como el plasma fueron mantenidos a -80°C hasta su uso. Se

determinaron las concentraciones plasmáticas y hepáticas colesterol y TG mediante un kit enzimático colorimétrico (QCA, Barcelona, España).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM) y se analizaron mediante la prueba de *t-Student* para muestras independientes utilizando el software SPSS. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$.

Resultados

Efecto antihipertensivo de proantocianidinas de semillas de uva en ratas con síndrome metabólico inducido por la dieta

La ingestión de la dieta de cafetería durante 10 semanas originó un aumento significativo de la BP con respecto a los valores previos a la administración de esta dieta. Las medidas muestran un incremento de $24,75 \pm 3,06$ y $25,39 \pm 3,88$ mm Hg para la SBP y la DBP respectivamente, alcanzándose valores de $140,1 \pm 2,86$ mm Hg para la SBP y $119,0 \pm 2,08$ mm Hg para la DPB. No se observaron incrementos significativos en la BP de animales a lo que durante estas 10 semanas se les continuó alimentando con dieta estándar en lugar de la dieta de cafetería.

La administración de 375mg/Kg de GSPE originó a las 6 horas una disminución significativa tanto de la SBP (figura 1) como de la DBP (figura 2). La disminución fue de $16,67 \pm 2,41$ mm Hg para la SBP y de $13,0 \pm 4,20$ mm Hg para la DBP. Por el contrario la administración de agua no dio lugar a cambios ni en la SBP ni en la DBP (figuras 1 y 2).

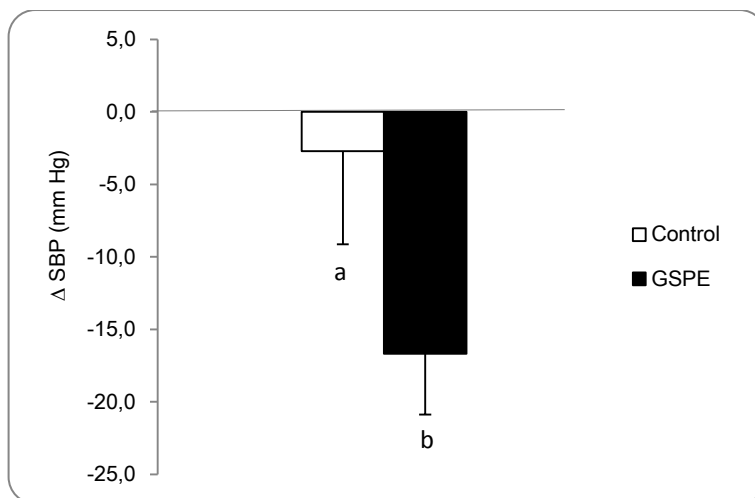


Figura 1. Histograma que muestra los cambios de la SBP de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) y agua como control a las 6 horas post-ingesta. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

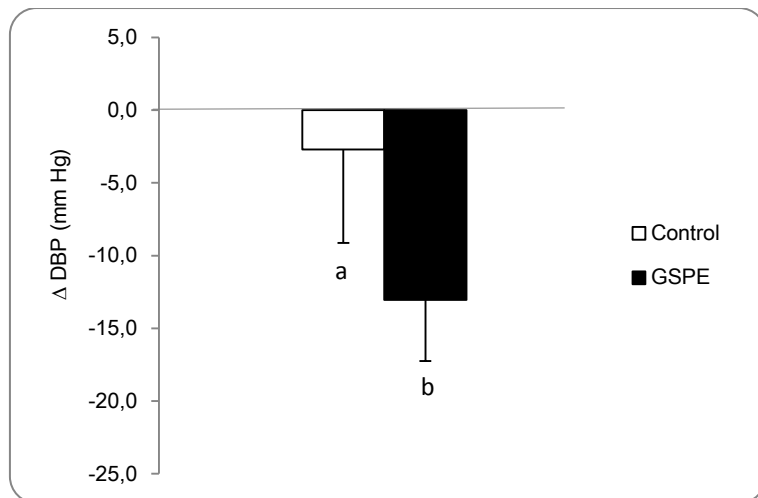


Figura 2. Histograma que muestra los cambios de la DBP de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) y agua como control a las 6 horas post-ingesta. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

Efecto en la concentraciones plasmáticas de lípidos de proantocianidinas de semillas de uva en ratas con síndrome metabólico inducido por la dieta

La administración de 375mg/kg de GSPE no causó a las 6 horas una disminución significativa de las concentraciones plasmáticas del colesterol total (figura 3) ni de los TG (figura 4) con respecto a los animales a los que se administró agua.

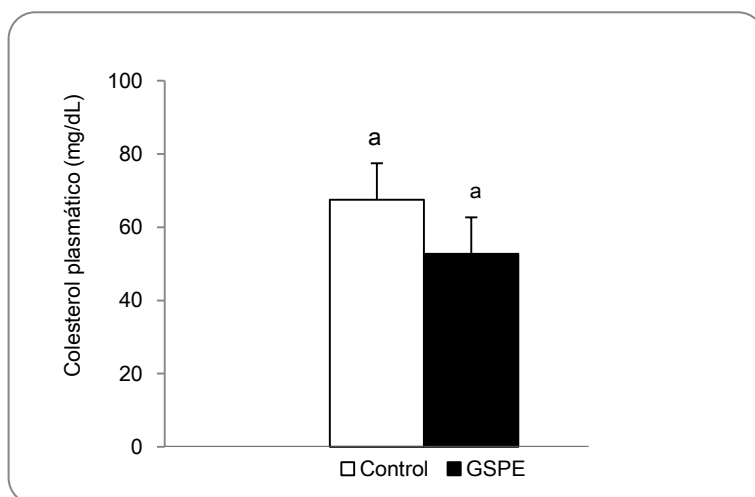


Figura 3. Histograma de las concentraciones plasmáticas de colesterol (mg/dL) de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) o agua, a las 6 horas post-ingesta del extracto. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

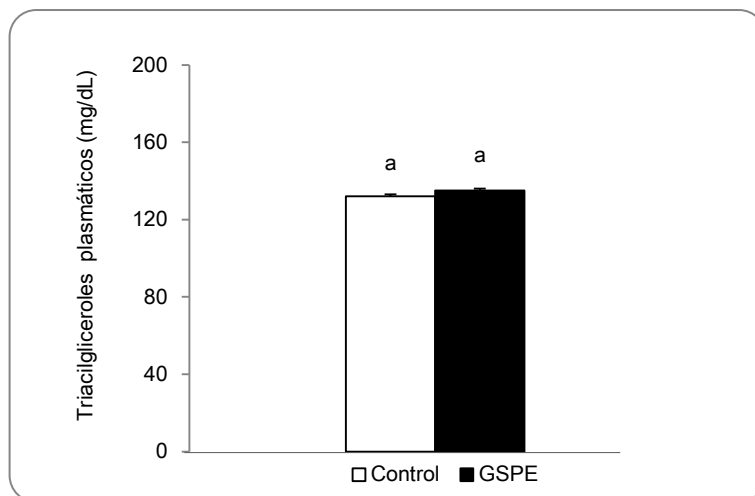


Figura 4. Histograma de las concentraciones plasmáticas de triacilgliceroles (mg/dL) de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) o agua, a las 6 horas post-ingesta del extracto. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (SEM). Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

Efecto en la concentraciones hepáticas de lípidos de proantocianidinas de semillas de uva en ratas con síndrome metabólico inducido por la dieta

La concentración hepática del colesterol en los animales tratados con GSPE fue similar a la del grupo control (figura 5). En contraste se observó una reducción significativa en la concentración de los TG hepáticos en el grupo tratado con el extracto de PA con respecto al grupo que recibió agua (figura 6).

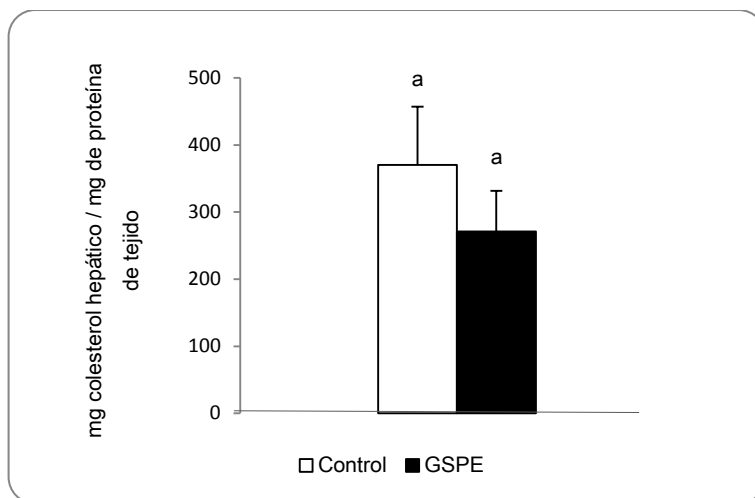


Figura 5. Histograma de las concentraciones hepáticas de colesterol (mg colesterol/mg de proteína de tejido) de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) a las 6 horas post-ingesta del extracto. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

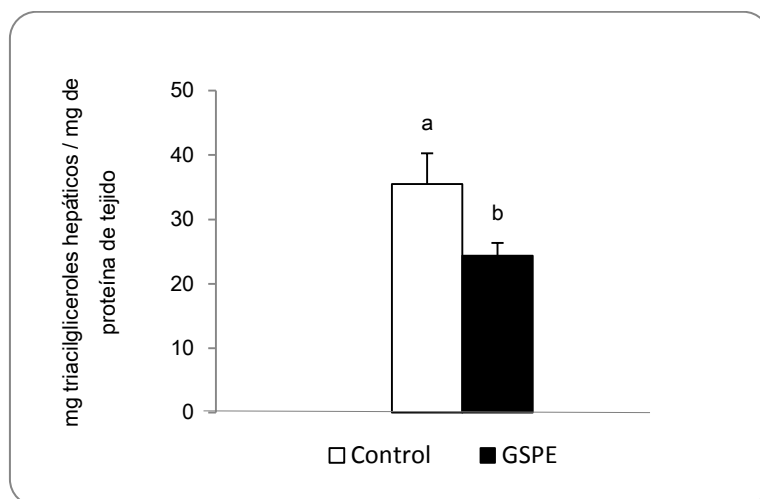


Figura 6. Histograma de las concentraciones hepáticas de triacilglicérols (mg triacilglicérols/mg de proteína de tejido) de las ratas tratadas con GSPE (375mg/Kg) a las 6 horas post-ingesta del extracto. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas con una $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencia estadística.

Discusión y conclusiones

El SM es considerado un desorden secundario a un desequilibrio en la dieta y a un estilo de vida cada vez más sedentario asociado a un componente genético [Nguyen et al., 2010; Kassi et al., 2011; Galleano et al., 2012]. El SM es un trastorno complejo con alto coste socioeconómico que se considera una epidemia a nivel mundial. La prevalencia del SM varía y depende de los criterios utilizados, así como la composición (sexo, edad, raza y etnia) de la población estudiada [Cornier et al., 2008]. No obstante, independientemente del criterio usado, la prevalencia del SM es alta y creciente en todas las sociedades occidentales, probablemente como consecuencia del incremento de la incidencia de la obesidad [Hillier et al., 2006; Hollman-Kristenson, 2008; do Carmo et al., 2008]. Este aumento tanto en países desarrollados como en los que están en vía de desarrollo, le ha convertido ya en una importante amenaza para la salud pública mundial. Es especialmente preocupante cuando afecta a los niños y adolescentes, hecho cada vez más frecuente como consecuencia de las crecientes tasas de obesidad infantil y los estilos de vida más sedentarios [Invitti et al., 2006].

El SM se define por un conjunto de factores interconectados que aumentan directamente el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular (). Algunos de sus componentes principales son la HTA y la dislipidemia, concretamente la hipertrigliceridemia y reducidos niveles de colesterol HDL (ATPIII, 2001; Kassi et al., 2011). Por otro lado la HTA, esta frecuentemente asociada a otras condiciones de riesgo incluidas en el SM, como la dislipidemia [Cordero, et al. 2006]. De hecho, al menos una tercera parte de la población hipertensa está también diagnóstica de SM [Redon, et al. 2008].

La principal indicación sugerida para el manejo del SM es seguir un estilo de vida saludable. En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico general para este desorden y el abordaje usado es el tratamiento de cada uno de sus componentes por separado [Redon, et al. 2008]. Por lo tanto, uno de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral de demostrar los efectos de las PA

de semillas de uva sobre 2 de los componentes fundamentales asociados al SM podría ser de extrema utilidad, máxime cuando se trata no de un fármaco, sino de un compuesto que puede ser usado como ingrediente funcional, ya que son precisamente los hábitos de alimentación inadecuados uno de los factores más importantes a cambiar en personas con SM, especialmente cuando aún no se alcanzan los límites fijados para comenzar con el tratamiento farmacológico. Por lo tanto, el uso de alimentos funcionales que presenten tanto propiedades beneficiosas sobre la dislipidemia como antihipertensivas podría suponer una herramienta extremadamente útil en el control de estos 2 componentes fundamentales del SM.

El modelo experimental de ratas alimentadas con dieta de cafetería reproduce algunos de los parámetros del SM. Los animales que reciben esta dieta desarrollan obesidad [Pajuelo et al., 2011], dislipidemia [Quesada et al., 2009], insulino resistencia asociada con hiperglicemia [Castell-Auví et al., 2012] además de presentar algunos marcadores de inflamación [Terra, et al. 2011]. Este estudio demuestra además que la dieta de cafetería provoca un incremento significativo en la BP.

Aunque se considera a los animales SHR como el mejor modelo experimental de hipertensión para evaluar compuestos antihipertensivos para su uso en la hipertensión esencial humana [FitzGerald et al., 2004], el modelo experimental de ratas alimentadas con dieta de cafetería propuesto en este estudio nos parece especialmente útil porque además de estar inducido por la dieta, el aumento de la BP está asociado a otros factores de riesgo del SM.

Aunque los valores medidos de SBP a las 10 semanas de alimentación con la dieta de cafetería no superan los 160 mm Hg, valor a partir del cual se suele considerar que las ratas presentan HTA, los resultados muestran valores de BP superiores a los considerados como normales [Badyal et al., 2003]. Además, los resultados tanto de SBP como de DBP son significativamente superiores a los medidos en los animales alimentados con la dieta estándar. De hecho, los valores alcanzados pueden ser considerados como *borderline* o estado que

podría ser designado como prehipertensión, el cual de hecho ya implica un factor de riesgo.

Además como ya se ha indicado, muchas personas con SM tienen o están en situación de riesgo de presentar hipertensión, por lo que el tratamiento con antihipertensivos en este tipo de pacientes se recomienda que comience con valores más bajos de BP, aunque no se hayan alcanzado los valores fijados para comenzar con el tratamiento farmacológico (130 vs 140 mmHg para la SBP y 80 vs 90 mm Hg para la DBP) [Redon, et al. 2008].

Actualmente, existe controversia a la hora de tratar y clasificar la prehipertensión, mientras algunos autores la refieren como una enfermedad *per se*, y consideran necesario su tratamiento farmacológico debido a que su aparición conlleva mayor probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, otros la consideran simplemente como un factor de riesgo de enfermedades futuras y no como una enfermedad propiamente dicha [Moynihan, 2010]. Independientemente de la clasificación, un estado de prehipertensión implica una alta probabilidad de desarrollar HTA en el futuro, por lo que los cambios en el estilo de vida y el tratamiento de otros factores de riesgo cardiometabólicos asociados son una prioridad [Calderón et al., 2010]. Además el riesgo asociado al aumento de la BP es continuo, y se estima que cada 2 mm Hg de aumento de la SBP conllevan un 7% más de riesgo de la mortalidad por cardiopatía isquémica y un 10% más de aumento de la mortalidad por accidente cerebrovascular [NHS, 2011].

Resultados previos, han mostrado que las PA tienen efecto antihipertensivo en animales SHR, tanto en estudios a corto plazo [Negishi et al., 2004; Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Quiñones et al., 2011], como a largo plazo [Thandapilly et al., 2012; Quiñones et al., 2010]. De hecho, resultados incluidos en esta Tesis Doctoral muestran que la administración de diferentes dosis de PA de semillas de uva a animales SHR presenta un claro efecto antihipertensivo, alcanzándose con la dosis más efectiva una disminución de la BP similar a la obtenida con el Captopril, un fármaco de amplio uso en clínica

para el tratamiento de la hipertensión [Manuscrito 3]. En este estudio, además, se ha constatado que la administración aguda de 375mg/kg de GSPE (a las 6 horas post-administración) presenta efecto antihipertensivo en un modelo de SM con HTA inducida por la dieta. La utilización de esta dosis de GSPE y la medida de la BP a las 6 horas de administración viene dada porque en el estudio realizado con ratas SHR es esta dosis de 375mg/kg de GSPE la más efectiva, y son las 6 horas después de la administración de esta dosis el tiempo en el que se observa mayor descenso de la BP [Manuscrito 3].

El efecto antihipertensivo mostrado por el GSPE en este modelo experimental prehipertensivo es especialmente interesante, ya que es en los primeros estadios de la patología, con valores de BP superiores a los considerados como normales, pero sin alcanzarse todavía los valores a partir de los cuales se debería comenzar con el tratamiento farmacológico, el momento en el que el consumo de alimentos funcionales podría ser de mayor utilidad.

Además, aunque la detección y control de la HTA es relativamente sencilla, la realidad es que muchos pacientes hipertensos no tienen conocimiento de su enfermedad, ya que no presentan ningún tipo de síntomas, y otros están diagnosticados pero no reciben el tratamiento adecuado. Es por todo ello obvio el interés que siguen teniendo los estudios que intentan establecer nuevas estrategias para el control de la hipertensión arterial. De hecho, en los últimos años algunos de los esfuerzos para reducir la prevalencia de la HTA se han centrado en los enfoques no farmacológicos, ya que se considera que pequeñas reducciones en la BP pueden tener un gran impacto sobre los eventos cardiovasculares [Turnbull, 2003], se espera una reducción de 2 a 3% en el riesgo por cada mm Hg que se disminuya la BP [Jiménez et al., 2012].

Respecto al efecto de las PA sobre los niveles de lípidos en el modelo animal de SM, encontramos que el tratamiento con GSPE no afecta de manera significativa los niveles de colesterol ni de TG plasmáticos en los animales a los que se administró la dieta de cafetería. Esta falta de efecto sobre los lípidos

plasmáticos del GSPE ya ha sido mostrado por otros autores [Bladé et al. 2010]. No obstante, otros estudios sí que encuentran una disminución del colesterol y de los TG plasmáticos tras la administración del GSPE [Del Bas et al, 2005, Del Bas et al, 2008; Del Bas et al., 2009, Quesada et al., 2009; Pajuelo et al., 2011]. Estas discrepancias podrían ser debidas a las diferentes dosis de extracto usadas, al tiempo de administración de los extractos, a las diferentes dietas de cafetería empleadas y al uso de diferentes modelos animales en los estudios [Bladé et al. 2010; Caimari et al., 2012].

Sin embargo, a diferencia de lo encontrado con los lípidos plasmáticos, sí que se observa una disminución de los lípidos hepáticos con respecto a la administración de agua, 6 horas después de la administración de 375mg/kg de GSPE a los animales con SM; alcanzándose diferencias estadísticamente significativas para los TG. Existe evidencia previa de que el consumo de polifenoles previene la acumulación de grasa a través de la activación del catabolismo de los lípidos y la inhibición de las vías lipogénicas tanto en el hígado como en el tejido adiposo [Hsu-Yen, 2008; Meydani- Hasan, 2010; Bladé et al., 2010].

En los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral observamos que el GSPE disminuye la síntesis y secreción de lípidos *de novo* en células HepG2 tratadas con una dosis de 25mg/L [Manuscrito 1]. Adicionalmente empleando un sistema combinado de estudios *in vivo* e *in vitro* determinamos el efecto de los metabolitos de las PA disponibles, de un grupo de ratas a las cuales se les administro una dosis de 1000 mg/Kg de GSPE y dosis menores de 375, 250 y 125mg/Kg; los resultados indican que las PA presentes en el suero disminuyen la síntesis y secreción de los lípidos en las células hepáticas [Manuscrito 1 y documento 1]. El tiempo de tratamiento de las células con el extracto y las PA del suero corresponde a 6 horas, el mismo lapso de tiempo en el que encontramos en este estudio que la dosis de 375mg/Kg exhibe efecto reductor de la BP en ratas SHR [Manuscrito 3].

Sin embargo, estudios *in vivo* que analizan los efectos a corto plazo de una dosis menor de GSPE (250mg/kg) sobre patrones de expresión génica en hígado de rata y ratón, no mostraron cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos. No obstante, los autores encuentran una sobre regulación de los genes implicados en la oxidación de ácidos grasos [Del Bas et al., 2008; Del Bas et al., 2009].

En conclusión los resultados de este estudio indican que la administración oral de PA de semillas de uva, a una dosis de 375mg/Kg, muestran a las 6 horas un claro efecto antihipertensivo y una disminución de los TG hepáticos en un modelo animal de SM inducido por la dieta.

Bibliografía

ATPIII. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on the detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment panel III). Executive summary. *NIH Publication*. **2001**. 01-3670.

Badyal, D.K.; Lata, H.; Dadhich, A.P. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian Journal of Pharmacology*. **2003**. 35, 349-362.

Bladé, C.; Arola, L.; Salvado, M. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res*. **2010**. 54, 37-59.

Buñag, RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol*. **1973**. 34, 279-282.

Caimari, A.; Del Bas, J., Crescenti, A.; Arola, L. Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *Int J Obes*. **2012**. doi: 10.1038/ijo.2012.75.

Calderón. A.; Escobar, C.; Barrios, V. Should we modify our therapeutic behavior as a consequence of the 2009 revision of the ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. *Rev Clin Esp*. **2010**. 210:511-6.

Castell-Auví, A.; Cedó, L.; Pallarès, V., Blay, M., Pinent, M.; Motilva, M.; Garcia-Vallvé, S.; Pujadas, G.; Maechler, P.; Ardévol, A. Procyanidins modify insulinemia by affecting insulin production and degradation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **2012**. In Press.

Cienfuegos-Jovellanos, E.; Quiñones, MM.; Muguerza, B.; Moulay, L.; Miguel, M.; Alexandre, A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem*. **2009**. 57: 6156-6162.

Cordero, A.; Moreno, J.; Alegría, E. Hipertensión arterial y síndrome metabólico. *Rev Esp Cardiol*. **2006**. 5, 38-45.

Cornier, MA.; Dabelea, D.; Hernandez, TL.; Lindstrom, RC.; Steig, AJ.; .tob, NR.; Van Pelt, RE.; Wang, H.; Eckel, RH: The metabolic syndrome. *Endocr Rev* **2008**. 29, 777-822.

Del Bas, J.; Fernandez-Larrea, J.; Blay, M.; Ardevol, A.; Salvado, MJ.; Arola, L. et al. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J*. **2005**. 19, 479-481.

Del Bas, J.; Ricketts, M.; Baiges, I.; Quesada, H., Ardevol, A., Salvadó, M. et al., Dietary procyanidins lower triglycerides levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Molecular Nutrition and Food Research*. **2008**. 52, 1172-1181.

Del Bas, J.; Ricketts, M.; Vaqué, M.; Sala, E. et al., Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res*. **2009**. 53, 805-814.

do Carmo, I.; Dos Santos, O.; Camolas, J.; Vieira, J.; Carreira, M.; Medina, L.; Reis, L.; Myatt, J.; Galvão-Teles, A. Overweight and obesity in Portugal: national prevalence in 2003-2005. *Obes Rev*. **2008**. 9, 11-19.

Espósito, K.; Ceriello, A.; Giugliano, D. Diet and the metabolic syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. **2007**. 5, 291-295.

FitzGerald, RJ.; Murray, BA.; Walsh, DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr*. **2004**. 134, 980S-988S.

Galleano, M.; Calabro, V.; Prince, P.; Litterio, M. et al., Flavonoids and metabolic síndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. **2012**. 1259, 87-94.

Jiménez, R.; Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F. Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J.Agric. Food. Chem.* **2012**. Dx.doi.org/10.1021/jf205370ql.

Hillier, TA.; Fagot-Campagna, A.; Eschwege, E.; Vol, S.; Cailleau, M.; Balkau, B. Weight change and changes in the metabolic syndrome as the French population moves towards overweight: the D.E.S.I.R. cohort. *Int J Epidemiol.* **2006**. 35,190-196.

Hollman, G.; Kristenson, M. The prevalence of the metabolic syndrome and its risk factors in a middle-aged Swedish population—mainly a function of overweight? *Eur J Cardiovasc Nurs.* **2008**. 7, 21-26.

Hsu; CL.; Yen, GC. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* **2008**. 52, 53–61.

Invitti, C.; Maffei, C.; Gilardini, L.; Pontiggia, B., Mazzilli, G.; Girola, A.; Sartorio, A.; Morabito, F.; Viberti, GC. Metabolic syndrome in obese Caucasian children: prevalence using WHO-derived criteria and association with nontraditional cardiovascular risk factors. *Int J Obes (Lond).* **2006**. 30(4), 627-633.

Kassi, E.; Pervanidou, P.; Kaltsas, G and Chrousos, G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine.* **2011**. 9:48.

Lakka, H.M.; Laaksonen, D. E.; Lakka, T. A. et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men,” *Journal of the American Medical Association.* **2002**. 288, 2709 – 2716.

Martínez-Micaelo, N.; González-Abuín, N.; Ardèvol, A.; Pinent, M.; Blay, MT. Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. *Biofactors.* **2012**. 38(4), 257-265.

Meydani, M.; Hasan, ST. Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients.* **2010**. 2, 737–751.

Moynihan R. Who benefits from treating prehypertension? *BMJ*. **2010**. 341: c4442.

Negishi, H.; Xu, JW.; Ikeda, K.; Njelekela, M.; Nara, Y.; Yamori, Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr*. **2004**. 134(1), 38-42.

Nguyen, T.; Tang, H.; Kelly, P.; van der Ploeg, H.; Dibley, M. Association between physical activity and metabolic syndrome: a cross sectional survey in adolescents in Ho Chi Minh City, Vietnam. *BMC Public Health*. **2010**. 10,141.

NHS. National Institute for Health and Clinical Excellence. Hypertension: Clinical management of primary hypertension in adults. *NICE clinical guideline 127*. **2011**. www.nice.org.uk/guidance/CG127.

Nikolopoulou, A.; Kadoglou, NP. Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. **2012**. 10(7), 933-939.

Pajuelo, D.; Quesada, H.; Díaz, S.; Fernández-Iglesias, A.; Arola-Arnal, A.; Bladé, C.; Salvadó, J.; Arola, L. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of BAT caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br. J. Nutr*. **2012**. 1-9 (23218116).

Panchal, S. K. and Brown, L. Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2011**. ID351982, doi:10.1155/2011/351982.

Pinent, M., Blade, M.; Salvadó, M., Arola, L.; Hackl, H., Quackenbush, J. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. **2005**. 29(8), 934-941.

Puigròs, F.; Llopiz, N.; Ardevol, A.; Blade, C.; Arola, L and Salvadó, M. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression

of antioxidant enzyme systems. *Journal of agriculture and food chemistry*. **2005**. 53(15), 6080-6086.

Quesada, H.; Del Bas, JM.; Pajuelo, D.; Diaz, S.; Fernandez-Larrea, J.; Pinent, M. et al. Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes (Lond)*. **2009**. 33, 1007–1012.

Quiñones, M.; Sánchez, D.; Muguerza, B.; Moulay, L.; Laghi, S.; Miguel, M.; et al., Long-term intake of CoccoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. **2010**. 122, 1013-1019.

Quiñones, M.; Sánchez, D.; Muguerza, B.; Miguel, M.; Alexandre, A. Mechanism for antihypertensive effect of CoccoanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Res Int*. **2011**. 44, 1203-1208.

Redon, J.; Cifkova, R.; Laurent, S.; Nilsson, P.; Narkiewicz, K.; Erdine, S. et al., The metabolic syndrome in hypertension: European society of hypertension position statement. *J Hypertens*. **2008**. 26: 1891.

Thandapilly, SJ.; LeMaistre, JL.; Louis, XL.; Anderson, CM.; Netticadan, T.; Anderson, HD. Vascular and cardiac effects of grape powder in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*. **2012**. 10, 1070-1076. doi: 10.1038/ajh.2012.98.

Terra, X.; Pallarés, V.; Ardèvol, A.; Bladé, C.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G. et al., Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *J Nutr Biochem*. **2011**. 22: 380-387.

Turnbull, F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *Lancet*. 2003. 362, 1527 – 1535.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Recapitulación



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio del efecto simultáneo de las proantocianidinas en la prevención del riesgo de dislipidemia e hipertensión arterial como patologías asociadas en el síndrome metabólico. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la administración de un extracto de semillas de uva rico en proantocianidinas (GSPE) tiene un marcado efecto sobre la síntesis y secreción de lípidos tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, corrigiendo las situaciones de dislipemia tanto crónica como postprandial; adicionalmente el efecto positivo de las proantocianidinas sobre la tensión arterial ha sido mostrado, comprobando que estos compuestos pueden presentar efecto antihipertensivo. Con estos antecedentes nos planteamos determinar el **efecto simultáneo** del GSPE sobre la síntesis *de novo* de lípidos hepáticos y el control de la tensión arterial, objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

Para la utilización simultánea de un ingrediente en la corrección del factor de riesgo de dos patologías con una base bioquímica diferente, nos convenía seleccionar aquél ingrediente que contuviera la mezcla de las moléculas más efectivas para ambas situaciones. Comenzamos profundizando en el estudio de las proantocianidinas responsables del efecto dislipémico, utilizando una estrategia diferente a la que anteriormente había usado el grupo de investigación basada en la purificación sucesiva del GSPE que había llevado a la conclusión de que la combinación de un trímero y un dímero galato era la óptima para conseguir modificar la homeostasis lipídica en el sentido buscado [Montagut et al., 2009].

En éste contexto usamos una doble aproximación experimental utilizando un modelo *in vitro* con células HepG2 que nos permite seguir el destino del acetato marcado en relación con el metabolismo de los lípidos. Por una parte comparamos tres extractos ricos en proantocianidinas de diferentes características: un primer extracto rico en proantocianidinas tipo A (extracto de pino), un segundo extracto con proantocianidinas tipo B no galatadas (extracto de cacao) y por último un extracto con formas tipo B galatadas y no galatadas

(extracto de semillas de uva), utilizando siempre la misma dosis de extracto: 25mg/L.

Los resultados obtenidos [**Manuscrito 1**] indican que los tres extractos disminuyen la síntesis de triacilgliceroles, ésteres de colesterol y colesterol en las células hepáticas respecto al control sin extracto. Al evaluar la cantidad de lípidos secretados desde las células al medio, los resultados indican que el efecto es similar con los tres extractos y no hay diferencia respecto al control. Nuestros resultados muestran que una dosis de GSPE de 25mg/L fue suficiente para reducir la síntesis y secreción de los lípidos en las células hepáticas.

Estos resultados no coinciden con la conclusión previa del grupo sobre las moléculas responsables, donde se observaba que el efecto sobre el metabolismo de los lípidos en células HepG2 era mediado por un dímero y trímero galato, ya que en el GSPE no detectamos altas concentraciones de esos compuestos [**Manuscrito 3**]. Quizás las diferentes dosis reales de moléculas presentes en las células al utilizar un método de purificación sucesiva, pueda explicar esta no coincidencia.

Planteamos un segundo enfoque para tratar de resolver ésta problemática, dado que en los últimos años se ha discutido el hecho de emplear extractos para la evaluación del efecto biológico de las proantocianidinas, ya que las formas bioactivas que se encuentran en la sangre y que llegan a los tejidos son molecularmente diferentes a las presentes en los alimentos, como consecuencia de los cambios estructurales que sufren los flavonoides durante su metabolismo, pensamos que sería relevante utilizar un sistema que nos permitiera evaluar sobre células HepG2 las moléculas biotransformadas, y utilizamos para ello un método novedoso que permite utilizar suero de ratas tratadas con un extracto como el GSPE y correlacionar las moléculas presentes en el suero con los efectos metabólicos.

Con este fin, administramos a un grupo de ratas 1000 mg/Kg de GSPE y obtuvimos el suero a las dos horas posteriores a la ingesta del extracto,

periodo de tiempo en el cual se presenta el pico más alto de concentración de flavonoides en el plasma [Rein et al., 2000; Serafini et al., 2003;]. El suero fue semipurificado mediante una técnica de micro-extracción en fase sólida con el objetivo de reducir las posibles interferencias dadas principalmente por las proteínas. Al realizar los análisis cromatográficos de éstos sueros los metabolitos identificados principalmente eran los conjugados, sobre todo glucuronidados, de las formas monoméricas de los flavan-3-oles (catequina y epicatequina). Con el método usado no se identifican en el suero formas oligoméricas de proantocianidinas, lo que no implica que no estén presentes, probablemente si lo están, las concentraciones son muy bajas.

Posteriormente tratamos una línea de células hepáticas con el suero semipurificado y determinamos las concentraciones de triacilgliceroles, colesterol y ésteres de colesterol marcados con acetato radioactivo a las 6 horas post-tratamiento. Los resultados **[Manuscrito 1]** indican que las proantocianidinas disponibles en el suero tienen efecto reductor de la síntesis *de novo* de ésteres de colesterol, colesterol y especialmente de triacilgliceroles, respecto a las células tratadas con el suero de las ratas que recibieron agua como control. La reducción en las concentraciones de lípidos observada a nivel intracelular nos permite plantear que las proantocianidinas disponibles en el suero tienen efecto en la síntesis *de novo* de los lípidos, estos resultados son consistentes con otros estudios *in vivo* utilizando GSPE en ratas [Del Bas et al., 2005].

A partir de este momento centramos el estudio únicamente en el extracto de semilla de uva ya que no habíamos obtenido diferencias con los otros extractos que sugirieran un mayor potencial y el estudio utilizando suero de ratas tratadas con el GSPE mostraba un efecto consistente con los anteriores resultados del grupo. En una segunda fase del estudio quisimos comprobar si dosis menores de los 1000mg/kg eran también efectivas y para ello utilizamos tres dosis de el GSPE: 375mg/Kg, 250mg/Kg y 125mg/Kg, y realizamos la cuantificación de la síntesis y secreción de los lípidos en el mismo modelo de células hepáticas **[Documento 1]**. Confirmamos que los metabolitos que se

encuentran disponibles en el suero participan en la regulación de la síntesis *de novo* de los lípidos en células hepáticas. Al realizar los análisis cromatográficos del suero semipurificado encontramos que los compuestos conjugados eran principalmente monómeros glucuronidados y las concentraciones de estos compuestos fueron dosis dependiente. Algunos trabajos previos indican que es indispensable la deconjugación de los metabolitos para que puedan ejercer su función biológica, el hígado puede desempeñar un papel importante en el recambio de los flavonoides glucuronidados debido a la expresión de β -glucuronidasas [O'Leary, K et al., 2001]. Los resultados confirman que las proantocianidinas disponibles en el suero, principalmente formas glucuronidadas, tienen un efecto reductor de la síntesis hepática de lípidos, principalmente de los triacilgliceroles, y nos indican también que dosis relativamente moderadas, de 125 mg/kg son efectivas.

La segunda parte de la Tesis Doctoral se centró en la selección de un ingrediente adecuado para el control de la presión arterial, partiendo de la base que el mejor extracto para la corrección de la dislipemia es el GSPE a dosis moderadas y que nos interesaba un extracto activo simultáneamente para ambas situaciones de riesgo.

En esta fase focalizamos en primer lugar el estudio sobre la capacidad que previamente se había demostrado para algunos flavonoides de inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) [Actis-Gorreta et al., 2006], enzima clave en el control de la presión arterial y una de las principales dianas que se utilizan en clínica para su control. Para ello planteamos un trabajo que estudiaba *in vitro* la inhibición de la actividad de la ACE mediada por 17 flavonoides de estructura diferente, para establecer las bases estructurales de su bioactividad. Con el fin de entender las bases moleculares de los resultados obtenidos se realizó un estudio quimioinformático de interacción proteína-ligando. El estudio mostró que los flavonoides, en su mayor parte son agentes efectivos en la inhibición de la ACE y que los flavonoides que presentan en su estructura un grupo catecol en el anillo B, un doble enlace entre al carbono 2 y 3 en el anillo C y un grupo cetona en el

carbono 4 del anillo C, son los principales responsables de la inhibición de la actividad de la ACE **[Manuscrito 2]**.

El GSPE contiene una proporción y cantidad relativa de flavonoides que pudiera ser efectiva en la inhibición de la ACE con lo que, al ser el extracto elegido para la corrección de la dislipemia, debíamos estudiar su potencial para la corrección de la tensión arterial para establecer el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

Para comprobar el efecto del GSPE sobre la hipertensión arterial utilizamos ratas espontáneamente hipertensas (SHR) por ser considerado el mejor modelo experimental de hipertensión para evaluar compuestos antihipertensivos para su uso en la hipertensión esencial humana. En este estudio comparamos el efecto sobre la presión arterial sistólica y diastólica de la administración de tres dosis del extracto (250, 375 y 500mg/kg) con el que produce el fármaco Captopril de frecuente utilización en clínica. Los resultados indican que el GSPE disminuye la presión arterial en los animales, alcanzándose la máxima bajada a las 6 horas posteriores a su ingesta. El efecto antihipertensivo es dosis dependiente hasta la dosis 375mg/Kg del extracto. El decremento observado fue en promedio de 50 mm Hg y muy similar al efecto producido por el Captopril **[Manuscrito 3]**.

Paradójicamente con la dosis de 500mg/Kg se obtuvo un menor efecto antihipertensivo que la dosis de 375mg/Kg, consistente con estudios realizados con otros extractos ricos en polifenoles [Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Quiñones et al., 2011a]. Algunos autores han indicado que los flavonoides pueden actuar como pro-oxidantes dependiendo la concentración en la que se encuentren en los sistemas biológicos, su papel pro-oxidante puede ser asociado con señalización celular con lo cual los flavonoides pueden contribuir a la coordinación de las funciones celulares [Procházková et al., 2011].

Es importante señalar que la administración de GSPE a la dosis más eficaz de 375 mg/kg no modificó la presión arterial de las ratas Wistar-Kyoto (control normotenso de los animales SHR). Por lo tanto, para que el extracto de

proantocianidinas presente efecto antihipertensivo se precisa que exista un estado de hipertensión. Es decir, el efecto del GSPE aparece únicamente cuando existe una alteración de la presión arterial y los valores de esta variable son superiores a los normales.

En nuestro modelo experimental, con la dosis de 375 mg/kg y 6 horas después de la administración de GSPE no se observa reducción de la actividad ACE. En principio, pues, no se puede afirmar que la hipótesis previa se cumpla, aunque la modificación en la tensión arterial no tiene por qué coincidir en el tiempo con los posibles cambios en la actividad ACE. Queda pendiente el estudio de la cinética del efecto del GSPE sobre la actividad ACE.

Con la intención de establecer el mecanismo por el cuál GSPE reduce la tensión arterial, ya que no podíamos establecer que fuera por su teórico efecto sobre ACE, en el mismo modelo experimental evaluamos indicadores del estrés oxidativo como son la concentración de glutatión reducido y de malondialdehído en hígado, ya que la asociación entre la producción de radicales libres, peroxidación lipídica y estrés oxidativo con la hipertensión ha sido reportada por diferentes autores [Ross, 1999; Bessa et al., 2009]

La administración de 375mg/kg de GSPE incrementa los valores hepáticos de glutatión reducido, de acuerdo a lo reportado para otros extractos ricos en flavonoides, donde se plantea que la reducción del estrés oxidativo es uno de los mecanismos reguladores implicados en el efecto de las proantocianidinas sobre la tensión arterial [Quiñones et al., 2011b]. Los niveles de malondialdehído en hígado, un marcador de peroxidación lipídica, fueron similares tanto en los animales tratados con GSPE como en los controles. Se puede postular pues un cierto efecto sobre el estrés oxidativo que, en parte, podría estar mediando el efecto antihipertensivo del GSPE.

La explicación sin embargo no es suficiente para comprender la magnitud del efecto, por lo que decidimos profundizar en el estudio de otros posibles mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo. Diversos grupos han reportado que los flavonoides ejercen efecto relajante sobre el endotelio

[Rodrigo et al., 2012; Idris et al., 2012; Enseleit et al., 2012] condicionando cambios en la regulación de los procesos fisiológicos que permiten el control de la tensión arterial mediante su interacción con dos importantes mecanismos de señalización que condicionan procesos de vasodilatación, los que implican el óxido nítrico (NO) y los que están mediados por prostaciclina. En realidad, el NO y la prostaciclina PGI₂ son los relajantes vasculares más importantes que libera el endotelio. Con el fin de comprobar si GSPE puede ocasionar una liberación del NO o de otros factores endoteliales que relajan el músculo liso vascular se realizaron distintos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

En los ensayos *in vitro* se montaron aortas con y sin endotelio de animales hipertensos SHR en baños de órganos tradicionales. También se montaron preparaciones con endotelio preincubadas con L-NAME (inhibidor de la enzima NO sintasa, y por consiguiente de la síntesis de NO) y preparaciones con endotelio preincubadas con indometacina (inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, y por consiguiente de la síntesis de PGI₂). Los resultados obtenidos muestran que el GSPE es capaz de relajar las preparaciones de la aorta de las ratas SHR **[Manuscrito 4]**. Sin embargo, el extracto prácticamente no produce relajación en las preparaciones de la aorta sin endotelio, indicando claramente que el efecto relajante es endotelio dependiente. También, la relajación producida por el extracto era menor en las preparaciones que se habían incubado con L-NAME. La relajación en las preparaciones incubadas con indometacina fue, sin embargo, muy semejante a la relajación de las preparaciones no tratadas que tenían endotelio. Estos resultados muestran que el GSPE es capaz de facilitar la liberación del NO.

También se ha comprobado si el GSPE es capaz también *in vivo* de aumentar la disponibilidad del NO o de otros factores endoteliales. Con este fin, utilizando el modelo SHR, administramos oralmente a diferentes grupos de animales GSPE, a la dosis más efectiva de 375mg/Kg, 2 horas después de la administración de GSPE se administró intraperitonealmente L-NAME. En un experimento adicional, en vez de L-NAME administramos indometacina, también por vía intraperitoneal y a las 2 horas de administrar oralmente el

GSPE. En ambos casos se midió la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica a las 6 horas de administración del extracto por ser este tiempo en el que se registra el máximo efecto antihipertensivo. Los resultados obtenidos **[Manuscrito 4]** indican claramente que el efecto antihipertensivo del GSPE en ratas espontáneamente hipertensas es un efecto dependiente del endotelio que está mediado principalmente por una mejoría de la disponibilidad del NO. El efecto vasodilatador de la PGI₂ también puede estar implicado, aunque los resultados obtenidos no son tan concluyentes.

En la última parte de la Tesis Doctoral realizamos una comprobación final que nos permitiera establecer la posibilidad de utilizar el GSPE para la prevención simultánea de la dislipidemia y la hipertensión arterial. Necesitábamos demostrar que en un modelo experimental de síndrome metabólico ambos efectos se producían. Trabajos previos del grupo demostraban claramente que en un modelo de ratas alimentadas con dieta de cafetería, un modelo contrastado de síndrome metabólico, el GSPE corrige la dislipemia a dosis moderadas, pero no tenemos referencias de estudios que demuestren una corrección de la tensión arterial en este modelo.

En primer lugar comprobamos que la inducción de síndrome metabólico asociado al consumo de dieta de cafetería, condiciona un aumento significativo de la tensión arterial sistólica y diastólica. Comprobamos también que la administración aguda de una dosis de 375mg/kg condiciona una disminución significativa de la tensión arterial a las 6 horas de la ingestión. Al mismo tiempo se comprueba una disminución significativa en estos animales de la concentración hepática de triacilglicerol **[Documento 2]**.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que las proantocianidinas de semillas de uva actúan de manera simultánea como agentes reguladores de la síntesis de lípidos, principalmente triacilglicerol, y ejercen un efecto antihipertensivo mediado por factores derivados del endotelio y una mejoría del estrés oxidativo en animales espontáneamente hipertensos, y en un modelo

animal de síndrome metabólico presentan tanto efecto reductor de los triacilgliceroles hepáticos como efecto antihipertensivo.

Por lo tanto, creemos haber cumplido los objetivos inicialmente previstos en esta Tesis Doctoral. Con ellos hemos demostrado asimismo la hipótesis inicialmente planteada. Esperamos que este estudio permita establecer las bases de otros estudios experimentales con GSPE permitiendo su utilización como ingrediente funcional con efecto simultáneo en la prevención del riesgo de dislipidemia e hipertensión arterial como patologías asociadas en el síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

Actis-Goretta, L.; Ottaviani, J.; Fraga, C. Inhibition of Angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**. 54, 229-234.

Del Bas, J.M.; Fernandez-Larrea, J.; Blay, M.; Ardevol, A.; et al., Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J.* **2005**. 19, 479-81.

Enseleit, F.; Sudano, I.; Périat, D.; Winnik, S.; et al., Effects of Pycnogenol on endothelial function in patients with stable coronary artery disease: a double-blind, randomized, placebo-controlled, cross-over study. *Eur Heart J.* **2012**. 33(13), 1589-1597. doi: 10.1093/

Idris Khodja, N.; Chataigneau, T.; Auger, C.; Schini-Kerth, VB. Grape-derived polyphenols improve aging-related endothelial dysfunction in rat mesenteric artery: role of oxidative stress and the angiotensin system. *PLoS One.* **2012**, 7(2), e32039. doi: 10.1371.

Montagut, G.; Baiges, I.; Valls, J.; Terra, X.; Del Bas, J.; Vitrac, X.; Richard, T.; Mérillon, J.; Arola, L.; Blay, M.; Bladé, M.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Ardévol, A. A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food chemistry.* **2009**. 116, 265-270.

O'Leary, K.; Day, AJ.; Needs, PW.; Sly, WS.; O'Brien, NM. et al. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* **2001**. 503,103-106.

Quiñones, M.; Miguel, M.; Muguerza, B.; Aleixandre, A. Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* **2011a**; 2: 649-53.

Quiñones, M.; Sánchez, D.; Muguerza, B.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Mechanisms for antihypertensive effect of CoccoanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Food Res Int*. **2011b**. 44, 1203-1208.

Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and pro-oxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **2011**. 82, 513–523.

Rein,D.; Lotito,S.; Holt,R.R.; Keen,C.L.; Schmitz,H.H.; Fraga,C.G. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *The Journal of nutrition*. **2000**. 8, 2109S-2114S.

Rodrigo, R.; Gil, D.; Miranda-Merchak, A.; Kalantzidis, G. Antihypertensive role of polyphenols. *Adv Clin Chem*. **2012**. 58:225-254.

Ross, R. Atherosclerosis and inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med*. **1999**. 340, 115-126.

Serafini,M.; Bugianesi,R.; Maiani,G.; Valtuena,S.; De Santis,S.; Crozier,A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*. **2003**. 424

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Conclusiones



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

5.1 Los extractos ricos en proantocianidinas de tipo A, en proantocianidinas de tipo B no galatadas y en proantocianidinas con formas tipo B galatadas y no galatadas disminuyen la síntesis de triacilgliceroles, colesterol y ésteres de colesterol en cultivos de células hepáticas humanas.

5.2 Las proantocianidinas presentes en el suero de ratas dos horas después de la administración de un extracto de semillas de uva, disminuyen la síntesis de triacilgliceroles, colesterol y ésteres de colesterol en cultivos de células hepáticas humanas.

5.3 Los flavonoides que presentan en su estructura un grupo catecol en el anillo B, un doble enlace entre el carbono 2 y el carbono 3 del anillo C y un grupo cetona en el carbono 4 del anillo C son los más efectivos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

5.4 Las proantocianidinas de extracto de semillas de uva presentan un efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas de manera dosis dependiente hasta 375 mg/Kg, con un efecto máximo a las 6 horas después de la ingesta del extracto, retornando a los niveles basales de tensión arterial a las 48 horas post administración.

5.5 Las proantocianidinas de semillas de uva ejercen su efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas a través de una cierta disminución del estrés oxidativo manifestado por el incremento del glutatión reducido y, especialmente, por un efecto dependiente del endotelio que está mediado principalmente por una mejoría en la disponibilidad de NO y secundariamente por un efecto vasodilatador de la prostaciclina PGI₂.

5.6 La administración aguda de una dosis de 375 mg/Kg de proantocianidinas de semillas de uva a ratas alimentadas crónicamente con dieta de cafetería que presentan elevada presión arterial, disminuye la tensión arterial a las 6 horas de la administración del extracto y simultáneamente, disminuye la concentración hepática de triacilgliceroles.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Bibliografía



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013

Acosta, A.; Áñez, J.; Andara, C.; Bermúdez, V.; Bermúdez, A. Mecanismos moleculares de la disfunción endotelial: de la síntesis a la acción del óxido nítrico. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. **2006**. 25, 55-59.

Actis-Goretta, L.; Mackenzie, G.; Oteiza, P.; Fraga, C. Comparative study on the antioxidant capacity of wines and other plant-derived beverages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**. 957, 279-283.

Actis-Goretta, L.; Ottaviani, J.; Fraga, C. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J. Agric. Food. Chem.* **2006**. 54, 229-234

Adiels, M.; Borén, J.; Caslake, MJ. et al., Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2005**. 25, 1697-1703.

Adiels, M.; Olofsson, S.; Taskinen, M. and Boren, J. Diabetic dyslipidemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **2006**. 17, 238-246.

Agellon, LB.; Toth, MJ.; Thomson, AB. Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem.* **2002**. 239: 79-82.

Ajar, M.; Gilani, A.; Mustafa, M. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* **2003**. 74, 603-612.

Ajay, M.; I. Achike, F.; Mustafa, A.; Mustafa, M. Direct effects of quercetina on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aorta: comparative study with ascorbic acid. *Clinical and experimental pharmacology and physiology.* **2006**. 33, 345-350.

Akhlaghi, M.; Bandy, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* **2009**. 46, 309-317.

Alderton, W.; Cooper, C.; Knowles, R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* **2001**. 357, 593-615.

Andriambelason, E.; Kleschyov, A.; Muller, B.; Beretz, A.; Stoclet, J.; Andriantsitohaina, R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol.* **1997**. 120, 1053-1058.

Appel, LJ.; Moore, TJ.; Obarzanek, E.; Vollmer, WM.; Svetkey, LP.; Sacks, FM.; Bray, GA.; Vogt, TM.; Cutler, JA.; Windhauser, MM.; Lin, PH.; Karanja, N.A. Clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* **1997**. 336, 1117-1124.

Arca, M.; Pigna, G. and Favocchia, C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. *Current Vascular Pharmacology.* **2012**. 10, 684-686.

Aron, PM and Kennedy, JA. Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Mol Nutr Food Res*. **2008**. 52, 79–104.

Arts, IC.; Van De Putte, B.; Hollman, PC. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem*. **2000**. 48: 1752-1757.

Arribas, SM.; Hinek, A.; González, MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther*. **2006**. 111(3), 771-91.

Baenziger, N.; Dillender, M.; Majerus, P. Cultured human skin fibroblasts and arterial cells produce a labile platelet-inhibitory prostaglandin. *Biochim Biophys Res Commun*. **1977**. 78, 294 – 301.

Bagchi, D.; Bagchi, M.; Stohs, S.; Das, D.; Ray, S.; Kuszynski, C.; Joshi, S.; Preuss, H. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention, *Toxicology*. **2000**. 148, 187–197.

Bagchi, D.; Sen, C.; Ray, S.; Das, D.; Chandan, K.; Bagchia, M.; Preusse, H.; Vinson, J. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*. **2003**. 523–524, 87–97.

Baiges, I.; Palmfeldt, J.; Bladé, C.; Gregersen, N.; Arola, L. Lipogenesis is decreased by grape seed proanthocyanidins according to liver proteomics of rats fed a high fat diet. *Mol Cell Proteomics*. **2010**. 9, 1499-1513.

Ballester, I.; Camuesco, D.; Gálvez, J.; Sánchez De Medina, F.; Zarzuelo, A. Flavonoides y enfermedad inflamatoria. *Ars Pharm*. **2006**. 47, 5-2.

Banini, A.E. et al.. Muscadine grape products intake, diet and blood constituents of non-diabetic and type 2 diabetic subjects. *Nutrition*. **2006**. 22, 1137–1145.

Bansode, R.; Randolph, P.; Hurley, S.; Ahmedna, M. Evaluation of hypolipidemic effects of peanut skin-derived polyphenols in rats on Western-diet. *Food Chem*. **2012**. 135, 1659-1666.

Barter, P.; Kastelein, J. Targeting cholesteryl ester transfer protein for the prevention and management of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. **2006**. 47, 492-499.

Bavner, A.; Sanyal, S.; Gustafsson, JA.; Treuter, E. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol Metab*. **2005**. 16, 478–488.

Bays, H. Ezetimibe. *Expert Opin Investig Drugs*. **2002**. 11, 1587–1604.

Besnard, P.; Niot, I.; Poirier, H.; Clement, L. and Bernard, A. New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Mol. Cell. Biochem*. **2002**. 239, 139-147.

Bessa, SS.; Ali, E.; Hamdy, S. The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients. *European Journal of Internal Medicine*. **2009**. 20, 625–630.

Bladé, C.; Arola, L.; Salvado, M. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol. Nutr. Food Res*. **2010**. 54, 37–59.

Blanchet, J.; Safar, ME. Large-artery stiffness, hypertension and cardiovascular risk in older patients. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. **2005**. 2, 450-455.

Bolli, A.; Marino, M.; Rimbach, G.; Fanali, G.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochem Biophys Res Commun*. **2010**. 398, 444-449.

Borriello, A.; Cucciolla, V.; Ragione, D.; Galletti, P. Dietary polyphenols: focus on resveratrol, a promising agent in the prevention of cardiovascular diseases and control of glucose homeostasis. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular diseases*. **2010**. 20, 618-625.

Bravo, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. **1998**. 56, 317-333.

Buhman, KK.; Accad, M.; Novak, S.; Choi, RS.; Wong, JS.; Hamilton, RL.; Turley, S.; Farese, RV Jr. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med*. **2000**. 6, 1341–1347.

Bulut, D.; Liaghat, S.; Hanefeld, C.; Koll, R.; Miebach, T.; Mugge, A. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with parecoxib acutely impairs endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. **2003**. 21, 1663–1667.

Bunting, S.; Moncada, S.; Vane, Jr. Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet*. **1977**. 1075 – 1076.

Burda, S.; Oleszek, W. and Lee, C. Y. Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J. Agric. Food Chem*. **1990**. 38, 945–948.

Caimari, A.; Del Bas, J., Crescenti, A.; Arola, L. Low doses of grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma lipid profile in hamsters. *Int J Obes*. **2012**. doi: 10.1038/ijo.2012.75. [Epub ahead of print].

Cao, J.; Burn, P.; Shi, Y. Properties of the mouse intestinal acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransferase, MGAT2. *J Biol Chem*. **2003**. 278: 25657–25663.

Cao, J.; Cheng, L.; Shi, Y. Catalytic properties of MGAT3, a putative triacylglycerol synthase. *J Lipid Res*. **2007**. 48: 583–591.

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

Castell-Auví, A.; Cedó, L.; Pallarès, V.; Blay, M.; Pinent, M.; Motilva, M.; Garcia-Vallvé, S.; Pujadas, G.; Maechler, P.; Ardévol, A. Procyanidins modify insulinemia by affecting insulin production and degradation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **2012**. In Press.

Catena, C.; Colussi, G.; Brosolo, G.; Iogna-Prat, L.; Sechi, L. Aldosterone and aldosterone antagonists in cardiac disease: what is known, what is new. Review Article. *Am J Cardiovasc Dis.* **2012**. 2, 50-57.

Chang, CC.; Chen, J.; Thomas, MA.; Cheng, D.; Del Priore, VA.; Newton, RS, et al. Regulation and immunolocalization of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase in mammalian cells as studied with specific antibodies. *J Biol Chem.* **1995**. 270, 29532-29540.

Chanvitayapongs, S.; Draczynska-Lusiak, B.; Sun, A. Amelioration of oxidative stress by antioxidants and resveratrol in PC12 cells. *NeuroReport*. **1997**. 8, 1499-1502.

Chen, S.; Zhang, F.; Sherman, M.; Kijima, I.; Cho, M.; Yuan, Y.; Toma, Y.; Osawa, Y.; Zhou, D.; Eng, E. Structure-function studies of aromatase and its inhibitors: a progress report. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**. 86, 231 - 237.

Choi, SH.; Ginsberg, HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab.* **2011**. 22, 353-363.

Chu, Y.; Sun, J.; Wu, X. and Liu, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(23), 6910-6916.

Cherezov, V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. **2007**. 318, 1258-1265.

Ceriello, A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*. **2008**. 31,181-184.

Cines, D.; Pollak, E.; Buck, C.; Loscalzo, J.; Zimmerman, G.; McEver, R.; Pober, J.; Wick, T.; Konkle, B.; Schwartz, B.; Barnathan, E.; McCare, K.; Hug, B.; Schmidt, A.; Stern, D. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Review Article. *Blood*. **1998**. 91, 3527-3561.

Clifford, M. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J Sci Food Agric*. **2000**. 80, 1033–1043.

Corradini, E.; Foglia, P.; Giansanti, P.; Gubbio, R.; Samperi, R.; Laganà, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*. **2011**. 5, 469–495.

Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.; Cimanga, K.; Van, P.; et al. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*. **1998**. 61, 71–76.

Clearfield, M. A novel therapeutic approach to dyslipidemia. *J Am Osteopath Assoc*. **2003**. 103, S16–S20.

Crozier, A.; Jaganath, IB and Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep*. **2009**. 26, 1001–1043.

Curmi, PA.; Juan, L.; Tedgui, A. Effect of transmural pressure on low density lipoprotein and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. *Circ Res*. **1990**. 66(6):1692-702.

Day, A.; Mellon, FA.; Barron, D. et al. Human metabolism of flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res*. **2001**. 35, 941–952.

Deanfield, J.; Halcox, J.; Rabelinh, T. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. **2007**. 115, 1285-1295.

Decorde, K.; Teissedre, P.; Auger, C.; Cristol, J.; Rouanet, J. Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. *Mol Nutr Food Res*. **2008**. 52, 400–407.

Del Bas, J.M.; Fernandez-Larrea, J.; Blay, M.; Ardevol, A.; et al., Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J*. **2005**. 19, 479-81.

Del Bas, J.M; Ricketts, M.; Baiges, I.; Quesada, H., Ardevol, A., Salvadó, M. et al., Dietary procyanidins lower triglycerides levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Molecular Nutrition and Food Research*. **2008**. 52, 1172-1181.

Del Bas, J.M; Ricketts, M.; Vaqué, M.; Sala, E. et al., Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol. Nutr. Food Res*. **2009**. 53, 805–814.

Delpy, E.; Coste, H.; Gouville, A. Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol*. **1996**. 119, 471–478.

Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.; Tognolini, M.; Borges, G.; Alan Crozie, A. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox signalling*. **2012**. DOI: 10.1089/ars.2012.4581.

Dell'Agli, M.; Buscialà, A.; Bosisio, E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res*. **2004**. 63: 593-602.

Dell'Asta, M.; Calani, L.; Tedeschi, M.; Jechiu, L.; Brighenti, F.; et al., Identification of microbial metabolites derived from in vitro fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*. **2012**. 28, 197-203

De Pascual-Teresa, S. Análisis de taninos condensados en alimentos. (Analysis of condensed tannins in food). *PhD thesis*. Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, **1999** (in Spanish).

Devi, A.; Chandrasekar, S.; Manjula, K.; Ishii, N. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Exp Gerontol*. **2011**. 46, 958-64.

Dietschy, JM.; Turley, SD.; Spady, DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res*. **1993**. 34, 1637-59.

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

Duarte, J.; Pérez-Palencia, R.; Vargas, F.; Ocete, MA.; Pérez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; Tamargo, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*. **2001**. 133, 117-124.

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

Dunbar, D. Prostacyclin in the intensive care setting. *Pediatr Crit Care Med*. **2010**. 11, S41–S45.

Durier, S.; Fassot, C.; Laurent, S.; et al., Physiological genomics of human arteries: quantitative relationship between gene expression and arterial stiffness. *Circulation*. **2003**. 108, 1845–1851.

Düsing, R. Optimizing blood pressure control through the use of fixed combinations. *Vasc. Health Risk Manage*. **2010**. 6, 321–325.

Echeverry, I.; Ramírez-Vélez, R.; Ortega, J.; Mosquera, M.; Mateus, J.; Aguilar, A. Efecto potencial del ejercicio físico y del consumo de micronutrientes durante la gestación en factores maternos y placentarios asociados con enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) del adulto. *Colomb Med.* **2009**. 40, 448-459.

Erdős, E. Angiotensin I-converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension.* **1990**. 16, 363-370.

Fan, P.; Lou, H. Effects of polyphenols from grape seeds on oxidative damage to cellular DNA. *Mol. Cell Biochem.* **2004**. 267, 67-73.

Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L.; Giachetti, D.; et al. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* **1997**. 416, 123-129.

Fleming, I.; Kohlstedt, K.; Busse, R. New fACEs to the renin-angiotensin system. *Physiology.* **2005**. 20, 91-95.

Fraga, C. Plant phenolics and human health, biochemistry, nutrition and pharmacology. **2010a**. New Jersey: The Wiley. Text book.

Fraga, C.; Litterio, M.; Prince, P.; Calabró, V.; Piotrkowski, B.; Galleano, M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J. Clin. Biochem.Nutr.* **2010b**. 48, 63-67.

Fraga, C.; Litterio, MC.; Prince, PD.; Calabró, V.; Piotrkowski, B.; Galleano, M. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *J Clin Biochem Nutr.* **2011c**. 48, 63-67.

Fridez, P.; Makino, A.; Miyazaki, H.; Meister, J.; Hayashi, K.; Stergiopulos, N. Short-term biomechanical adaptation of the rat carotid to acute hypertension: contribution of smooth muscle. *Ann. Biomed. Eng.* **2001**. 29, 26-34.

Fitridge, R. and Thompson, M. Mechanisms of Vascular Disease: A Textbook for vascular surgeons. The vascular endothelium: structure and function. *Cambridge.* **2007**. 1-10.

Fritsch, M.; D, Kasal.; A, Cunha.; F, Medeiros. Vascular dysfunction as target organ damage in animal models of hypertension. *International Journal of Hypertension.* **2012**. Article ID 187526. doi:10.1155/2012/187526.

Fuleki, T.; Da Silva, JMR. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **1997**. 45, 1156-1160.

Fung, Y. Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues. *Springer-Verlag*, New York. **1993**.

Galindo, P.; Rodríguez-Gómez, I.; Gonzáles-Manzano, S.; Dueñas, Montserrat.; Jiménez, R.; Menéndez, C.; Vargas, F.; Tamargo, J.; Santos-Buelga, C.; Pérez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *Plos One*. **2012**. 7(3): e32673. doi: 10.1371.

Galleano, M.; Calabro, V.; Prince, P.; Litterio, M. et al., Flavonoids and metabolic síndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2012**. 1259, 87–94.

Gebhardt, R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. *Med Sci Monit* **7**. **2001**. Suppl 1: 316–320.

Goedeke, L.; Fernández-Hernando, C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* **2012**. 6, 915-930.

Gohla, A.; Offermanns, S.; Wilkie, T.; Schultz, G. Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor mediated stress fiber formation. *J Biol Chem.* **1999**. 274, 17901–17907.

González, Maqueda I. Hipertensión arterial, diabetes y arteriosclerosis. La encrucijada del endotelio (II). *Hipertensión*. **1997**. 14, 173-184.

Gonthier, MP.; Donovan, JL.; Texier, O.; Felgines, C.; Remesy, C.; et al., Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. **2003**. 35, 837-844.

Grosskopf, I.; Baroukh, N.; Lee, S.J.; Kamari, Y.; et al., apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of tryglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**. 25, 2573-2579.

Grundy, S.; Metzger, A. A physiological method for estimation of hepatic secretion of biliary lipids in man. *Gastroenterology*. **1972**. 62, 1200-1217.

Grundy, S. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* **1983**. 3, 71–96.

Guerrero, L.; Castillo, J.; Quiñones, M.; Garcia-Vallvé, S.; Arola, L, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS ONE*. **2012**. 7(11): e49493. doi:10.1371

Guo, H.; Li, D.; Ling, W.; Feng, X.; Xia, M. Anthocyanin inhibits high glucose-induced hepatic mtGPAT1 activation and prevents fatty acid synthesis through PKC. *J. Lipid Res.* **2011**. 52, 908–922.

Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J-F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a

French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J Agric Food Chem.* **1998.** 46, 1698–1705.

Halcox, J.; Narayanan, S.; Cramer-Joyce, L.; Mincemoyer, R.; Quyyumi AA. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2001.** 280, H2470–H2477.

Hanhoff, T.; Lucke, C.; Spener, F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biochem.* **2002.** 239, 45–54.

Halperin, RO.; Sesso, HD.; MA, J.; Buring, JE.; Stampfer, MJ. et al., Dyslipidemia and the risk of incident hypertension in men. *Hypertension.* **2006.** 47(1), 45-50.

Harrington, L.; Carrier, M.; Gallagher, N.; Gilroy, D.; Garland, C.; Mitchell, J. Elucidation of the temporal relationship between endothelial-derived NO and EDHF in mesenteric vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **2007.** 293, H1682–H1688.

Harrison, D.; Gongora, M.; Guzik, T.; Widder, J. Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension.* **2007.** 1, 30-44.

Harrison, D. and Gongora, M. Oxidative stress and hypertension. *Medical Clinics of North America.* **2009.** 93, 621-635.

Havashi, H.; Kamiva, A.; K. Ono (Eds.). Biomechanics: Functional adaptation and remodeling, *Springer-Verlag*, Tokyo. **1996.**

Heim, K.; Tagliaferro, A.; Bobilya, D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry.* **2002.** 13, 572-584.

Henriksen, E.; Jacob, S. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *J Cell Physiol.* **2003.** 196, 171-179.

Hernell, O.; Stammers, JE.; Carey, MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings. *Biochemistry.* **1990.** 29: 2041–2056.

Hiipaka, R.; Zhang, H.; Dai, W.; Dai, Q.; Liao, S. Structure activity relationships for inhibition of human 5 α -reductase by polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **2002.** 63, 1165 – 1176.

Holt, PR.; Fairchild, BM.; Weiss, J. A liquid crystalline phase in human intestinal contents during fat digestion. *Lipids 21:* **1986.** 444–446.

Hollman, P. C. H. and Arts, I. C. W.: Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000.** 80: 1081–1093.

Horton, JD.; Goldstein, JL.; Brown, MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* **2002.** 109, 1125-1131.

Huang, WY.; Kummerow, FA. Cholesterol and fatty acid synthesis in swine. *Lipids.* **1976.**11(1), 34-41.

Ikeda, I.; Imasato, Y.; Sasaki, E.; Nakayama, M.; Nagao, H.; Takeo, T.; Yayabe, F. and Sugano, M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1992.** 1127. 141-146.

Ikonen, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol. Rev.* **2006.** 86, 1237-1261.

Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews. Molecular cell biology.* **2008.** 9, 125-138.

Iqbal, J.; Hussain, M. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2009.** 296(6), E1183-E1194.

Isaac, R.; Schoofs, L.; Williams, T. et al., A novel peptideprocessing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme): The hydrolysis of lysyl-arginine and arginyl-arginine from the C-terminus of an insect prohormone peptide. *Biochem J* **1998.** 330, 61-65.

Jayaprakasha, G.; Singh, R.; Sakariah, K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry.* **2001.** 73, 285-290.

Jiménez, R.; Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F. Epicatechin: endothelial function and blood pressure. *J.Agric. Food. Chem.* **2012.** Dx.doi.org/10.1021/jf205370ql.

Joannides, R.; Haefeli, W.; Linder, L.; Richard, V.; Bakkali, E.; Thuillez, C.; Lüscher, T. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* **1995.** 91, 1314-1319.

Jochmann, N.; Lorenz, M.; Krosigk, A.; Martus, P.; Böhm, V.; Baumann, G.; et al., The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr.* **2008.** 99, 863-868.

Kahn, R.; Buse, J.; Ferrannini, E.; Stern, M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* **2005.**9, 2289-2304.

Kameda, K.; Takaku, T.; Okuda, H.; Rimura, Y. Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. *J Nat Prod.* **1987.** 50, 689-683.

Kang, DG.; Lee, YS.; Kim, HJ.; Lee, YM.; Lee, HS. Angiotensin converting enzyme inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*. *J. Ethnopharmacol.* **2003**. 89, 151-154.

Kar, P.; Laight, D.; Rooprai, H.; Shaw, K.; Cummings, M. Effects of grape seed extract in Type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabetic Medicine.* **2009**. 26, 526-531.

Kassi, E.; P, Pervanidou.; Kaltsas, G.; Chrousos, G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Medicine.* **2011**. 9:48

Kearney, P.; M, Whelton.; K. Reynolds, P.; Muntner, P.; Whelton, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* **2005**. 365, 217-223.

Khera, AV.; Cuchel, M.; de la Llera-Moya, M.; et al., Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* **2011**. 364, 127-135.

Keser, S.; Celik, S.; Turkoglu, S. Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera L.*) and grape products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* **2012**. Early Online: 1-7.

Kim, S.; Kang, K.; Kim, K.; Kim, N. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci.* **2000**. 67, 121-131.

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

Kühnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics.* **1976**. 24, 117.

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

Kwon, E.; Lee, D.; Lee, H.; Kim, D.; Baek, N.; Kim, Y.; Kim, H. Flavonoids from the buds of *Rosa damascena* inhibit the activity of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase and angiotensin I-converting enzyme. *J.Agric. Food. Chem.* **2010**. 58, 882-886.

Lakka, HM.; Laaksonen, DE.; Lakka, TA.; Niskanen, LK.; Kumpusalo, E.; Tuomilehto et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* **2002**. 288, 2709-2716.

Lake, S.; Krook, A.; Zierath, J. Analysis of insulin signaling pathways through comparative genomics. Mapping mechanisms for insulin resistance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes.* **2003**. 111, 191-197.

Landmesser, U.; Dikalov, S.; Price, S.; McCann, L.; Fukai, T.; Holland, S.; Mitch, W.; Harrison, D. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* **2003.** 111, 1201–1209.

Lee-Hilz, Y.; Boerboom, A.; Westphal, A.; van Berkel, W.; Aarts, J.; Rietjens, I. Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE mediated gene expression. *Chem Res Toxicol.* **2006.** 19, 1499–1505.

Lee, JY.; Carr, TP. Dietary fatty acids regulate acyl-CoA: cholesterol acyltransferase and cytosolic cholesteryl ester hydrolase in hamsters. *J Nutr.* **2004.** 134, 3239–3244.

Lee, M.; Moon, S.; Lee, S.; Bok, S.; Jeong, T.; Park, Y.; Choi, M. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* **2003.** 11, 393 – 398.

Lerman, L.; Chade, A.; Sica, V.; Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. *J. Lab. Clin. Med.* **2005.** 146, 160–173.

Lincoln, T. Cyclic GMP and mechanisms of vasodilatation. *Pharmacol. Ther.* **1989.** 41, 479–502.

Liu, JC.; Hsu, FL.; Tsai, JC.; Chan, P.; Liu, JY.; Thomas, GN.; Tomlinson, B.; Lo, MY.; Lin, JY. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life Science.* **2003.** 73, 1543–1555.

Lorenz, M.; Wessler, S.; Follman, E.; Michaelis, W.; Dusterhoft, T.; Baumann, G.; Stangl, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase, cAMP-dependent protein kinase and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* **2004.** 279, 6190 –6195.

Lotito, S.; Renart, M.; Fraga, C. Assessing the antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic domains: study of a sample of Argentine wines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002.** 957, 284–287.

Lotito, S.; Frei, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol. Med.* **2004.** 36, 201–211.

Lotito, S.; Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med.* **2006.** 41, 1727–1746.

Luchoomun, J.; Hussain, MM. Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids

are preferentially used for lipoprotein assembly. *J Biol Chem.* **1999.** 274, 19565–19572,

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C. and Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* **2004.** 79, 727–747.

Mansbach, C.; Gorelick, F. Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* **2007.** 293, G645–G650.

Martin, S.; Andriambeloson, E.; Takeda, K.; Andriantsitohaina, R. Red wine polyphenols increase calcium in bovine aortic endothelial cells: a basis to elucidate signalling pathways leading to nitric oxide production. *Br J Pharmacol.* **2002.** 135, 1579–1587.

Martin, SS.; Qasim, AN.; Mehta, NN. et al., Apolipoprotein B but not LDL cholesterol is associated with coronary artery calcification in type 2 diabetic whites. *Diabetes* 2009; 58: 1887-92.

Martin, K.; Appel, C. Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements.* **2010.** 2, 1–12.

Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, JM.; Tuñón, MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp.* **2002.** 17: 271-278.

Martínez-Micaelo, N.; González-Abuín, N.; Ardèvol, A.; Pinent, M.; Blay, MT. Procyanidins and inflammation: molecular targets and health implications. *Biofactors.* **2012.** 38(4), 257-265.

Matsumoto, T.; K. Hayashi, K. Mechanical and dimensional adaptation of rat aorta to hypertension *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.* **1994.** 116, 278–283.

Meyer, G.; Merval, R.; Tedgui, A. Effects of pressure-induced stretch and convection on low-density lipoprotein and albumin uptake in the rabbit aortic wall. *Circ Res.* **1996.** 79(3), 532-540.

Miana, M.; de les Heras, N.; Martín Fernández, B.; Valero, M.; Martínez, E.; Ballesteros, S.; Jurado, R.; Cachofeiro, V.; Lahera, V. Papel de la angiotensina II en el proceso aterosclerótico. *Arterioesclerosis.* **2012** (en prensa).

Micallef, M.; Lexis, L.; Lewandowski, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J.* **2007.** 6, 27

Middleton, E.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* **2000.** 52, 673-751.

Mishra, S.; Abbot, S.; Choudhury, A.; Cheng, M.; Khatab, N.; Maycock, N.; Zavery, A. Endothelium dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein. *Cardiovasc. Res.* **2000.** 46, 539-546.

Mitchell, J.; de Nucci, G.; Warner, T.; Vane, J. Different patterns of release of endothelium- derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.* **1992.** 105, 485-489.

Miura, Y.; Chiba, T.; Tomita, I.; Koizumi, H.; Miura, S.; Umegaki, K.; Hara, Y.; Ikeda, M.; Tomita, T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* **2001.** 131, 27- 32.

Mochizuki, S.; Brassart, B.; Hinek, A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **2002.** 277, 44854-44863.

Moncada, S.; Higgs, E.; Vane, Jr. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet.* **1977.** 1, 18 - 20.

Montagut, G.; Baiges, I.; Valls, J.; Terra, X.; Del Bas, J.; Vitrac, X.; Richard, T.; Mérillon, J.; Arola, L.; Blay, M.; Bladé, M.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Ardévol, A. A trimer plus a dimer-gallate reproduce the bioactivity described for an extract of grape seed procyanidins. *Food chemistry.* **2009.** 116, 265-270.

Moon, J.H.; Nakata, R.; Oshima, S.; Inakuma, T. and Terao, I.J. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physio.* **2000.** 279, R461-R467.

Morales, J.; Günther, G.; Zanocco, A. Lemp, E. Singlet oxygen reactions with flavonoids. A theoretical experimental study. *Plos ONE.* **2012.** 7, e40548.doi:10.1371.

Moreno, D.; Ilic, N.; Poulev, A.; Brasaemle, D.; Fried, S.; Raskin, I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition.* **2003.** 19, 876-879.

Münzel, T.; Sinning, C.; Post, F.; Warnholtz, A.; Schulz, E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* **2008.** 40, 180-196.

Navab, M.; Reddy, ST.; Van, Lenten BJ.; Fogelman, AM. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol.* **2011.** 8, 222-232.

NCEP. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* **2001.** 285, 2486-2497.

NCEP. National Cholesterol Education Program. Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. **2002**. 106(25), 3143–3421.

Ngo L, E.; Demougeot, C.; Bopda, O.; Dimo, T.; Dzeuffiet, P.; Bilanda, D.; Girard, C.; Berthelot, A. The aqueous extract of *Terminalia superba* (Combretaceae) prevents glucose-induced hypertension in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2011**. 133, 828-833.

Nguyen, P.; Leray, V.; Diez, M.; Le Bloc'h, J.; Siliart, B.; Dumon, H. Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **2008**. 92, 272 – 283.

Nissen, SE.; Tuzcu, EM., Libby, P. et al., Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *JAMA*. **2004**. 292(18), 2217-2225.

Namrata, C. Endothelial dysfunction—A predictor of atherosclerosis. *Internet Journal of Medical*. **2009**. 4, 33-41.

Natsume, M.; Osakabe, N.; Oyama, M.; Sasaki, M.; Baba, S.; Nakamura, Y.; Osawa, T.; Terao, J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med*. **2003**. 34, 840-849.

Nickenig, G. Central role of the AT(1)-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens*. **2002**; 16, 3: S26–S33.

Nickenig, G.; Harrison DG. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: Part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation*. **2002**. 105: 393–396.

Nigdikar, S.; Williams, N.; Griffin, B.; Howard, A. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am. J. Clin. Nutr*. **1998**. 68, 258-265.

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

Oh, H.; Kang, DG.; Kwon, JW. et al. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. *Biol Pharm Bull*. **2004**. 27, 2035-2037.

O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M. and Williamson, G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in

vitro hepatic model: the role of human [beta]-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O- methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 2003. 65: 479–49.

Oliveira, H.; de Faria, E. Cholesteryl ester transfer protein: the controversial relation to atherosclerosis and emerging new biological roles. *IUBMB Life.* 2011. 63, 248–257.

Ordovas, JM. Genetic links between diabetes mellitus and coronary atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2007. 9, 204-210.

Ottaviani, J.; Actis-Goretta, L.; Villordo, J.; Fraga, C. Procyanidins structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie.* 2006. 88, 359-365.

Paigen, K.: Mammalian beta-glucuronidase: genetics, molecular biology, and cell biology. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1989. 37: 155–205.

Pais, R.; Silaghi, H.; Silaghi, AC.; Rusu, ML.; and Dumitrascu, DL: Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology.* 2009. 15, 5141–5148.

Pajuelo, D.; Díaz, S; Quesada, H.; Fernández-Iglesias, A.; Mulero, M.; Arola-Arnal, A.; Salvadó, J.; Bladé, C. and Arola, L. Acute administration of grape seed proanthocyanidin extract modulates energetic metabolism in skeletal muscle and BAT mitochondria. *J. Agric. Food Chem.* 2011. 59, 4279–4287.

Pajuelo, D.; Quesada, H.; Díaz, S.; Fernández-Iglesias, A.; Arola-Arnal, A.; Bladé, C.; Salvadó, J.; Arola, L. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of BAT caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br. J. Nutr.* 2012. 102, 170-178.

Pal, S.; Ho, N.; Santos.; Dubois, P.; Mamo, J.; Croft, K.; Allister, E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J Nutr.* 2003. 133, 700-706.

Pal, S.; Ho, S.; Takechi, R. Red wine polyphenolics suppress the secretion of ApoB48 from human intestinal caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53, 2767–2772.

Papadogiannis, D. and Protogerou, A. Blood pressure variability: A confounder and a cardiovascular risk factor. *Hypertension Research.* 2011. 34, 162–163.

Paravicini, TM.; Touyz, RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008. 31, 170-180.

Peng, H.; Carretero, OA.; Vuljaj, N.; Liao, TD.; Motivala, A.; Peterson, EL.; Rhaleb, NE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation*. **2005**. 112, 2436-2445.

Pérez-Vizcaíno, F.; Duarte, J. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular aspects of medicine*. **2010**. 31, 478-494.

Persson, I.; Persson, K.; Andersson, R. Effect of *Vaccinium myrtillus* and its polyphenols on angiotensin-converting enzymes activity in human endothelial cells. *J. Agric. Food. Chem*. **2009**. 57, 4626-4629.

Pignatelli, P.; Ghiselli, A.; Buchetti, B.; et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*. **2006**. 188, 77-83.

Pinent, M.; Blay, M., Salvadó, M.; Arola, L.; Ardevol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology*. **2004**. 145(11), 4985-4990.

Pinent, M.; Bladé, M.; Salvadó, M., Arola, L., Hackl, H.; Quackenbush, J., Trajanoski, Z.; Ardévol, A. Grape seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes*. **2005**. 29, 934-941.

Prasain, JK.; Carlson, S.; Wyss, J. Flavonoids and age-related disease: risk, benefits and critical windows. *Maturitas*. **2010**. 66, 163-171.

Probstfield, J.; O'Brien, K. Progression of cardiovascular damage: the role of renin-angiotensin system blockade. *Am J Cardiol*. **2010**. 105s, 10A-20A.

Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and pro-oxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. **2011**. 82, 513-523.

Pudu, P.; Puddu, G.; Cravero, E.; Rosati, M. and Muscari, A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Pressure*. **2008**. 17, 70-77.

Puiggròs, F.; Llopiz, N.; Ardevol, A.; Blade, C.; Arola, L. Salvadó, M. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzymes. *J Agric Food Chem*. **2005**. 53, 6080-6086.

Quehenberger, O.; Dennis, EA. The human plasma lipidome. *N Engl J Med*. **2011**. 10, 1812-1823. doi: 10.1056/NEJMra1104901.

Quesada, H.; Del Bas, J.M.; Pajuelo, D.; Diaz, S., et al., Grape seed proanthocyanidins correct dyslipidemia associated with a high-fat diet in rats and repress genes controlling lipogenesis and VLDL assembling in liver. *Int J Obes*. **2009**. 33, 1007-1012.

Quiñones, M.; Mugerza, B.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res.* **2011.** 64, 478-481.

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

Quyyumi, A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.* **1998.** 105, 325-395.

Rasmussen, SE.; Frederiksen, H.; Struntze Krogholm, K.; Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res.* **2005.** 49, 159-174.

Reaven, GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* **1988.** 37(12),1595-1607.

Riordan, J. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome.* **2003.** 4, 225

Risler, N.; Cruzado, M and Miatello, R. Vascular Remodelling in Experimental Hypertension. Review Article. *TheScientificWorldJOURNAL.* **2005.** 5, 959-971.

Rivero-Vilches, F.; De Frutos, S.; Rodríguez-Puyol, M.; Rodríguez-Puyol, D.; Saura, M. Guanilato ciclasa: procesos fisiológicos mediados por GMPc. *Nefrología.* **2001.** 21-3, 233-

Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine.* **1999.** 340, 115-126.

Röszer, T.; Ricote, M. PPARs in the renal regulation of systemic blood pressure. *PPAR Research.* **2010.** ID 698730, 11 pages.

Santeliz, H.; Romano, L.; González, A.; Hernández, H. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología.* **2008.** 19, 21 - 29.

Sato, M.; G, Maulik.; P.S, Ray. et al., Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999.** 31, 1289-1297.

Saura-Calixto, F.; J, Serrano.; I, Goñi. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry.* **2007.** 101, 492-501.

Savoia, C., Sada, L.; Zezza, L.; Pucci, L.; Lauri, F.; Befani, A.; Alonzo, A.; Volpe, M. Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental

hypertension. *International Journal of Hypertension*. **2011**.
doi:10.4061/2011/281240.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**. 130, 2073S–2085S.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Rémésy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* **2002**. 56, 276-282.

Schartl, M.; Bocksch, W.; Dreysse, S.; Beckmann, S.; Franke, O.; Hünten, U. Remodeling of myocardium and arteries by chronic angiotensin converting enzyme inhibition in hypertensive patients. *J Hypertens Suppl.* **1994**. 12, S37–S42.

Shimoi, K.; Okada, H.; Furugori, M.; Goda, T.; Takase, S.; Suzuki, M.; Hara, Y.; Yamamoto, H. and Kinae, N. *FEBS Lett.* **1998**. 438, 220-224.

Schmitt, C.; Dirscha, V. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide.* **2009**. 21, 77–91.

Schiffrin, E. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *American Journal of Hypertension.* **2004**. 17, 1192–1200.

Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, CL.; Hollenberg, NK.; Sies, H; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, HH.; Kelm, M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2006**. 103: 1024-1029.

Setchell, KD.; Brown, NM.; Lydeking-Olsen, E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr.* **2002**. 132, 3577-3584.

Seymour, EM.; Singer, AA.; Kirakosyan, A.; Urcuyo-Llanes, DE.; Kaufman, PB.; Bolling, SF. Altered hyperlipidemia, hepatic steatosis, and hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in rats with intake of tart cherry. *J Med Food.* **2008**. 11(2), 252-9. doi: 10.1089/jmf.2007.658.

Shafiee, M.; Carbonneau, M.; Urban, N.; Descomps, B.; Leger, C. Grape and grape seed extract capacities at protecting LDL against oxidation generated by Cu²⁺, AAPH or SIN-1 and at decreasing superoxide THP-1 cell production. A comparison to other extracts or compounds. *Free Radical Research.* **2003**. 37,573–584.

Shaw, A. and Xu, Q. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2003**. 1, 41–58.

Shi, L.; Mao, C.; Xu, Z.; Zhang, L. Angiotensin-converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. *Drug discovery today.* **2010**. 15, 332-341.

Shivashankara, K.; Acharya, S. Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *The Open Nutraceuticals Journal*. **2010**. 3, 227-241.

Shimokawa, H.; Flavahan, N.; Lorenz, R.; Vanhoutte, P. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol*. **1988**. 95, 1197-1203.

Sies, H. Polyphenols and health: update and perspectives. *Archives of biochemistry and biophysics*. **2010**. 501, 2-5.

Skeggs, L.; Dorer, F.; Kahn, J.; Lentz, K.; Levine, M. The biochemistry of the renin-angiotensin system and its role in hypertension. *Am J Med*. **1976**. 60, 737-748.

Skidgel, R.; Erdos, E. The broad substrate specificity of human angiotensin I-converting enzyme. *Clin Exper Hyperten*. **1987**. A9, 243-259.

Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J. Clin. Lab. Anal*. **1997**, 11, 287-313.

Smith, S.J.; Cases, S.; Jensen, DR.; Chen, HC.; Sande, E.; Tow, B.; Sanan, DA.; Raber, J.; Eckel, RH.; Farese, RV Jr. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat Genet*. **2000**. 25, 87-90.

Sorrentino, SA.; Besler, C.; Rohrer, L.; et al., Endothelial vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation*. **2010**. 121, 110-122.

Spencer, J.; Mohsen, M.; Minihane, A and John C. Mathers. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*. **2008**. 99, 12-22.

Stamler, J.; Singel, D.; Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. **1992**. 258, 1898 - 1902.

Stoclet, J.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, N.; El Bedoui, J.; Chataigneau, M.; Schini-Kerth, V. Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*. **2004**. 299-313.

Sugiyama, H.; Akazome, Y.; Shoji, T.; Yamaguchi, A.; et al., Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2007**. 55, 4604-4609.

Svennerholm, L. Distribution of fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J Lipid Res*. **1968**. 9: 570-579.

Swell, L.; Trout, EC Jr.; Hopper, JR.; Field, H Jr.; Treadwell, CR. Specific function of bile salts in cholesterol absorption. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1958.** 98, 174–176.

Taddei, S.; Virdis, A.; Ghiadoni, L.; Magagna, A.; Salvetti, A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation.* **1998.** 97, 2222–2229.

Tagle, R.; Acevedo, M. Hipertensión arterial y dislipidemia: ¿puede la hipercolesterolemia favorecer el desarrollo de presión arterial elevada? *Boletín escuela de medicina U.C. Pontificia Universidad Católica de Chile.* **2007.** 32, N°2.

Tanaka, A. Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.* **2004.** 11, 322 -329.

Taniyama, Y.; Griendling, KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* **2003,** 42:1075-1081.

Tatsuno, T.; Jinno, M.; Arima, Y.; Kawabata, T.; Hasegawa, T.; Yahagi, N.; Takano, F.; Ohta, T. Anti-inflammatory and anti-melanogenic proanthocyanidin oligomers from peanut skin. *Biol Pharm Bull.* **2012.** 35, 909-916.

Taubert, D.; Berkeles, R.; Klaus, W.; Roesen, R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural feature. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2002.** 40, 701–713.

Terra, X., Valls, J.; Vitrac, X.; Merillon, J.; Arola, L. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF- κ B signaling pathway. *J. Agric. Food. Chem.* **2007.** 55, 4357-4365.

Therond, P. Catabolism of lipoproteins and metabolic syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **2009.** 12(4), 366-371. doi: 10.1097/MCO.0b013e32832c5a12.

Topouchian, J.; El Feghali, R.; Pannier, B.; Wang, S.; Zhao, F.; Smetana, K. et al. Arterial stiffness and pharmacological interventions—the TRAnsced arterial stiffNess Substudy (TRANS study). *Vasc Health Risk Manag.* **2007.** 3, 381–387.

Touyz, RM. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure. Implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol.* **2000.** 16, 1137-1146.

Touyz, RM.; Schiffrin, EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* **2004.** 122, 339-352.

Touyz, RM.; Schiffrin, EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal.* **2008.** 10,1041-1044.

Vallance, P.; Chan, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. **2001**. 85, 342-350.

Van Heek, M.; Farley, C.; Compton, D.; Hoos, L.; Alton, K.; Sybertz, E.; Davis, H. Jr. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. *Br J Pharmacol*. **2000**. 129, 1748-1754.

Vera, R.; Galisteo, M.; Villar, I.; Sánchez, M.; Zarzuelo, A.; Pérez-Vizcaino, F.; Duarte, J. Soy isoflavones improve endothelial function in spontaneously hypertensive rats in an estrogen-independent manner: role of nitric-oxide synthase, superoxide, and cyclooxygenase metabolites. *JPET*. **2005**. 314, 1300-1309.

Vergnani, L.; Hatrik, S.; Ricci, F.; Passaro, A.; Manzoli, N.; et al., Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation*. **2000**. 101(11), 1261-1266.

Vidal, R.; Hernandez-Vallejo, S.; Pauquai, T.; Texier, O. et al., Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in caco-2/tc7 enterocytes. *J. Lipid Res*. **2005**. 46, 258-268.

Vinson, J.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J. Agric. Food Chem*. **2001a**. 49, 5315-5321.

Vinson, J.; Teufel, K.; Wu, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. **2001b**. 156, 67-72.

Virdis, A.; Duranti, E.; Taddei, S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of angiotensin II. *International Journal of Hypertension*. **2011**, Article ID 916310, 7 pages doi:10.4061/2011/916310.

Vita, JA. Endothelial function. *Circulation*. **2011**. 124(25):e906-12. doi: 10.1161.

Voshol, PJ.; Schwarz, M.; Rigotti, A.; Krieger, M.; Groen, AK.; Kuipers, F. Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *Biochem J*. **2001**. 356: 317-325.

Wang, X., Wang, L.; Cheng, X.; Zhou, J.; Tang, X.; Mao, Xue-Ying. Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. **2012**. 134, 122.

Wilson, M.; Rudel, L. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J Lipid Res*. **1994**. 35, 943-955.

- Williams, C. Grayer, R. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**. 21, 539–573
- Willis, A.; Pierre-Paul, D.; Sumpio, B. and Gahtan, V. Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc. Endovasc. Surg.* **2004**. 38, 11–23.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. **2001**.126, 485-493
- Wolfe, K.; Hai Liu, R. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**. 56, 8404-8411.
- Wolinsky, H. Response of the rat aortic media to hypertension. Morphological and chemical studies. *Circ Res* .**1970**. 26, 507–522.
- Wu, K; Thiagarajan, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu. Rev. Med.* **1996**. 47, 315-331.
- Xia, E.; Dena, G.; Guo, Y.; Li, H. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol. Sci.* **2010**. 11, 622-646.
- Yang, T.; Koo, M. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci.* **2000**. 66: 411–423.
- Yao, L.; Heubi, JE.; Buckley, DD.; Ferra, H.; Setchell, KD.; Granholm, NA.; Tso, P.; Hui, DY.; Woollett, LA. Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy humans: solubilization of cholesterol after a meal. *J Lipid Res.* **2002**. 43: 654–660.
- Yao, A. Recent advances and future perspectives in therapeutic strategies for pulmonary arterial hypertension. *J Cardiol.* **2012**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcc.2012.08.009>
- Yen, CL.; Stone, SJ.; Koliwad, S.; Harris, C.; Farese, RV Jr. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* **2008**. 49, 2283–2301.
- Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Takada, M.; Matsuda, H. Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. *J Nutr.* **2002**. 132, 1819-1824.
- Yoshizumi, K.; Hirano, K.; Ando, H.; Hirai, Y.; Ida, Y.; Tsuji, T.; Tanaka, T.; Satouchi, K.; Terao, J. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. *J Agric Food Chem.* **2006**. 25, 335-341.

Yun, A.; Doux, J.; Bazar, K. and Lee, P. Adventitial dysfunction: an evolutionary model for understanding atherosclerosis. *Med. Hypotheses*. **2005**. 65, 962–965.

Zhang, Y.; Park, Y.; Kim, T.; Fang, L.; Ahn, H.; Hong, J.; Kim, Y.; Lee, C.; Yun, Y. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen. Pharmacol*. **2002**. 35, 341-34

Zern, T.L.; Wood, R.J.; Greene, C.; West, K.L., et al., Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr*. **2005**. 135, 1911-1917.

*“Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir”*

(T.S. Elliot)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DEL EFECTO CORRECTOR DE LA SÍNTESIS DE LÍPIDOS Y LA HIPERTENSIÓN DE EXTRACTOS
RICOS EN POLIFENOLES
Ligia Stella Guerrero Orjuela
Dipòsit Legal: T.457-2013