

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto de cocoanox, un cacao rico en polifenoles, en ratas  
espontáneamente hipertensas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María del Mar Quiñones Téllez**

**Directoras**

**María Amaya Aleixandre de Artiñano  
Marta Miguel Castro.**

**Madrid**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología



**EFFECTO DE COCOANOX, UN CACAO RICO EN  
POLIFENOLES, EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE  
HIPERTENSAS**

**TESIS DOCTORAL**



**M<sup>a</sup> del Mar Quiñones Téllez  
Madrid, 2010**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología



# **EFFECTO DE COCOANOX, UN CACAO RICO EN POLIFENOLES, EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS**

Memoria presentada por:

**M<sup>a</sup> del Mar Quiñones Téllez**

Para optar al grado de  
Doctor en Farmacología

Directores:

**Dra. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano**  
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina (UCM)  
**Dra. Marta Miguel Castro**  
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Farmacología



**M<sup>a</sup> AMAYA ALEIXANDRE DE ARTIÑANO, CATEDRÁTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Y MARTA MIGUEL CASTRO INVESTIGADORA RAMÓN Y CAJAL DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC,**

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo titulado “Efecto de CoconOX, un cacao rico en polifenoles, en ratas espontáneamente hipertensas”, que constituye la Memoria que presenta la Licenciada M<sup>a</sup> del Mar Quiñones Téllez para optar al grado de Doctor, se ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 3 de Mayo de 2010

Fdo. M<sup>a</sup> Amaya Aleixandre de Artiñano

Fdo. Marta Miguel Castro



*A mis padres*



## **Agradecimientos**

*Quisiera mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una manera u otra han colaborado y han hecho posible que este sueño se haya hecho realidad.*

*En primer lugar quiero dar las gracias a mis Directoras de Tesis. A la Dra María Amaya Aleixandre, agradecer de manera especial y sincera su confianza en mí para llevar a cabo este Proyecto, su apoyo en mi trabajo, su trato agradable y amistoso tanto en lo profesional como en lo personal, y su gran calidad científica y humana demostrada a lo largo de todos estos años. Amaya han sido muchos los recuerdos y momentos buenos que hemos compartido, ha sido todo un placer y una suerte el haberte conocido y haber llevado a cabo este Proyecto juntas. Agradecer a la Dra. Marta Miguel, su apoyo y su ánimo, que han sido imprescindibles para que este trabajo llegue a un feliz término. Gracias Marta, porque además de tu gran calidad científica, ampliamente reconocida, has sido mi confidente, amiga, compañera, gracias por tu infinita calidad humana demostrada tanto en lo profesional como en lo personal, eres una de esas personas con las que siempre se puede contar y ha quedado más que demostrado a lo largo de todos estos años. Gran parte de este Proyecto ha llegado a su fin gracias a ti, que siempre has colaborado y has estado ahí ayudándome, mi más sincero agradecimiento y mi cariño. Mil gracias Amaya y Marta por hacer que me haya sentido como en casa durante todos estos años fuera, eternamente agradecida.*

*Mi etapa investigadora en Málaga, en el Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, antes de integrarme en el Departamento de Farmacología, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, fue también fundamental para poder realizar después mi Tesis Doctoral en este Departamento. Quiero agradecer al Dr. Jose Luís Urdiales y a la Dra. Francisca Sánchez, Directores de la investigación que realicé para conseguir el Diploma de Estudios Avanzados, y a todos mis compañeros por tan buenos años compartidos. Especial agradecimiento al Dr. Ignacio Fajardo y a la Dra. Nandy, por tan buenos consejos tanto en lo profesional como en lo personal.*

*Quiero también dar las gracias al Dr. Pedro Lorenzo, anterior Director del Departamento de Farmacología, y al Dr. Ignacio Lizasoain, actual director, por permitirme realizar en su Departamento esta Tesis Doctoral, y facilitarme los medios necesarios para su realización.*

*Gracias a todos los componentes del Departamento de Farmacología, en especial al Dr. Juan Carlos Leza y al Dr. Francisco Pérez Vizcaíno, por su siempre amable disposición y colaboración en todo lo requerido. De igual forma agradecer al personal administrativo y técnico del Departamento, su ayuda. A M<sup>a</sup> Elena por su siempre necesaria ayuda administrativa. A Fernando y M<sup>a</sup> Luisa por su ayuda siempre que ha sido requerida. Un agradecimiento muy especial a Manolo Bas, por su colaboración infinita durante todo el desarrollo de la Tesis, parte de este trabajo también es tuyo, gracias por tantas enseñanzas y por tan buenos momentos compartidos.*

*Un especial agradecimiento a la Dra. Mercedes Salaíces, y a todos los componentes de su grupo, que en todo momento han colaborado y me han ayudado, durante mis estancias en su laboratorio, en la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Madrid.*

*Agradecer a Rosario Hernández, Lcda. en Farmacia, del Hospital Central de la Defensa, que siempre ha estado dispuesta a colaborar desinteresadamente, en las determinaciones bioquímicas complementarias de mis trabajos, para esta Tesis Doctoral. Muchas gracias por tu colaboración en todo lo requerido.*

*Quisiera dar las gracias a la empresa Natraceutical Group, por financiar este Proyecto. Personalmente quiero agradecer a la Dra. Begoña Muguerza por su continuo apoyo, su ánimo y su esfuerzo, a lo largo de toda la Tesis Doctoral. Muchas gracias también a la Dra. Leila Moulay y a Sara Laghi, por su colaboración a lo largo de estos años.*

*Quisiera dar las gracias a mi compañero de laboratorio, David por estar ahí desde el comienzo de mi Tesis Doctoral y por su ayuda y su colaboración durante mi formación en el manejo de las ratas. Agradecer también a los nuevos becarios del laboratorio, por darle sentido a todo lo aprendido. Mi agradecimiento también a todos*

*mis compañeros del Departamento de Farmacología, por ser una gran familia y por tan buenos momentos compartidos durante esos almuerzos y celebraciones de Tesis. Especial agradecimiento a Víctor, Mónica, Isaac, Nieves, Marta, Jorge, Iciar, David, Iván, Roberto, Carmen, Miguel, Javi, David, Andrés, Inés, Noemí, Andrea, Elisa, Jesús, Olivia.*

*También agradecer al Instituto de Fermentaciones Industriales, tanto a su Directora Lourdes Amigo, como a la Dra. Elena Molina y a la Dra. Rosina López-Fandiño por darme una nueva oportunidad y permitirme colaborar en su grupo. Gracias por acogerme como una más de vosotros y hacerme sentir tan bien en esta última etapa de la Tesis. Me llevo muy buenos recuerdos de todos y un gran cariño. Un agradecimiento especial a mis compañeros Marta, Carlos, Asun, Rodrigo, Gustavo, David, Dani, Marcos, Pedro, Paqui, Sara, Yolanda, Mar, Inma, Wilman, Carolina, Laura y Consti.*

*Quiero dar las gracias a mi familia, por su comprensión y por su total confianza y apoyo en los momentos decisivos y durante toda esta aventura, gracias por confiar siempre en mí y por darme todas las oportunidades posibles. A mi madre, por su eterna comprensión, amor y dulzura, y a mi padre por su entrega en todo lo que hace, fortaleza y claro ejemplo a seguir. A mi hermano Rafa, por estar ahí siempre ayudándome y por tu colaboración cuando ha sido necesaria en temas administrativos de títulos y ordenadores. Por ellos y para ellos... os dedico hoy todo este trabajo.*

*En un apartado especial quiero agradecer a todos los amigos que han hecho que esta aventura sea realmente inolvidable, tanto a los que vinieron de Málaga y estuvieron conmigo en esos comienzos, para darme todo su apoyo, Mari Carmen, Emilio, Bárbara, Tamara, Mayo, Félix, mi primo Rafa, como a todos los que han pasado estos años conmigo compartiendo todo lo mejor juntos. Mi agradecimiento a María José, a mi prima Paqui, a mi compañero Fernando, a mi compañera Amada. Un especial agradecimiento a las Dras. Nuri y Bea, trío "power-rizo" por ser mis consejeras y por estar siempre ahí, dispuestas a ayudarme en todo, por vuestro infinito cariño y por tan sabios consejos, mis "hermanas mayores" en los Madriles, gracias por tan buenos momentos compartidos y gran ejemplo a seguir. Mi agradecimiento también a Juan Andrés, por estar ahí en esos comienzos, y por ser el creador de todo, incluso en la distancia.*

*Gracias a mis amigos de siempre de Málaga, porque cuando veía todo negro, el bajar y encontrarme de nuevo con todos vosotros, hacía que volver a empezar por aquí arriba fuese algo más fácil.*

*Un agradecimiento muy especial, para tí Pana, que llegaste justo cuando más te necesitaba y cuando más duro se hacía el camino, gracias por tu eterna comprensión, tu cariño, sabiduría y paciencia, por tu confianza infinita en mí, incluso cuando yo la perdía, porque sin tu apoyo en los momentos difíciles, que no han sido pocos, no sé si hubiera conseguido poner fin a esta última etapa de la Tesis, eternamente agradecida.*

*Y agradecer a todo aquel que ha sentido como suya esta aventura y a todo aquel que haya podido olvidar a lo largo de estos agradecimientos. Gracias a todos.*

*Este es inevitablemente el final de una etapa profesional y posiblemente también personal. Mucho ha sido lo aprendido y también muchos los errores cometidos, aunque al final con esfuerzo, entrega y sobre todo muchísima ilusión, he llegado a concluir esta Tesis Doctoral. Quisiera despedirme con esta última frase, y agradecer a todos, que hayáis querido compartir todas estas vivencias conmigo:*

*“Deja que con tu colaboración, cada cual llegue a donde sea capaz”*

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>7</b>
<b>1.1 La hipertensión arterial como enfermedad en el momento actual</b>	<b>9</b>
<b>1.2 Principales factores y mecanismos implicados en la regulación del tono arterial</b>	<b>14</b>
1.2.1 Efectos en el músculo liso vascular y en el endotelio	14
1.2.2 Sistema renina-angiotensina	20
1.2.3 Balance redox en el organismo	29
1.2.3.1 Especies reactivas de oxígeno	29
1.2.3.2 Estrés oxidativo e hipertensión arterial	36
1.2.3.3 Sistemas de defensa antioxidante	39
1.2.3.3.1 Sistemas antioxidantes primarios	40
1.2.3.3.2 Sistemas antioxidantes secundarios	42
1.2.3.3.3 Sistemas antioxidantes terciarios	45
1.2.4 Tratamiento antioxidante de la hipertensión	45
<b>1.3 Polifenoles: flavonoides</b>	<b>48</b>
1.3.1 Origen, estructura y distribución	48
1.3.2 Biodisponibilidad de los polifenoles	60

1.3.3 Propiedades beneficiosas a nivel cardiovascular de los flavonoides	64
1.3.3.1 Efectos vasodilatadores	67
1.3.3.2 Efectos antilipémicos y antiateroscleróticos	68
1.3.3.3 Efecto antitrombótico	71
1.3.3.4 Efecto antiinflamatorio	72
1.3.3.5 Efecto apoptótico y antiapoptótico	73
<b>1.4 El cacao</b>	<b>76</b>
1.4.1 Historia del cacao	76
1.4.2 Estructura, composición y procesamiento del grano de cacao	78
1.4.3 Consumo de cacao e hipertensión arterial	84
<b>1.5 Ingredientes bioactivos y alimentos funcionales</b>	<b>87</b>
<b>1.6. CoccoanOX</b>	<b>91</b>
1.6.1 Proceso de fabricación de CCX	91
1.6.2 Propiedades biológicas de CCX	93
<b>1.7 La rata espontáneamente hipertensa como modelo animal para el estudio de la hipertensión arterial</b>	<b>96</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>99</b>
<b>3. METODOLOGÍA Y RESULTADOS</b>	<b>103</b>

---

<b>3.1 Relación de Publicaciones</b>	<b>105</b>
I. Antihypertensive effect of polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids in cocoa beans. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> . 2009, 57, 6156-6162.	107
II. Long-term intake of CocioanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. <i>Food Chemistry</i> . 2010, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.059	117
III. Antihypertensive effect of the main polyphenols contained in a cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. <i>Enviado para su publicación al British Journal of Nutrition</i> .	127
IV. Contribution of different mechanisms to explain the antihypertensive effect of CocioanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. <i>Enviado para su publicación al Journal of Nutritional Biochemistry</i> .	147
V. Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. <i>Enviado para su publicación al Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> .	179
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>203</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>235</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>241</b>
	<b>277</b>



## **LISTA DE ABREVIATURAS**



ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP <sub>c</sub>	Adenosín monofosfato cíclico
ARA II	Antagonista de los receptores AT <sub>1</sub> de la angiotensina II
AT <sub>1</sub>	Receptor de angiotensina tipo 1
AT <sub>2</sub>	Receptor de angiotensina tipo 2
AT <sub>3</sub>	Receptor de angiotensina tipo 3
AT <sub>4</sub>	Receptor de angiotensina tipo 4
CCX	CocooanOX
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
DAG	D-1,2-Diacilglicerol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EFSA	European Food Safety Authority
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ESC	Sociedad Europea de Cardiología
ESH	Sociedad Europea de Hipertensión
SEM	Error estándar de la media
ET <sub>A</sub>	Receptor de endotelina tipo A
FOSHU	Foods for specified health use
FUFOSE	Functional Food Science in Europe
GMP <sub>c</sub>	Guanosín monofosfato cíclico
GPx	Glutation Peroxidasa
GR	Glutation Reductasa

GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
HClO	Ácido hipocloroso
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HHL	Hipuril histidil leucina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HOONO	Radical dióxido de nitrógeno
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
ILSI	Internacional Life Science Institute
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteína de baja densidad
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil ester
LPO	Lipooxigenasa
MDA	Malonildialdehído
mm Hg	Milímetros de mercurio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
OH <sup>•</sup>	Radical hidroxilo
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PDE	Fosfodiesterasa
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
$\text{PGI}_2$	Prostaciclina
PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
R	Radical alquilo
RH	Ácido graso poliinsaturado
$\text{ROO}^\bullet$	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
SRA	Sistema Renina angiotensina
$\text{TNF}\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
$\text{TXA}_2$	Tromboxano $A_2$
WKY	Ratas Wistar-Kyoto



# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



## **1.1 La hipertensión arterial como enfermedad en el momento actual**

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre que bombea el corazón sobre las arterias. La hipertensión arterial es, por consiguiente, el aumento de la presión arterial por encima de unos valores normales. Tradicionalmente, la hipertensión arterial se ha definido en base a las cifras de presión arterial diastólica (PAD). Sin embargo, actualmente existen evidencias de que la presión arterial sistólica (PAS) es decisiva como factor de riesgo cardiovascular y, por tanto, la hipertensión arterial debe definirse en función de ambos valores PAS y PAD (MacMahon et al., 1990; Lewington et al., 2002).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en 2005 murieron por esta causa 17,5 millones de personas al año, lo cual representa un 30 % de todas las muertes registradas en el mundo. Se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas al año a nivel mundial por enfermedad cardiovascular.

La hipertensión arterial es uno de los principales factores de riesgo implicados en la enfermedad cardiovascular. La hipertensión arterial ocasiona el 13,5% de las muertes prematuras a nivel mundial (aproximadamente 7,6 millones de personas al año). Los estudios estadísticos han revelado que la mayoría de las muertes por hipertensión se producen en países en vías de desarrollo en los que han alcanzado cifras de 6,2 millones de muertes por esta enfermedad. En los países desarrollados se alcanzan cifras de aproximadamente 1,4 millones de muertes anuales causadas por esta misma patología. Además, el 54% de los accidentes cerebrovasculares y el 47% de las enfermedades cardíacas son consecuentes a esta patología. Se ha estimado que en el año 2025 la hipertensión habrá aumentado un 24% en los países desarrollados y hasta un 80% en los países en vías de desarrollo (Messerli et al., 2007).

Las enfermedades cardiovasculares son asimismo la primera causa de muerte en España. En nuestro país la hipertensión arterial es, además el factor de riesgo cardiovascular más frecuente. La hipertensión en España afecta en torno a 12 millones de personas. De hecho, la incidencia de esta enfermedad en la población general adulta de nuestro país es de aproximadamente un 35%, llegando a aumentar esta cifra hasta valores de un 40% en edades medias y un 68% en adultos mayores de 65 años (Banegas et al., 2005). En términos absolutos, se estima que la hipertensión está relacionada con la muerte de unas 40.000 personas al año en la población española con una edad igual o mayor de 50 años (Graciani et al., 2008).

La hipertensión arterial puede clasificarse en hipertensión primaria o esencial, e hipertensión secundaria. La hipertensión esencial tiene un origen desconocido. Es la hipertensión con mayor incidencia en la población, y la padecen aproximadamente el 95% de los hipertensos observados en la clínica. Aunque la hipertensión esencial cursa sin causa orgánica evidente, existen diversos aspectos fisiopatológicos que la caracterizan. Entre ellos, la disfunción endotelial (Swales, 1995) y el remodelado de la pared de las arterias de resistencia (Folkow, 1990; Mulvany, 1994). Se conocen además distintos factores controlables que contribuyen a su desarrollo y mantenimiento. Entre ellos, la dieta (especialmente el exceso en el consumo de sal), el sedentarismo y el consumo excesivo de alcohol. También existen algunos factores no controlables, como la carga genética, la raza (existen valores de presión arterial más elevados en la raza negra que en la blanca) (Burt et al., 1996), el género (los hombres presentan un mayor riesgo de ser hipertensos hasta los 55 años, y a partir de esa edad el riesgo para hombres y mujeres se iguala) o la edad (la probabilidad de presentar hipertensión aumenta con la edad) (Swales, 1995). La hipertensión esencial se considera, en realidad, una enfermedad de origen multifactorial que se desarrolla como resultado de interacciones complejas entre genes susceptibles, muchos de ellos aún desconocidos, y factores ambientales. Ambos determinantes influyen en los mecanismos neuronales, hormonales, celulares y subcelulares que regulan la presión arterial, dando como resultado una elevación crónica de la misma (Carretero & Oparil, 2000).

También se sabe que el desarrollo de hipertensión esencial suele estar asociado a otras alteraciones como la obesidad, la diabetes *mellitus*, la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, que caracterizan lo que hoy día se denomina síndrome metabólico, y que, junto con la propia hipertensión, son importantes factores de riesgo de accidentes cardiovasculares (Mancia et al., 2007; Wassink et al., 2007).

La hipertensión secundaria tiene, por el contrario, una etiología conocida, y la padecen el 5% de los pacientes hipertensos. Se puede atribuir a la existencia de enfermedades renales o alteraciones de las arterias renales, a un estrechamiento de la aorta, o a anomalías en la secreción de diversas hormonas (como las producidas por las glándulas suprarrenales o el tiroides).

Aunque la detección y el control de la hipertensión arterial son relativamente sencillos, la realidad es que muchos pacientes hipertensos no tienen conocimiento de su situación, y otros están diagnosticados pero reciben un tratamiento inadecuado. Aunque los datos epidemiológicos varían de unos estudios a otros, podemos decir que de cada 10 hipertensos adultos tratados farmacológicamente en España, prácticamente 8 no están bien controlados (Guía Española de la hipertensión arterial, 2005).

El hecho de que la hipertensión arterial sea, según datos de la Organización Mundial de la Salud, una de las primeras causas de mortalidad en el mundo, ha determinado que a lo largo de los años hayan disminuido las cifras de presión arterial que se consideran óptimas para cada población (Ezzati et al., 2002). Estas cifras han disminuido progresivamente a medida que se ha profundizado en el conocimiento de esta enfermedad y de sus consecuencias. Hasta hace una década aproximadamente, se consideraban normales los valores de PAS inferiores a 140 mm Hg y los valores de PAD inferiores a 90 mm Hg. En el año 2003, las Sociedades Europea y Americana de Hipertensión propusieron unas clasificaciones en las que se incluyeron nuevas categorías, tales como la de presión arterial óptima, normal y normal alta (clasificación de la Sociedad Europea de Hipertensión), o presión arterial

normal y pre-hipertensión (clasificación de la Sociedad Americana de Hipertensión). También se han establecido grados en la clasificación de la hipertensión: “grado 1, grado 2 y grado 3”, según la clasificación europea, y “estadío 1 y estadío 2”, de acuerdo con la clasificación americana (Chobanian et al., 2003). (Figura 1).

	Normotensión o HTA controlada			HTA		
Según la Guía Europea	Óptima	Normal	Normal-alta	Grado 1	Grado 2	Grado 3
<b>PAS (mm Hg)</b>	<120	120-129	130-139	140-159	160-179	>180
<b>PAD (mm Hg)</b>	<80	80-84	85-89	90-99	100-109	>110
Según la Guía Americana	Normal	Prehipertensión		Estadío 1	Estadío 2	

**Figura 1.** Clasificación de la hipertensión arterial. PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica. Según la Guía Europea (ESH/ESC, 2003). Según la Guía Americana (Chobanian et al., 2003).

En el año 2007, un comité formado por expertos pertenecientes a las Sociedades Europea de Hipertensión y Europea de Cardiología (ESH/ESC), realizó una revisión de las cifras aceptadas en las guías del 2003, y estableció algunas modificaciones. Entre las consideraciones más importantes, hay que destacar que se decidió no utilizar la terminología americana que englobaba la presión arterial “normal” y “normal alta” como “pre-hipertensión”. Entre otras razones, se argumentó que el riesgo cardiovascular de ambos grupos de pacientes no era el mismo, y que por tanto, no debían ser tratados ambos de forma similar. También se señaló que dado el significado negativo del término “hipertensión”, la palabra “pre-hipertensión” podía causar ansiedad en algunos pacientes. También se hizo mención a la importancia de la hipertensión sistólica aislada ( $PAS \geq 140$  mm Hg), y a la elevación de la presión de pulso,

que se define como la diferencia entre la PAS y la PAD, y se considera un indicador de la distensión arterial (Mancia et al., 2007).

En la actualidad, desde luego las cifras de 140 mm Hg para la PAS y de 90 mm Hg para la PAD se consideran altas, como límites que definen la hipertensión, y se aceptan los valores de 130 mm Hg y 85 mm Hg como los límites de PAS y PAD que definen esta enfermedad.

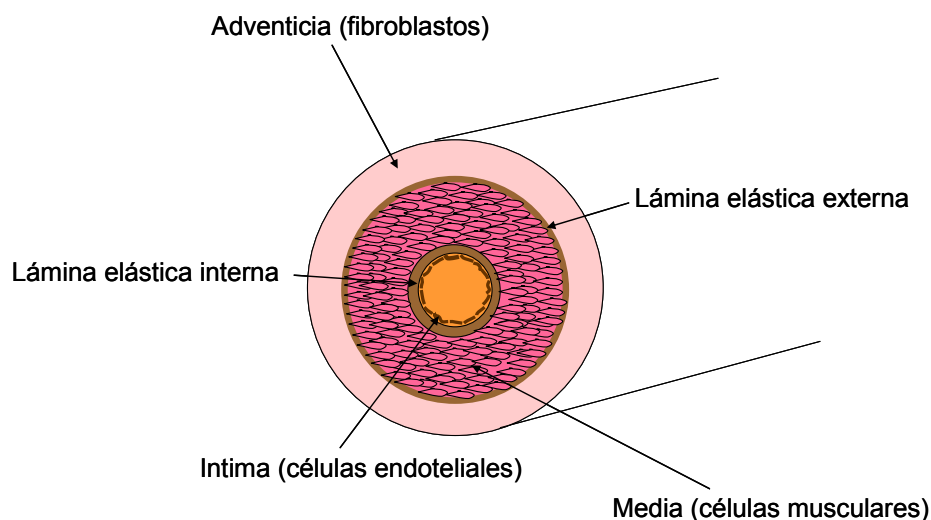
Otro aspecto importante que resaltan las nuevas guías, es la necesidad de tener en cuenta lo que se ha denominado “riesgo cardiovascular global” para el tratamiento de la hipertensión arterial. Es decir, hay que tener en cuenta, que además de las cifras aisladas de presión arterial, la presencia en el paciente de otros factores de riesgo cardiovascular pueden ser importante, pues la gran mayoría de los pacientes presentan además de hipertensión, dislipidemias, obesidad, y diabetes, entre otras patologías.

## 1.2 Principales factores y mecanismos implicados en la regulación de la presión arterial

En el músculo liso vascular existen distintos receptores que facilitan la contracción o la relajación de este tejido. Estos receptores controlan por consiguiente el tono vascular y la presión arterial. El endotelio también desempeña un papel fundamental para el control del tono arterial, ya que en él se sintetizan distintos factores vasoactivos. Es además importante el control que ejerce el sistema renina-angiotensina sobre el tono arterial, y en este momento también se sabe que el estado redox del organismo puede ser determinante para la homeostasis vascular. En los siguientes apartados comentaremos más ampliamente todas estas cuestiones.

### 1.2.1 Efectos en el músculo liso vascular y en el endotelio

La pared de las arterias está constituida por tres capas perfectamente diferenciadas morfológicamente: íntima (o endotelio), media y adventicia. El endotelio y la capa media están separadas por la lámina elástica interna, y a su vez, la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa (Rhodin, 1978) (Figura 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura de la pared arterial.

La capa media está formada principalmente por músculo liso, y funciona como el sistema efector de la contracción y la relajación vascular. Diversas hormonas y mediadores químicos son capaces de estimular la contracción de la musculatura lisa. Las sustancias efectoras más importantes y relevantes para la contracción del músculo liso vascular son la noradrenalina, la angiotensina II y la endotelina-1.

La división de los receptores adrenérgicos en receptores  $\alpha$  y  $\beta$  se debe a Ahlquist (Ahlquist, 1948), quien tras un estudio con adrenalina, noradrenalina e isopropanol, propone la existencia de estos dos tipos de receptores basándose en la distinta sensibilidad de los compuestos en estudio. Los receptores  $\beta$  se subdividieron en  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , según su localización en tejido cardiaco o en músculo liso y células glandulares respectivamente. Más tarde, la identificación del gen que codifica el receptor adrenérgico  $\beta_3$  ha ayudado a interpretar los resultados de los experimentos farmacológicos en los que se identificaron efectos atípicos de las catecolaminas, diferentes de los observados tras la activación de los receptores adrenérgicos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (Arch et al., 1984). Los receptores  $\beta$  fueron los que primero se estudiaron debido a los efectos terapéuticos tan importantes que mostraron los  $\beta$ -bloqueantes sobre la hipertensión, angina de pecho e isquemia de miocardio; y debido también a los efectos de los  $\beta$ -estimulantes en la terapéutica asmática (Lands et al., 1967)

En contraste, fue ya en la década de los setenta cuando se iniciaron los estudios sobre los receptores  $\alpha$  (Van Zwieten et al., 1984). La necesidad de introducir una nomenclatura similar a la de los receptores  $\beta$ , para los receptores  $\alpha$ , llevó a Langer (Langer, 1974) a clasificar los receptores presinápticos como  $\alpha_2$  y los postsinápticos como  $\alpha_1$ . Pronto se demuestra que esta clasificación basada en el lugar anatómico en que se encuentran resulta inapropiada, puesto que difícilmente se podrían clasificar de presinápticos los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos de las plaquetas (Grant & Scrutton, 1979). Se hacía necesario una revisión de los términos, y diversos autores, entre los que destaca Langer (Langer, 1980), propusieron una clasificación de los receptores  $\alpha$  basada en la

localización anatómica de estos receptores respecto a la neurona y a la sinapsis (pre y postináptico) y los denominaron  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  según la preferencia que mostraban distintos agonistas y antagonistas por ella; en definitiva, según la afinidad química, pero no la localización anatómica (Timmermans & van Zwieten, 1981, 1982; Starke, 1981). Los ligandos para el receptor  $\alpha_1$  y el receptor  $\alpha_2$  son la adrenalina y la noradrenalina. Un receptor  $\alpha_1$  tiende a unirse a una proteína  $G_q$ , activa la fosfolipasa C y aumentan la formación de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) causando la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico, y provocando así la contracción de la musculatura lisa. Los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , a su vez, se unen con una proteína  $G_i$ , que reduce la actividad del AMPc, produciendo así la contracción del músculo liso.

Los receptores  $\alpha$  comparten varias funciones en común. Los efectos comunes más destacados incluyen vasoconstricción de las arterias coronarias (Woodman & Vatner, 1987), vasoconstricción de venas (Elliott, 1997) y disminución de la motilidad del músculo liso en el tracto gastrointestinal (Sagrada et al., 1987). Las acciones específicas del receptor  $\alpha_1$  principalmente incluyen la contracción del músculo liso. La activación de este receptor causa vasoconstricción de muchos vasos sanguíneos incluyendo los de la piel, el riñón (arteria renal) (Schmitz, 1981) y el cerebro. Otros efectos adicionales incluyen la glucogenolisis y la gluconeogénesis del tejido adiposo y el hígado, así como la secreción de las glándulas salivales y la reabsorción de sodio en los riñones. Algunos antagonistas pueden utilizarse en la hipertensión. Las acciones específicas de los receptores  $\alpha_2$  incluyen la inhibición de la liberación de insulina del páncreas, la inducción de la liberación de glucagón del páncreas, la contracción de los esfínteres del tracto gastrointestinal, la agregación plaquetaria, la inhibición de la descarga de noradrenalina y acetilcolina y vasoconstricción. Existen tres subtipos homólogos de los receptores  $\alpha_2$ :  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$ , y  $\alpha_2C$ .

El receptor presináptico  $\alpha$  está localizado a nivel de la membrana de la fibra postganglionar, próximo a las vesículas de las varicosidades. La

excitación del receptor presináptico  $\alpha$  adrenérgico, ya sea por agonistas endógenos neurotransmisores como noradrenalina o adrenalina, o por agonistas exógenos como es el caso de fármacos  $\alpha$  simpaticomiméticos, inhibe la liberación de noradrenalina de las vesículas. El receptor postsináptico  $\alpha$  está localizado en el órgano diana. A nivel vascular, si se excita por un neurotransmisor o por un agonista, ocasiona una vasoconstricción con aumento de la presión arterial (Reid, 1985). Los receptores presinápticos son fundamentalmente del subtipo  $\alpha_2$  adrenérgico y en menor proporción del subtipo  $\alpha_1$  (Kobinger & Pichler, 1980). Los receptores postsinápticos son de ambos subtipos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  en una proporción que es muy aproximada a 1:1; produciendo ambos estímulos vasoconstricción. La localización de los subtipos postsinápticos respecto a la propia sinapsis es distinta. El receptor postsináptico  $\alpha_1$  está localizado intrasinapsis, en contacto con los nervios “noradrenérgicos”, siendo de esta forma rápidamente accesible al neurotransmisor noradrenalina. En el caso de que el órgano diana sea una arteria, su posición anatómica se corresponde con la capa adventicia. El receptor postsináptico  $\alpha_2$  se localiza más alejado de la zona de sinapsis, y en el caso de las arterias se localiza en la túnica íntima (Langer & Shepperson, 1982; Van Zwieten, 1986).

Los receptores  $\beta$  se unen a la proteína  $G_s$  y aumentan la concentración intracelular del AMPc, produciendo la contracción del músculo cardíaco, la relajación del músculo liso y glucogenolisis. El receptor  $\beta_1$  es el receptor predominante en el corazón, y produce efectos inotrópicos positivos (aumento de la fuerza de contracción) y cronotrópicos positivos (aumento de la frecuencia cardíaca). Las acciones específicas de los receptores  $\beta_1$  influyen en el aumento del gasto cardíaco al aumentar la frecuencia cardíaca y al aumentar el volumen expelido en cada contracción cardíaca por medio del aumento en la fracción de eyección, la liberación de renina de las células yuxtglomerulares y la lipolisis en el tejido adiposo. El receptor  $\beta_2$  es un receptor polimórfico y es el receptor adrenérgico predominante en el músculo liso. Sus funciones conocidas incluyen la relajación de la musculatura lisa en los bronquios, la relajación del

esfínter urinario, los músculos gastrointestinales y el útero grávido, la relajación de la pared de la vejiga, la dilatación de las arterias del músculo esquelético, la glucogenolisis y la gluconeogénesis, el aumento de las secreciones de las glándulas salivales, la inhibición de la liberación de histamina de los mastocitos y el aumento de la secreción de renina del riñón. El receptor  $\beta_3$  adrenérgico, causa predominantemente efectos metabólicos, por lo que las acciones específicas del receptor  $\beta_3$  incluyen, por ejemplo, la estimulación de la lipólisis del tejido adiposo. En las células del tejido adiposo pardo y blanco, estos receptores se unen al adenilato ciclasa III, y estimulan la generación de AMPc. Estas propiedades de los receptores  $\beta_3$  hacen que su activación sea un arma farmacológica muy potente contra la obesidad; más allá del efecto anoréxico su valor radica en su capacidad para eliminar la grasa acumulada (Valet & Saulnier-Blache, 1999).

La angiotensina II también actúa en receptores localizados en el músculo liso vascular que se comentarán en el apartado 1.2.2.

Durante muchos años, se pensó que sólo era relevante la capa media de la pared vascular, y que eran los receptores localizados en músculo liso vascular los que controlaban prioritariamente el tono arterial. Las investigaciones de Furchgott en 1980 cambiaron muchas de las ideas sobre la funcionalidad vascular vigentes hasta entonces. Furchgott y Zawadki demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de la presencia de endotelio (Furchgott & Zawadki, 1980). Esta relajación se debía a la liberación de un factor lábil, que se denominó inicialmente factor relajante derivado de endotelio, y que se identificó posteriormente como óxido nítrico (NO) (Furchgott, 1999). Por otra parte, Moncada y Vane, en 1984, habían también señalado que el endotelio era capaz de liberar prostaciclina ( $PGI_2$ ). La  $PGI_2$ , fue en realidad el primer factor relajante vascular derivado del endotelio que se caracterizó (Moncada & Vane, 1984). Estos hallazgos permitieron establecer que el endotelio no era una simple barrera física entre la sangre y la musculatura lisa vascular. Se llegó a la

conclusión de que el tono vascular estaba regulado por factores vasodilatadores y vasoconstrictores liberados mayoritariamente por el endotelio vascular. En realidad, hoy día se sabe que el endotelio actúa como una extensa glándula endocrina y paracrina.

El endotelio es un tejido activo y dinámico que se distribuye por todo el organismo. Este tejido está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis vascular en situaciones fisiológicas y puede perder su funcionalidad en diversos estados patológicos. Las células endoteliales cumplen funciones de soporte en los vasos sanguíneos y regulan el transporte de macromoléculas y sustancias entre el plasma y el intersticio. También producen moléculas o factores biológicamente activos que pueden liberarse como respuesta a estímulos mecánicos y a determinadas condiciones metabólicas (Simón et al., 2001). Se han identificado distintos factores endoteliales vasoconstrictores. Entre ellos, figuran el anión superóxido ( $O_2^-$ ), endoperóxidos, el tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) y la endotelina. Este péptido produce una marcada vasoconstricción por estímulos de los receptores  $ET_A$  y  $ET_{B2}$  localizados en el músculo liso vascular. Los principales factores endoteliales vasodilatadores que se conocen son la  $PGI_2$ , el NO y un factor de naturaleza aún desconocida denominado factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF).

La disfunción endotelial puede definirse como un desbalance entre la síntesis, la liberación o el efecto, de los factores endoteliales vasoconstrictores y los factores endoteliales vasodilatadores. De forma simplificada, podríamos definirla también como la pérdida de la capacidad vasodilatadora del endotelio, que se produce principalmente cuando existe una disminución en la biodisponibilidad de NO (Pepine, 1998; Granger & Alexander, 2000). La disfunción endotelial se reconoce como un fenómeno de aparición temprana en diversas enfermedades y patologías cardiovasculares, tales como la hipertensión, la hipercolesterolemia y la diabetes *mellitus*.

En los últimos años se ha postulado que la adventicia, tradicionalmente considerada una estructura de soporte, tiene también un papel importante en la regulación de la función y de la estructura vascular (McGrath et al., 2005; Somoza et al., 2005; Haurani & Pagano, 2007).

### **1.2.2 Sistema renina-angiotensina**

En condiciones fisiológicas, el sistema renina-angiotensina actúa como un regulador de la presión arterial mediante diferentes mecanismos que dependen de la producción de angiotensina II y aldosterona (Wolf & Wenzel, 2003).

La actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que convierte angiotensina I en angiotensina II (el péptido con mayor eficiencia vasoconstrictora), resulta decisiva para la eficacia del sistema renina-angiotensina. La modulación del tono arterial por este sistema puede ser, en realidad, crítica en algunos pacientes hipertensos. Expondremos a continuación las vías bioquímicas del sistema renina-angiotensina, comentando la significación fisiológica de los péptidos que en él se forman. La Figura 3 muestra un esquema de estas vías y estos péptidos. En el presente apartado se expondrán asimismo algunos conceptos sobre el sistema de las quininas, ya que la ECA también juega un papel relevante en este sistema.

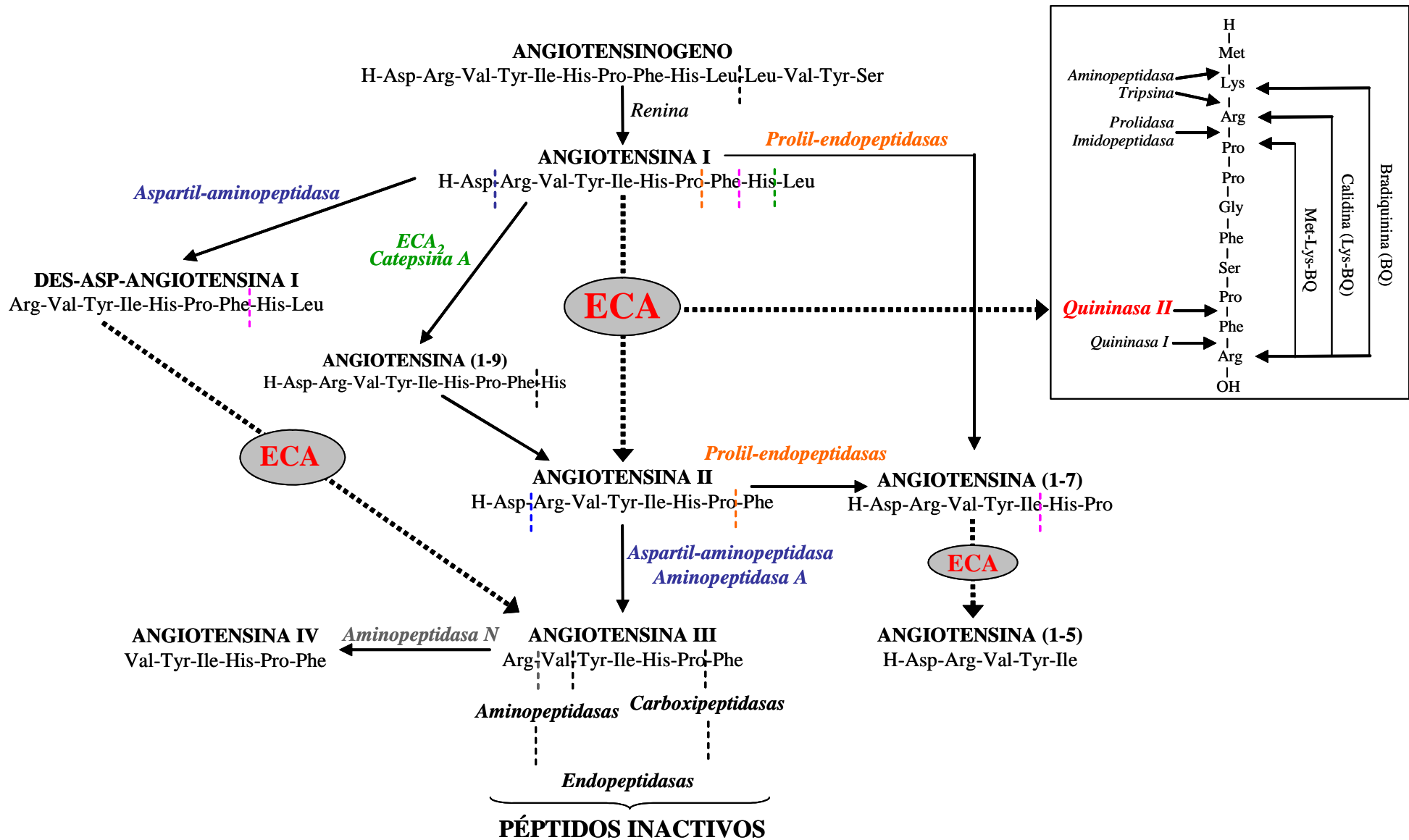
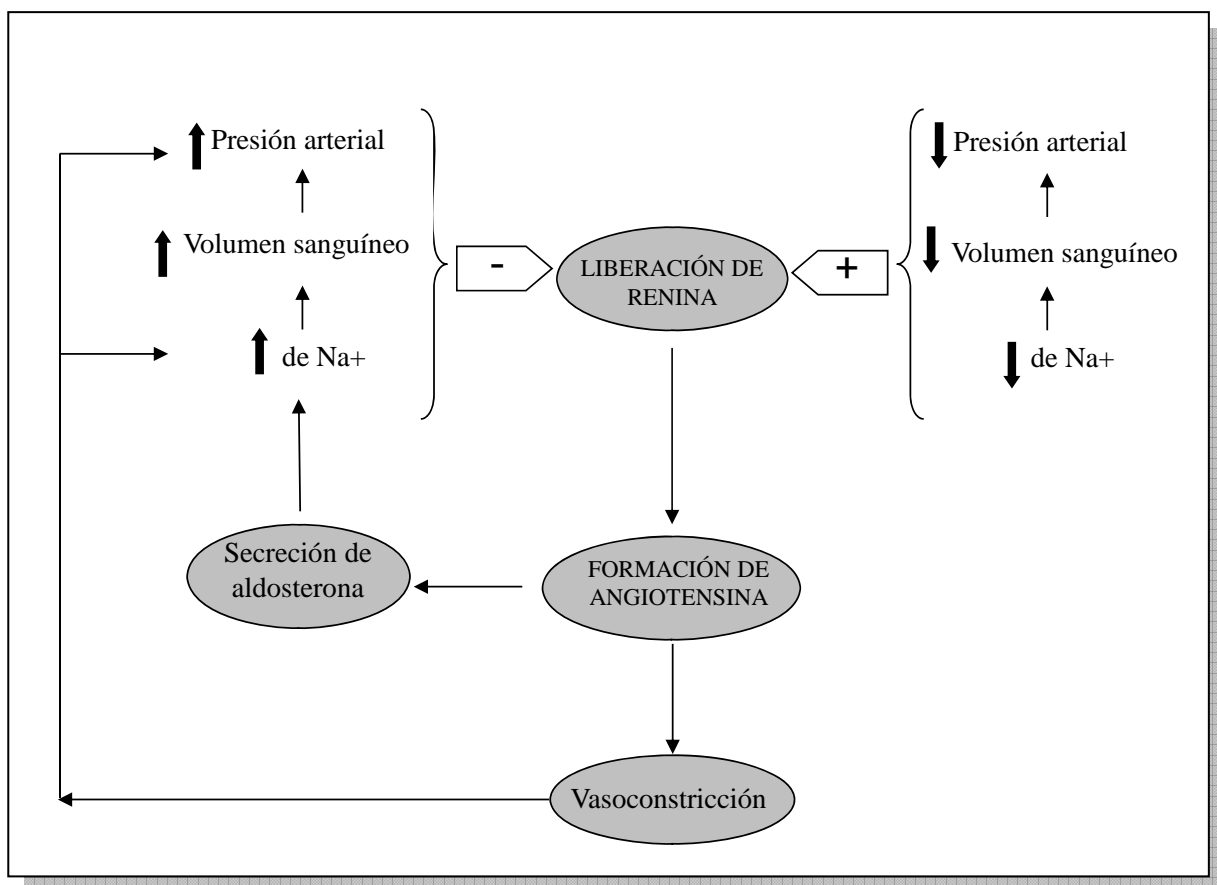


Figura 3. Rutas bioquímicas y péptidos del sistema renina-angiotensina.

La renina es una glucoproteína de 350 aminoácidos, con actividad proteasa, que presenta alta especificidad de sustrato. Se sintetiza y almacena en las células yuxtaglomerulares, situadas en la pared de la arteria renal eferente. Su secreción está controlada por distintos factores, entre los que destaca la disminución de la presión de perfusión renal, provocada por la bajada de la presión arterial sistémica, y la reducción de la carga renal de sodio. La Figura 4 muestra un esquema de la regulación fisiológica de la secreción de renina.



**Figura 4.** Regulación fisiológica de la secreción de renina.

Aunque la renina no es una sustancia presora por sí misma, es capaz de generar un péptido activo a partir del sustrato proteico angiotensinógeno. El angiotensinógeno es el único sustrato para la renina. Se sintetiza en el hígado y está presente en la fracción  $\alpha_2$  globulínica del plasma. Está constituido por

glucoproteínas que contienen un residuo peptídico de 14 aminoácidos, de los cuales los diez primeros corresponden a la secuencia de la angiotensina. Esta secuencia se libera cuando la renina actúa sobre el angiotensinógeno a nivel de la unión Leu-Leu, pero el decapeptido que se libera, denominado angiotensina I, carece de actividad biológica. La ECA es una glicoproteína plasmática que cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con potente actividad vasoconstrictora. La ECA es una metaloenzima no específica que se encarga de separar dipéptidos carboxi-terminales de diferentes sustratos proteicos, y por ello también se denomina peptidildipeptidasa. Promueve la separación del dipéptido carboxi-terminal de la angiotensina I actuando sobre la unión Phe-His de este compuesto (Figura 2). La ECA humana se presenta en dos formas. Una de ellas, la ECA somática, tiene un peso molecular (Pm) de 150-180 kDa, y contiene dos dominios homólogos, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal. Ambos dominios contienen  $Zn^{2+}$  en su centro activo (Deddish et al., 1996). La otra isoforma de la ECA posee bajo Pm (90-100 kDa), se encuentra en el testículo (ECA germinativa o testicular), y contiene únicamente el dominio C-terminal (Brée et al., 1992; Williams et al., 1992).

La angiotensina II ejerce sus acciones a través de su unión a receptores específicos. Los más estudiados son los receptores  $AT_1$  y los receptores  $AT_2$ . Las acciones características de la angiotensina II están mediadas por los receptores  $AT_1$ , cuya activación promueve, entre otras cosas, un incremento de la concentración intracelular de calcio, con aumento de la contracción del músculo cardíaco y del tono arteriovenoso. Los receptores  $AT_1$  del músculo liso vascular son en realidad receptores acoplados a proteínas  $G_q$ . La activación de estos receptores también estimula la síntesis y liberación de aldosterona en la corteza suprarrenal. Además, la actividad del receptor induce la expresión de varios genes encargados de la síntesis de proteínas y de ADN. Esta vía nuclear sería la responsable del estímulo de proliferación y diferenciación celular observado tras perfusiones de angiotensina II. Por último, la angiotensina II activa la fosfolipasa  $A_2$ , responsable de sintetizar el ácido araquidónico a partir

de fosfatidilcolina. Este ácido es el precursor de los eicosanoides, implicados fundamentalmente en procesos inflamatorios.

El hallazgo de que las principales acciones fisiopatológicas de la angiotensina II estaban mediadas por el estímulo de los receptores AT<sub>1</sub> fue la base para el desarrollo de fármacos capaces de bloquear específicamente estos receptores. Los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) antagonizan el efecto de la angiotensina II sobre el receptor AT<sub>1</sub>, por lo que son útiles en el tratamiento de la hipertensión arterial (Novo et al., 2009) El objetivo fundamental de estos fármacos es inhibir la vasoconstricción y disminuir la hipertrofia del endotelio vascular (Tamargo et al., 2006). La función de los receptores AT<sub>2</sub> es aún incierta y podría estar implicada en el desarrollo embrionario y en el control del desarrollo y diferenciación de las distintas líneas celulares del feto. Los receptores AT<sub>2</sub> predominan en los tejidos fetales, y disminuyen tras el nacimiento. En el adulto sano se encuentran en pequeñas cantidades en el riñón, las glándulas adrenales, el corazón, el cerebro, el útero y el testículo (De Gasparo et al., 2000).

La angiotensina III es el primer metabolito de la angiotensina II. Este heptapéptido conserva todavía una importante actividad fisiológica, y también posee afinidad por los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Puede ser responsable de algunos de los efectos observados cuando se administra angiotensina II, pero sus propiedades no se han esclarecido totalmente, y pueden variar con los distintos tejidos. Se sabe que la angiotensina III es el principal péptido efector del sistema renina-angiotensina cerebral. Este compuesto podría ejercer un control central tónico de la presión arterial (Gaynes et al., 1978; Sexton et al., 1979; García del Río et al., 1981). Hay también que señalar, que se han descrito receptores AT<sub>3</sub>, activados por angiotensina III (Griendling et al., 1996; Tamargo, 2000).

El ataque de la angiotensina III por la aminopeptidasa N produce otro metabolito activo de 6 aminoácidos, la angiotensina IV. La angiotensina IV

puede interactuar con los clásicos receptores de la angiotensina II, los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, pero también se han identificado sitios específicos de unión para angiotensina IV, los receptores AT<sub>4</sub> (Swanson et al., 1992). Estos receptores aparecen en distintos tejidos (cerebro, membranas cardíacas, riñón y células de los conductos colectores humanos). Están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, donde su activación por la angiotensina IV parece estar vinculada a procesos de memoria, aprendizaje y desarrollo neuronal. Se atribuye también a la angiotensina IV un papel funcional en la regulación del flujo sanguíneo en diferentes tejidos. En el pulmón este péptido actuaría como un relajante vascular, pues en las células endoteliales de este órgano el receptor de angiotensina IV media la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) (Patel et al., 1998). En otros lechos vasculares se ha observado que la angiotensina IV actúa como vasoconstrictora, vía receptores AT<sub>1</sub> (Gardiner et al., 1993; Garrison et al., 1995; Loufrani et al., 1999). El subsiguiente ataque de las angiotensinas III y IV por amino- y carboxipeptidasas, da lugar a péptidos inactivos (Song & Healy 1999; Turner & Hooper, 2002).

Las quininas son péptidos que se forman a partir de sustratos denominados quininógenos, presentes en el plasma, la linfa y el fluido intersticial de los mamíferos. Se forman cuando sobre estos sustratos actúan un grupo de proteasas séricas, que son similares a otras enzimas conocidas, tales como tripsina, trombina o plasmina. Las dos principales quininas conocidas son la calidina, también denominada Lys-bradiquinina, con 10 aminoácidos, y la bradiquinina, un potente vasodilatador que tiene 9 aminoácidos. Aparentemente existe otra quinina con 11 aminoácidos, la Met-Lys-bradiquinina. La inactivación de estas quininas se lleva a cabo a través de enzimas proteolíticas que actúan a nivel del grupo C-terminal de las quininas. Se conocen dos enzimas que actúan sobre este grupo, la quininasa I y la quininasa II. Ambas son metaloproteínas. La quininasa I produce metabolitos activos, y la quininasa II, proporciona metabolitos biológicamente inactivos. La ECA pertenece a este último grupo, ya que esta enzima, además de facilitar la

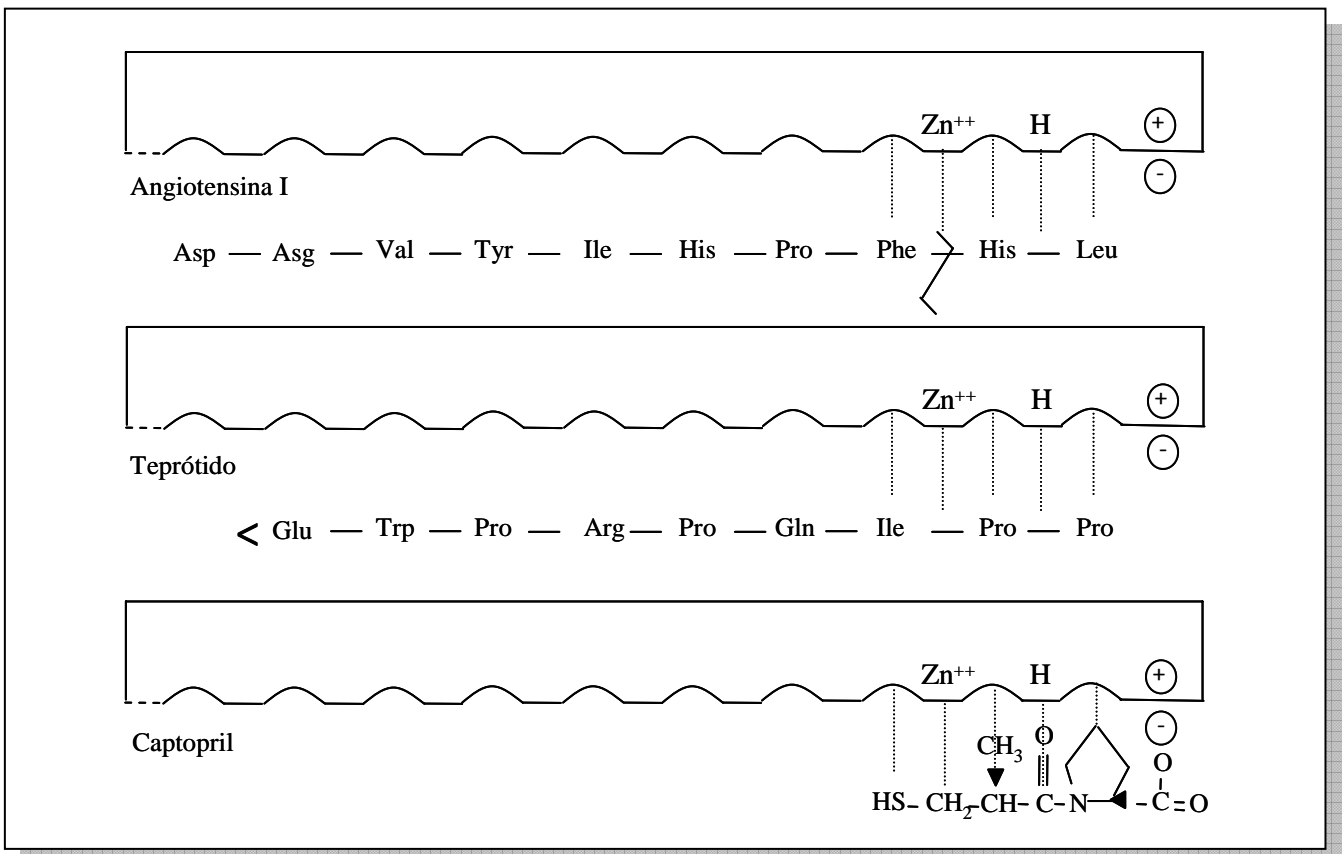
formación de angiotensina II, se encarga de hidrolizar e inactivar bradiquinina y otros potentes péptidos vasodilatadores (Figura 2). La bradiquinina ejerce su acción vasodilatadora a través de receptores B<sub>2</sub> endoteliales que median la síntesis y liberación de prostaglandinas, NO y EDHF (Bernier et al., 2000; Tom et al., 2001; Landmesser & Drexler, 2006).

La inhibición de la ECA tiene como consecuencia la inhibición de la formación de distintos compuestos vasoconstrictores (entre ellos, angiotensina II, que es la sustancia presora más potente que se conoce), y también la inhibición de la degradación de distintas sustancias vasodilatadoras (entre ellas la bradiquinina, que es el más potente de los vasodilatadores conocidos). Sin embargo, cuando se inhibe la ECA, no se bloquea completamente la producción de angiotensina II. Esto se debe, en parte, a la conversión de angiotensina I en angiotensina II por acción de distintas quimasas. Tiene especial importancia la quimasa que hidroliza la angiotensina I, aislada en los mastocitos y en las células endoteliales del corazón humano (Husain, 1993). En el ventrículo izquierdo del corazón humano, la formación de angiotensina II por acción de esta quimasa parece más importante que la formación de este compuesto por acción de la ECA (Urata et al., 1996; Song & Healy, 1999; Turner & Hooper, 2002). Hay también que tener en cuenta que, además de la vía clásica, existen otras vías enzimáticas de síntesis de angiotensina II. Se ha postulado una vía puente de formación de angiotensina II, sorteando la ECA, en la que se forma previamente angiotensina 1-9 (Figura 2). Esta vía tiene mayor importancia en tejidos como corazón, vasos sanguíneos y sistema nervioso. Así, en el corazón humano, la catepsina A y la ECA<sub>2</sub> son responsables de procesar angiotensina I para formar angiotensina 1-9 (Donoghue et al., 2000). Otras metalopeptidasas (prolil-endopeptidasas) producen a partir de angiotensina I angiotensina 1-7, péptido que también puede generarse a partir de angiotensina II. La angiotensina 1-7 puede considerarse una hormona paracrina que contrabalancea negativamente las acciones de la angiotensina II en el sistema cardiovascular, el riñón y el sistema nervioso central. Posee efectos antiproliferativos y vasodilatadores,

que están mediados por liberación de NO y prostaglandinas (Almeida et al., 2000). La ECA tiene también la capacidad de procesar angiotensina 1-7 para formar angiotensina 1-5, y lo hace con una rapidez 100 veces mayor por el dominio-N que por el dominio-C (Deddish et al., 1998), lo que evidencia que los dos dominios de la ECA pueden desempeñar diferentes funciones. La concentración de angiotensina 1-7 aumenta significativamente durante la administración de inhibidores de la ECA, y se sospecha que el aumento de este péptido está relacionado con el efecto beneficioso de estos compuestos. La angiotensina 1-5 no aparece prácticamente en el plasma y no participa en la modulación de la presión arterial.

Clásicamente se ha considerado al sistema renina-angiotensina un sistema circulante de acción endocrina, pero hoy día se sabe que la mayoría de los componentes de este sistema se expresan en grado variable en diferentes tejidos. Se sabe que la angiotensina II se puede sintetizar y secretar a nivel vascular. Este péptido ejerce efectos locales paracrinos/autocrinos/intracrinos sobre las funciones vasculares. Se piensa que la renina y la angiotensina II de origen sistémico podrían controlar sobre todo las funciones vasculares agudas, tales como el tono vascular y la presión sanguínea. El sistema renina-angiotensina local sería, sin embargo, responsable del mantenimiento y reparación de los tejidos. Sin embargo también se ha señalado que el sistema renina-angiotensina tisular es el que juega un papel más relevante en la hipertensión (Re, 2004). En la hipertensión esencial se encuentra, en realidad, inducida la expresión génica de varios de los componentes del sistema renina-angiotensina tisular, lo que produce un aumento local de angiotensina II (Timmermans et al., 1993). Esta elevación local de la angiotensina II produce efectos patológicos, que se deben a la actuación de este péptido como agente proliferativo, profibrótico e inductor de la migración celular (Touyz & Schiffrin, 2000). La angiotensina II también ejerce efectos proinflamatorios a nivel vascular, ya que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y citoquinas inflamatorias que dañan la pared vascular (Sanz-Rosa et al., 2005).

Los inhibidores de la ECA se descubrieron en los venenos de algunas víboras como péptidos inhibidores de la quinasa II que potenciaban a la bradiquinina (Cushman et al., 1973; Ondetti et al., 1977). Estos péptidos, que tenían entre 5 y 13 aminoácidos, se aislaron primero y se sintetizaron después. Eran potentes y específicos, pero no resultaban los compuestos ideales para inhibir la ECA, ya que su molécula era relativamente grande para la interacción enzimática y no eran activos por vía oral. El más activo fue un péptido denominado teprótido, con 9 aminoácidos. En la figura 5 se representa su interacción con la ECA, al igual que la interacción de la angiotensina I con esta enzima. Se sintetizó más tarde el captopril, un octapéptido inhibidor específico de la ECA con una estructura más adecuada, que resultaba además activo por vía oral. Este compuesto encabeza un grupo farmacológico, conocido propiamente como los inhibidores de la ECA, que es en la actualidad un grupo prioritario para el tratamiento de la hipertensión. Los fármacos que lo componen ejercen su acción interaccionando con el grupo Zn que contiene la ECA en su centro activo. Este es también el lugar de unión de la enzima a la angiotensina I. En la Figura 5 se puede ver también la interacción del captopril con la ECA. Los inhibidores de la enzima impiden la transformación de angiotensina I en angiotensina II, y bloquean la cascada del sistema renina-angiotensina, pero no impiden las acciones de la angiotensina II. Algunos de los componentes del grupo farmacológico, que están estructuralmente relacionados con el captopril, contienen un grupo sulfhidrilo. Otros presentan una estructura distinta, y muchos son profármacos inactivos que tienen mejor biodisponibilidad, pero que necesitan que actúe sobre ellos una esterasa para generar *in vivo* el compuesto activo. Recientemente se ha constatado que los inhibidores de la ECA son también capaces de estimular la síntesis de NO a través de una activación directa de los receptores B<sub>1</sub>, que se expresan sobre todo en situaciones patológicas (Marceau et al., 1995; 1997; Ni et al., 1998).



**Figura 5.** Interacción con la enzima convertidora de angiotensina de la angiotensina I, teprótid y captopril.

## 1.2.3. Balance redox en el organismo

### 1.2.3.1 Especies reactivas de oxígeno

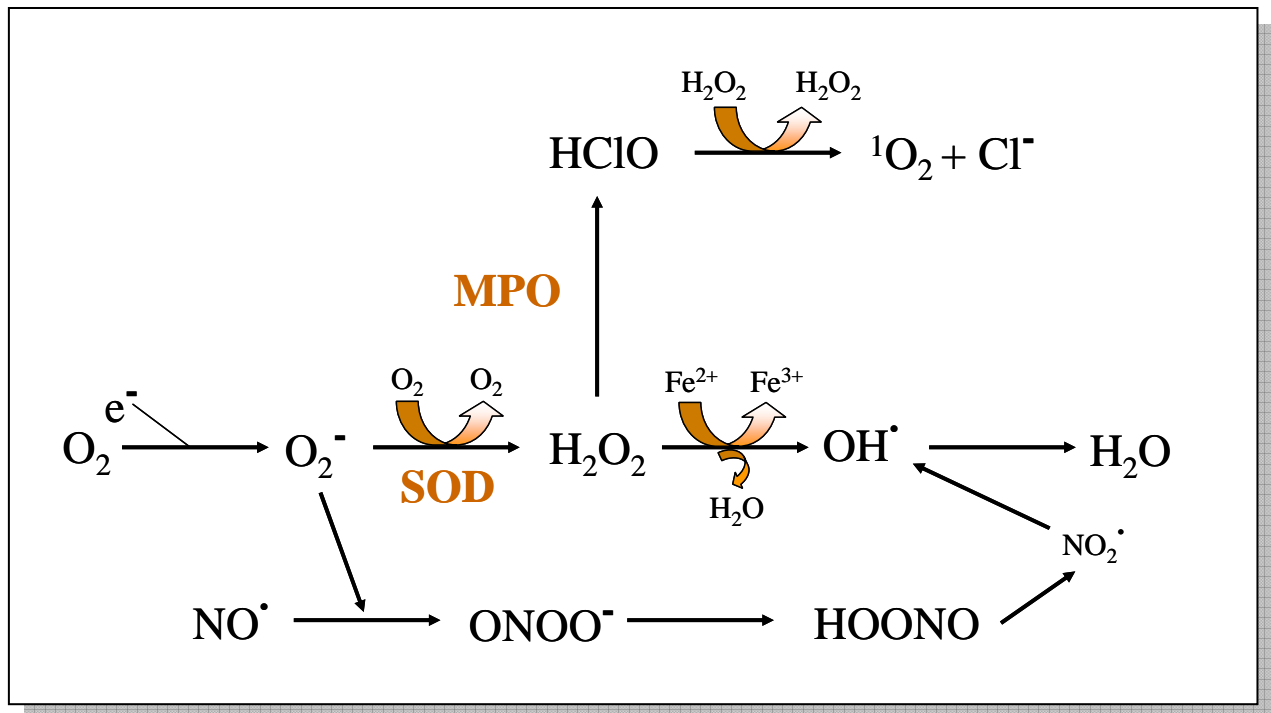
En condiciones metabólicas normales, se obtiene energía cuando tiene lugar el proceso de la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. En este proceso, el sistema enzimático de la citocromo oxidasa mitocondrial acopla la producción de ATP a la reducción controlada del oxígeno para formar agua. En los organismos aerobios, sin embargo, entre un 2% y un 5% del oxígeno se reduce parcialmente, y se forman por eso distintas especies reactivas de oxígeno (ROS) (Sies, 1993; Davies, 1995). Las ROS son especies químicas que poseen electrones no apareados en su orbital más externo. Esto justifica su alto

nivel de reactividad con biomoléculas (Reilly et al., 1991). Además de las ROS, existen otros radicales, derivados de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre y cloro, que contribuyen a la propagación y mantenimiento de nuevas especies reactivas. Las principales especies reactivas las podemos clasificar en dos grupos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de las principales especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

<b>Radicales</b>
Anión superóxido ( $O_2^-$ )
Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^*$ )
Óxido nítrico ( $NO^*$ )
Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Radical alcohoxilo ( $RO^*$ )
Radical dióxido de nitrógeno ( $HOONO$ )
Radical hidroxilo ( $OH^*$ )
Radical peroxilo ( $ROO^*$ )
<b>No radicales</b>
Ácido hipocloroso ( $HClO$ )
Oxígeno singlete ( $^1O_2$ )
Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

Las ROS se generan mediante sucesivas reacciones de reducción que aparecen esquematizadas en la Figura 6. Las principales reacciones que se contemplan en esta figura son las que comentaremos a continuación.



**Figura 6.** Producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno por reducción del oxígeno molecular.  $Cl^-$  = ión cloruro;  $Fe^{2+}$  = ión ferroso;  $Fe^{3+}$  = ión férrico; HClO = ácido hipocloroso;  $H_2O$  = agua;  $H_2O_2$  = peróxido de hidrógeno; HOONO = radical dióxido de nitrógeno; MPO = mieloperoxidasa;  $NO^{\cdot}$  = óxido de nitrógeno;  $NO_2^{\cdot}$  = dióxido de nitrógeno;  $O_2$  = oxígeno;  $O_2^{\cdot-}$  = anión superóxido;  $^1O_2$  = oxígeno singlete;  $OH^{\cdot}$  = radical hidroxilo;  $ONOO^{\cdot}$  = peroxinitrito; SOD = superóxido dismutasa.

El oxígeno se reduce al radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que es el compuesto con mayor poder reductor. El  $O_2^{\cdot-}$  se comporta, en realidad, como reductor u oxidante débil, y puede reaccionar fácilmente con el NO generando peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (Beckman et al., 1990). El  $ONOO^{\cdot}$  participa en el daño oxidativo celular y ocasiona principalmente la peroxidación lipídica (Singh et al., 2007). El  $ONOO^{\cdot}$  también genera radical dióxido de nitrógeno ( $HOONO$ ). El  $O_2^{\cdot-}$  debido a su inestabilidad se dismuta espontáneamente, y mediante la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un agente oxidante muy activo, selectivo y específico. El principal efecto nocivo del  $H_2O_2$  es su capacidad para oxidar los grupos tioles de las proteínas y del ácido desoxirribonucleico (ADN), causando roturas en la

doble cadena del ADN que conllevan importantes daños en el genoma (Bader et al., 1999). El  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$  pueden dar lugar al radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ). Este compuesto también posee efectos nocivos sobre el ADN, y puede ocasionar graves alteraciones orgánicas. No existe, ningún sistema detoxificador enzimático conocido que elimine el radical  $OH^\bullet$ . Es por tanto muy importante que las ROS, tales como el  $O_2^-$  y el  $H_2O_2$ , se eliminen rápidamente de la célula para evitar la formación del radical  $OH^\bullet$ . Para ello, existen mecanismos enzimáticos de defensa antioxidante que neutralizan y eliminan estos radicales. Los radicales de oxígeno anteriormente mencionados, el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  y el  $OH^\bullet$ , presentan además gran capacidad de difusión, siendo esta capacidad especialmente alta para el  $OH^\bullet$  ( $O_2^- < H_2O_2 < OH^\bullet$ ). Este hecho permite a las ROS la posibilidad de atravesar membranas celulares.

Al comenzar este apartado ya hemos comentado que las ROS se generan principalmente en la mitocondria como parte del metabolismo celular, y algunos defectos en la estructura y función de la mitocondria, que acontecen fundamentalmente por anomalías genéticas, se asocian a enfermedades cardiovasculares (Marín-García & Goldenthal, 2002). Las ROS también se pueden producir específicamente por fagocitos y otros tipos celulares, como respuesta a distintos agentes externos. Por ejemplo, fuentes ambientales (tabaco, radiación electromagnética, luz ultravioleta), fuentes farmacológicas (xenobióticos, drogas), fuentes nutricionales ó fuentes contaminantes (aditivos). Existen, además, otras fuentes endógenas de radicales libres, que son consecuencia de la activación catalítica de diversas enzimas metabólicas en los distintos compartimentos celulares.

En la membrana celular, las enzimas nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa, generan radicales tales como el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$ , el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el ácido hipocloroso (HClO) (Wolin, 2000; Genestra, 2007). Otras enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa también generan ROS durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Wolin, 2000; Genestra, 2007).

También se produce  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en el retículo endoplasmático, por la autooxidación de la flavoproteína NADPH-citocromo P-450 reductasa y la citocromo P-450 (Kozlov et al., 2007). En el citoplasma, la actividad catalítica de distintas enzimas, tales como la aldehído deshidrogenasa, también genera ROS (Greene & Paller, 1992).

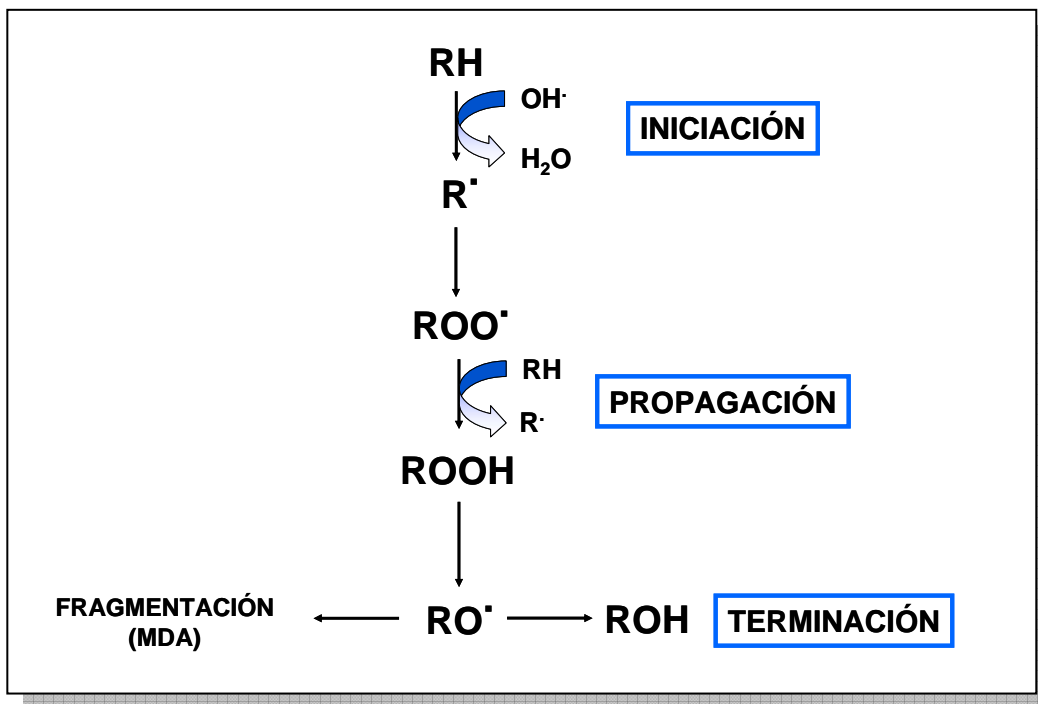
A concentraciones fisiológicas, las ROS cumplen importantes funciones biológicas (Turpaev, 2002; Hancock et al., 2001; Valko et al., 2007). Llevan a cabo funciones defensivas, que se ponen de manifiesto por su actividad fagocítica y el ataque a los virus, bacterias y células anómalas (Donkó et al., 2005). Asimismo, actúan como vasodilatadores en la circulación cerebral (Miller et al., 2006; Terashvili et al., 2006). Las ROS también regulan diversas actividades enzimáticas, participan en sistemas de transducción de señales y pueden actuar como segundos mensajeros (Nose, 2000; Galaris & Pantopoulos, 2008). Además, intervienen tanto en la diferenciación celular como en los procesos de apoptosis (Suzuki et al., 1997; Ozben, 2007; Chen et al., 2009). Sin embargo, cuando en un organismo se origina un desequilibrio entre los sistemas generadores y neutralizadores de radicales libres, y existen más especies reactivas de las que los sistemas de defensa antioxidante pueden compensar, se genera el estrés oxidativo.

La acumulación de ROS en el organismo puede provocar daños en la estructura y función celular, y ocasiona la degradación oxidativa de los lípidos, las proteínas y el ADN (Finkel, 2003; Liu et al., 2005; Drögue & Schipper, 2007). En realidad, cuando se acumulan las ROS producen daños irreversibles en los lípidos de las membranas, y se produce el fenómeno conocido como peroxidación lipídica. También ocasionan daño a las proteínas y al ADN, y todos estos daños pueden inducir importantes alteraciones funcionales y estructurales en los diversos componentes y orgánulos celulares (Drögue, 2002; Paravicini & Touyz, 2008).

Nos ocuparemos a continuación de los daños que pueden ocasionar las ROS y las restantes especies reactivas.

### Daño a lípidos

Los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados que los componen, son las biomoléculas más susceptibles de ataque por los radicales libres (Cheesman & Slater, 1993). Estos ácidos grasos se localizan en las membranas biológicas, y cuando los radicales libres producen lesiones en estas membranas se ocasionan daños celulares irreversibles. A este proceso se le denomina peroxidación lipídica (Halliwell & Gutteridge, 1984; Nicolson, 2007; Casado et al., 2008; Zimniak, 2008). La peroxidación lipídica consta de tres fases: fase de iniciación, fase de propagación y fase de terminación. Estas fases, que comentaremos a continuación, aparecen reflejadas en la figura 7.



**Figura 7.** Esquema de las reacciones principales de la peroxidación lipídica. MDA = malonildialdehído;  $R\cdot$  = radical lipídico alquil; RH = lípido intacto;  $RO\cdot$  = radical lipídico alcoxil; ROH = hidróxido lipídico (estable);  $ROO\cdot$  = radical lipídico peroxil; ROOH = hidroperóxido lipídico.

La fase de iniciación comienza con el ataque de un radical  $\text{OH}^\bullet$  a un ácido graso poliinsaturado (RH), formándose un radical alquilo ( $\text{R}^\bullet$ ). Este radical  $\text{R}^\bullet$  es un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular dando lugar a un radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ), el compuesto principal que se genera con la peroxidación lipídica (Aikens & Dix, 1993; Hogg, 1998). A continuación, en la fase de propagación, el radical  $\text{ROO}^\bullet$  reacciona con un ácido poliinsaturado, formándose el hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) (Bielski et al., 1983) y otro radical  $\text{R}^\bullet$ , que a su vez dará lugar a otro radical  $\text{ROO}^\bullet$ . Los hidroperóxidos formados en esta fase inducen a su vez daño oxidativo (Girotti, 2008). La fase de terminación se produce cuando reaccionan dos radicales y dan lugar a compuestos no radicales. El  $^1\text{O}_2$  que se genera en esta fase también puede reaccionar con un ácido graso poliinsaturado y desencadenar un nuevo proceso de peroxidación lipídica (Minami et al., 2008). En esta fase, hay además que considerar que también se producen hidroperóxidos, F2-isoprostanos y aldehídos, como el 4-hidroxinonenal o el malonildialdehído (MDA). Algunos de estos aldehídos son muy reactivos y pueden aumentar la toxicidad de la peroxidación lipídica (Esterbauer et al., 1991; Moore et al., 1995; Guiotto et al., 2007). La medida del MDA es un marcador comúnmente utilizado, que nos permite hacer una estimación del grado de peroxidación lipídica.

### *Daño a proteínas*

Todas las proteínas tienen residuos susceptibles de ser afectados por los radicales libres, principalmente por el radical  $\text{OH}^\bullet$ . Los aminoácidos tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, son los más susceptibles de ser oxidados por este radical, y pierden así su función biológica (Davies, 1987). En situaciones de estrés oxidativo, los radicales libres provocan, por lo tanto, daños en las proteínas, y modifican sus componentes. Estas modificaciones en las proteínas, que pueden ser catalizadas por iones metálicos, producen la pérdida de la actividad catalítica o de la integridad estructural de las membranas (Shacter, 2000; Nyström, 2003; Breusing & Grune, 2008; Winterbourn & Hampton, 2008). Las proteínas que contienen los aminoácidos cisteína y metionina son más propensas a sufrir daño oxidativo,

por contener átomos de azufre que son susceptibles de oxidación (Levine et al., 1999; Shacter, 2000). El papel de la metionina no está sin embargo claro, ya que se ha descrito que este aminoácido podría proteger también a las proteínas del daño oxidativo (Levine et al., 1999).

#### *Daño al ADN*

Los radicales libres pueden dañar el ADN, provocando la rotura de las cadenas polipeptídicas por hidroxilación de sus bases nitrogenadas. Pueden dañarlo también provocando uniones cruzadas entre las distintas cadenas del ADN o entre las cadenas de ADN y las proteínas, o pueden deteriorarlo modificando la cromatina. El radical OH<sup>\*</sup> es el que induce la rotura de las cadenas de ADN. También es responsable de la formación de las bases anómalas, así como de alteraciones durante la replicación y la transcripción (Floyd & Carney, 1992; Meissner, 2007).

#### **1.2.3.2 Estrés oxidativo e hipertensión arterial**

Existen múltiples evidencias científicas que avalan la relación existente entre el estrés oxidativo y la aparición de hipertensión arterial (Touyz & Schiffrin, 2008; Schulz et al., 2008). En condiciones patológicas, el incremento de la actividad de las ROS genera una disfunción endotelial, un aumento de la contractilidad del músculo liso vascular, crecimiento de este tejido, invasión de monocitos, peroxidación lipídica, inflamación y aumento de los depósitos proteicos de matriz extracelular. Todos estos factores son muy importantes para determinar el daño vascular de la hipertensión (Diep et al., 2002; Taniyama & Griendling, 2003). La producción de ROS también puede aumentar en otros órganos relacionados con el control de la presión arterial como el corazón, el sistema nervioso y los riñones (Wilcox, 2003; Touyz & Schiffrin, 2004; Kishi et al., 2004; Münzel et al., 2008). Algunos modelos de ratones deficientes en enzimas generadoras de ROS tienen presiones arteriales bajas en comparación con sus controles normales, y la infusión de angiotensina II en estos animales que tienen la deficiencia enzimática

mencionada no produce hipertensión arterial (Landmesser et al., 2002). En modelos experimentales con deficiencia en la capacidad antioxidante se desarrolla por el contrario hipertensión arterial (Tanito et al., 2004). También se ha descrito un aumento en la expresión de ROS y una reducción de la actividad antioxidante en el músculo liso vascular y en las arterias aisladas de ratas hipertensas y de pacientes hipertensos (Touyz et al., 2003; Touyz & Schiffrin, 2004).

Aunque tradicionalmente se ha asumido que los macrófagos juegan un papel fundamental en la generación de ROS en la pared vascular (Cathcart & Folcik, 2000), todas las células de la pared vascular (endotelio, músculo liso vascular y células de la adventicia) producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos (Griendling et al., 2000). Ya se han comentado los principales sistemas enzimáticos que generan  $O_2^-$  y sus derivados. La importancia relativa de cada uno de estos sistemas va a depender del estado fisiológico o patológico de la pared vascular.

El tono vasomotor también se modula por los efectos directos de las ROS sobre el calcio (Tabet et al., 2004). Las ROS aumentan el calcio intracelular y pueden favorecer la vasoconstricción (Suzuki et al., 1995). Las ROS también participan en la regulación de la expresión de protooncogenes y genes inflamatorios (Touyz, 2003). Los radicales libres interfieren además en la generación de EDHF, este factor no es NO ni  $PGI_2$ , pero ocasiona también relajación vascular y lo hace mediante la reducción de la señal eléctrica a través de las conexiones mioendoteliales. Las ROS producen apoptosis de las células endoteliales e incremento de la adhesión de monocitos, y participan además en los procesos de la angiogénesis (Cai & Harrison., 2000; Taniyama & Griendling, 2003).

Es importante señalar que en la pared vascular juega también un papel fundamental la sintasa de óxido nítrico (NOS). De hecho, el NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la NOS, una enzima presente en las células

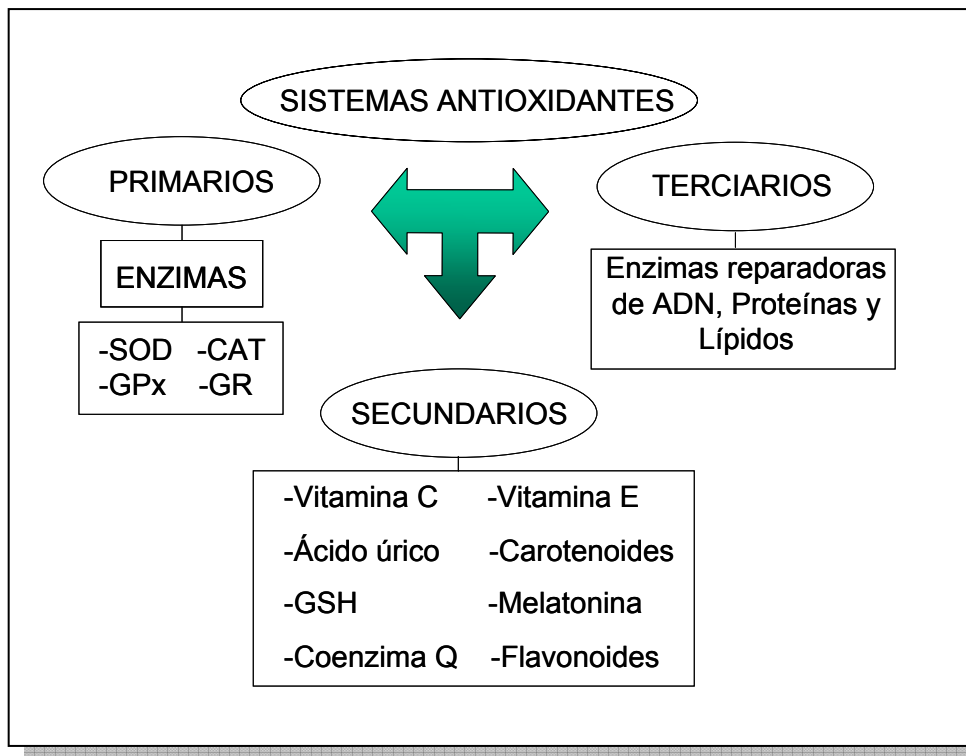
endoteliales, plaquetas, macrófagos, células del músculo liso y neuronas (Palmer & Moncada, 1989; Moncada et al., 1991). Se han descrito tres isoformas de la NOS (NOS I, II y III), también denominadas neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS), respectivamente. La nNOS y la eNOS son enzimas constitutivas y la iNOS es una enzima inducible que se activa por lipopolisacáridos o por citoquinas, induciéndose su síntesis como un mecanismo de respuesta citotóxica. Las tres isoformas se inhiben, de manera competitiva, por análogos de la L-arginina, como la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil ester (L-NAME) (Moncada et al., 1991). Asimismo, en situaciones patológicas en las que se produce el desacoplamiento de la eNOS, debido a una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o debido a una deficiencia en algunos de los cofactores de la enzima, como la BH<sub>4</sub>, se produce una reducción de la cantidad de NO y un aumento de los radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ONOO<sup>-</sup> (Bonomini et al., 2008; Ray & Shah, 2005). Esta situación se puede producir durante la hipertensión, en la que la activación de la NADPH oxidasa produce oxidación de la BH<sub>4</sub> (Landmesser et al., 2003; Taniyama & Griendling, 2003; Ray & Shah, 2005).

La deficiencia en la vasodilatación mediada por el endotelio que existe en la hipertensión, se ha vinculado a una disminución en la biodisponibilidad de NO. Así, en pacientes con hipertensión esencial se ha detectado una disminución de la cantidad de NO en plasma (Node et al., 1997). Esta disminución en la biodisponibilidad del NO puede ser secundaria a la disminución en su síntesis o al aumento de su degradación como consecuencia de la interacción del NO con O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar ONOO<sup>-</sup> (Landmesser et al., 2003). Se ha señalado que la menor relajación dependiente de endotelio observada en pacientes hipertensos y en algunos modelos animales de hipertensión, se debe a una alteración de la vía L-arginina-NO (Lüscher et al., 1990; Panza et al., 1993; Vanhoutte & Boulanger, 1995). La disminución de NO en plasma se ha señalado que puede deberse a una disminución de la expresión o de la actividad de la NOS, reduciéndose así la producción de NO. Este hecho también se ha descrito en algunos modelos experimentales de

hipertensión (Malinski et al., 1993; Cuevas et al., 1996; Chou et al., 1998). Sin embargo, la biodisponibilidad del NO, además de estar regulada por la síntesis de este factor, está también determinada por su destrucción y por los radicales  $O_2^-$  existentes (Kerr et al., 1999; Ülker et al., 2003). De hecho, en situaciones de hipertensión, en las que se produce estrés oxidativo, la inactivación del NO por las ROS parece que es un mecanismo importante para mantener el aumento del tono arterial (Drögue, 2002; Zalba et al., 2005). En pacientes hipertensos se ha demostrado, que existe una mayor producción de ROS (Taddei et al., 2001) y un nivel más bajo de SOD (Kumar & Das, 1993). En algunos modelos animales de ratas hipertensas, también se ha demostrado que existe una mayor producción de radicales  $O_2^-$  (Wu & Ding, 2001), y una elevación del sistema NADPH oxidasa (Touyz & Schiffrin, 2004; Fortuño et al., 2004). Las ROS producidas por la pared vascular en situaciones patológicas, afectan también a sistemas productores de otros factores vasodilatadores distintos del NO. Así, se ha demostrado que el  $ONOO^-$  desacopla la NOS y también la  $PGI_2$  sintasa, necesaria para la síntesis de  $PGI_2$  (Münzel et al., 2008).

### **1.2.3.3 Sistemas de defensa antioxidante**

Existen varias estrategias de defensa celular frente a los procesos mediados por las ROS. Las distintas sustancias que previenen de la oxidación, se denominan antioxidantes, y se define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente en concentraciones bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Whiteman, 2004). Los sistemas antioxidantes celulares se han agrupado en tres categorías: sistemas antioxidantes primarios, sistemas antioxidantes secundarios y sistemas antioxidantes terciarios. La figura 8 muestra un esquema con las tres categorías y con los sistemas antioxidantes más relevantes que existen en la Naturaleza. A continuación los explicaremos brevemente.



**Figura 8.** Esquema representativo de los distintos sistemas de defensa antioxidantes celular. ADN = ácido desoxirribonucleico; CAT = catalasa; GPx = glutation peroxidasa; GR = glutation reductasa; GSH = Glutation reducido; SOD = superóxido dismutasa.

#### 1.2.3.3.1 Sistemas antioxidantes primarios

Son los que previenen la formación de los radicales libres. Están constituidos por distintas enzimas que participan en procesos antioxidantes. Estos sistemas enzimáticos se encuentran dentro de la propia célula. Entre las enzimas que participan en los procesos antioxidantes celulares podemos destacar las siguientes:

##### *Superóxido dismutasa*

La SOD cataliza la formación de  $H_2O_2$  a partir del radical  $O_2^{\cdot-}$ . Cataliza esta reacción 10.000 veces más rápido que la reacción de dismutación espontánea del  $H_2O_2$  a pH fisiológico (Tulunoglu et al. 1998). Existen dos

formas moleculares de la enzima SOD en los animales: la SOD-Cu-Zn y la SOD-Mn. En la SOD-Cu-Zn, el átomo de Cu es el que realiza directamente la dismutación. Esta enzima abunda en el citoplasma, es dimérica y tiene un peso molecular bajo (30 kDa). En la SOD-Mn, el átomo de Mn realiza la dismutación. Esta enzima abunda en las mitocondrias, es tetramérica y tiene un peso molecular mayor (80 kDa).

### *Catalasa*

Esta enzima cataliza la conversión de  $H_2O_2$  directamente a agua, previniendo la generación de radicales  $OH^*$  (Sohal et al. 1990). Es una hemoenzima tetramérica en la que el átomo de Fe realiza el intercambio redox. Su peso molecular es muy alto (240 kDa) y se encuentra localizada principalmente en los peroxisomas.

### *Glutation peroxidasa*

El glutatión es un tampón redox que protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas. Está formado por tres aminoácidos:  $\gamma$ -L-glutamina, L-cisteína y glicina, y se puede encontrar en dos formas redox: glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). El GSSG está formado por dos GSH unidos por un puente disulfuro. La concentración de GSH intracelular es un índice bueno del estrés oxidativo. El paso de GSH a GSSG está catalizado por la glutatión peroxidasa (GPx). La GPx está presente en el citosol y en las mitocondrias (Weitzel et al., 1990). Su función es eliminar hidroperóxidos orgánicos como el radical (ROOH) y también hidroperóxidos inorgánicos como el  $H_2O_2$ , y para ello utiliza el GSH.

### *Glutation reductasas*

La glutatión reductasa (GR) se localiza en el citosol y en las mitocondrias, y tiene la capacidad de reducir una molécula de GSSG a dos

moléculas de GSH. Esta enzima es de vital importancia para el funcionamiento celular, ya que el “pool” de GSH celular es limitado y el aumento de la relación GSSG/GSH es altamente tóxico para la célula. La actividad GR también es importante para la eliminación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la vía de las GPx, así como para la reconstitución no enzimática del GSSG (Grubor-Lajsic et al. 1998; Saicic et al. 1998).

#### 1.2.3.3.2 Sistemas antioxidantes secundarios

Los sistemas antioxidantes secundarios, actúan como moléculas suicidas, oxidándose ellos al neutralizar los radicales libres. La gran mayoría son antioxidantes exógenos, requiriéndose una continua aportación de estos sistemas o compuestos a través de la dieta. Algunos de ellos se comentan a continuación:

##### *Vitamina C o ácido ascórbico*

La vitamina C se considera el compuesto más potente y menos tóxico entre los antioxidantes naturales. Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones altas en varios tejidos; la concentración de ascorbato en plasma humano es de 60 μM. Al interaccionar con las ROS se oxida a deshidroascorbato, que se convierte de nuevo en ascorbato por la enzima deshidroascorbato reductasa. Como neutralizador de ROS, el ascorbato ha mostrado ser efectivo con el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el OH<sup>\*</sup> (Halliwell & Gutteridge, 1990).

##### *Vitamina E o tocoferol*

La vitamina E no es en realidad un solo compuesto, sino una mezcla de varias sustancias conocidas como tocoferoles y tocotrienoles, que muestran actividad biológica alfa-tocoferol. Es el antioxidante natural más efectivo en fase lipídica. Desempeña su acción a nivel de membranas o lipoproteínas. La vitamina E puede reaccionar con el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el OH<sup>\*</sup> y el ROO<sup>\*</sup>. Una de sus

funciones más importantes es la inhibición de la peroxidación lipídica, que tiene lugar cuando la vitamina E actúa como neutralizador del radical ROO<sup>\*</sup> y genera hidroperóxidos y el radical tocoferoxilo. Este último, puede transformarse en quinona en presencia de oxígeno y eliminarse por la orina o por la bilis.

### *Ácido úrico*

El ácido úrico tiene la capacidad de reaccionar con el radical OH<sup>\*</sup>, sobre todo en el tejido pulmonar. Es un antioxidante hidrosoluble capaz de eliminar radicales libres y trazas de hierro (Davies & Slater, 1986). Existe, sin embargo, controversia respecto a sus propiedades antioxidantes, ya que podría llegar a tener efectos pro-oxidantes y pro-inflamatorios cuando hay un exceso de ROS (Strazzullo & Puig, 2007).

### *Carotenoides*

El efecto antioxidante del caroteno, y en general de los carotenoides, se ha atribuido a su papel neutralizador de radicales libres (Riccioni, 2009). Los carotenoides son pigmentos orgánicos presentes en las membranas de los cloroplastos. El caroteno puede interrumpir las reacciones de oxidación en cadena y evitar la lipoperoxidación. Además, los carotenoides constituyen las especies químicas más eficientes para atrapar el <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. El gran número de insaturaciones presentes en su estructura molecular les confiere su gran capacidad antioxidante (Bensasson et al., 1976).

### *Glutation reducido*

El GSH representa también un sistema antioxidante secundario, ya que participa en la regeneración de los radicales alfa-tocoferoxil mediante la actuación de la enzima GPx (Battin & Brumaghim, 2009). Como ya hemos señalado, el GSH es un tripéptido (Glutamato-Cisteína-Glicina). Su característica estructural más importante es el grupo tiol de la cisteína, que le

proporciona la peculiaridad de poder participar en reacciones redox; es decir, el GSH se puede oxidar formando GSSG. En condiciones fisiológicas la GR mantiene el 98% del glutatión intracelular en estado reducido, el resto se encuentra en la célula oxidado, o interaccionando con proteínas (GS-S-proteína). El GSH es el tiol no proteico más abundante en todas las especies aeróbicas. Alcanza concentraciones intracelulares comprendidas entre 0,5 y 10 mM, que contrastan con las concentraciones de GSH extracelular, que son normalmente 3 ó 4 veces más bajas. Debido a sus propiedades reactivas, el grupo tiol se considera responsable de algunas funciones del GSH. Estas funciones incluyen el mantenimiento de la estructura y la función de las proteínas, por reducción de los puentes disulfuro de las mismas, la regulación de la síntesis y degradación de las proteínas, el mantenimiento de la función inmune, la protección frente el daño oxidativo, la detoxificación de especies químicas, y también el almacén y transporte de la forma activa de la cisteína (Wang, 1998).

### *Melatonina*

La melatonina es una molécula secretada por la glándula pineal, que posee capacidad neutralizadora de radicales libres ( $O_2^-$ ,  $OH^\bullet$ ,  $^1O_2$ ,  $ROO^\bullet$  y  $ONOO^-$ ). Además, la melatonina exhibe una actividad antioxidante indirecta, que deriva de su efecto estimulante de las enzimas SOD, GPx y GR (Barlow-Walden et al., 1995).

### *Ubiquinol o coenzima Q*

Es un antioxidante liposoluble, que difunde rápidamente a través de la membrana mitocondrial interna. Es un constituyente de la cadena de transporte de electrones con capacidad para estabilizar membranas, ya que inhibe la peroxidación lipídica (Allewa et al., 1995).

### *Flavonoides*

Entre los antioxidantes secundarios de origen exógeno también se encuentran los flavonoides, hecho de relevancia para el planteamiento de esta Tesis Doctoral. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de antioxidantes polifenólicos, que resultan eficaces para la neutralización de los radicales  $\text{ROO}^{\bullet}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$  y  $\text{O}_2^{\bullet -}$  (Rice-Evans & Miller, 1996). Más adelante comentaremos con más detalle estos compuestos en esta Introducción.

#### 1.2.3.3.3 Sistemas antioxidantes terciarios

Se consideran sistemas antioxidantes terciarios a aquellas enzimas reparadoras del daño oxidativo. Hay enzimas reparadoras del ADN, de las proteínas y de los lípidos. A diferencia de los sistemas de defensa antioxidantes, los sistemas de reparación del daño oxidativo se han estudiado poco. Se sabe que en las células se pueden reparar los lípidos oxidados mediante la actuación de fosfolipasas. Así, la fosfolipasa  $A_2$  se une a los peróxidos lipídicos de los fosfolípidos para repararlos (Pacifici & Davies, 1991). Los ácidos nucleicos oxidados se reparan mediante la actuación de glucosilasas. Existen glucosilasas específicas que reconocen y escinden bases oxidadas en la doble cadena del ADN, y reparan así estos ácidos nucleicos (Bohr & Anson, 1995; Croteau & Borh, 1997; Tchou et al., 1991). Además, existen también enzimas reparadoras de proteínas oxidadas (Pacifici et al., 1993; Stadtman, 1995).

### **1.2.4 Tratamiento antioxidante de la hipertensión**

Como hemos señalado en el apartado 1.2.3.2, el estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión arterial y en la disfunción endotelial que acompaña a esta enfermedad. Se ha sugerido por ello que las terapias antioxidantes pueden ejercer una influencia beneficiosa en esta patología (Paravicini & Touyz, 2008). De hecho, se ha demostrado que la

disfunción endotelial que acompaña a la hipertensión, y también la hipercolesterolemia, mejoran en animales de experimentación tratados con antioxidantes (Keaney & Vita, 1995). El tratamiento con SOD y también con otros antioxidantes, mejora la función vascular y renal, promueve el remodelado cardiovascular y desciende la presión arterial en animales hipertensos (Viridis et al., 2004).

Se pueden utilizar terapias antioxidantes de tipo farmacológico o terapias antioxidantes basadas en el control dietético. Entre los fármacos frecuentemente utilizados para el tratamiento de la hipertensión, figuran los inhibidores de la ECA y los antagonistas de los receptores AT<sub>1</sub> de la angiotensina II (ARAI). Ambos grupos farmacológicos se comportan como antioxidantes (Dohi et al., 2003; Ogawa et al., 2006). Los efectos antioxidantes se han atribuido principalmente a que estos compuestos inhiben el efecto de la angiotensina II sobre la NADPH-oxidasa (Touyz, 2005).

Existe cierta controversia respecto a la utilidad que pueden tener los suplementos dietéticos antioxidantes para el tratamiento de la hipertensión, y los resultados con ellos no son consistentes (Paravicini & Touyz, 2008). Se han realizado ensayos clínicos con un elevado número de pacientes, para estudiar el efecto que tienen las vitaminas antioxidantes en la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares, y la mayoría de estos estudios, no pudieron demostrar estadísticamente los efectos beneficiosos de estos compuestos (Jialal et al., 2002; Hasnain & Mooradian, 2004; Paravicini & Touyz, 2008). También fueron negativos los resultados de los ensayos en los que se estudiaban los suplementos de micronutrientes antioxidantes (Ceriello, 2008). Sin embargo, algunos ensayos clínicos con menos pacientes, en los que se estudiaba el efecto de la vitamina C, demostraron una relación inversa entre los niveles de ascorbato (vitamina C) en plasma y la presión arterial (Bates et al., 1998; Duffy et al., 1999; Taddei et al., 1998; Salonen et al., 2003).

Los datos negativos de los ensayos anteriormente mencionados podrían justificarse en base a que los estudios realizados no se habían diseñado para investigar específicamente la acción de los antioxidantes sobre la presión arterial. Otra explicación podría ser que la mayoría de los pacientes de estos estudios tenían una enfermedad cardiovascular avanzada, y en esa situación los efectos deletéreos del estrés oxidativo pueden ser irreversibles. También podría haber influido el hecho de que estos pacientes estaban tomando aspirina, y este compuesto ya tiene propiedades antioxidantes (Wu et al., 2002). Otros investigadores sugirieron que los antioxidantes administrados podrían no ser accesibles a la fuente generadora de radicales libres, ya que concretamente las ROS se generan en compartimentos intracelulares (Cai et al., 2003).

Cuando se llevaron a cabo ensayos con dietas antioxidantes, se pudo comprobar que estas dietas podían tener efectos más beneficiosos sobre la hipertensión que los suplementos antioxidantes (Ceriello, 2008; Paravicini & Touyz 2008). Así, por ejemplo, se ha demostrado que el consumo elevado de frutas y verduras en la dieta, reduce la presión arterial e incrementa la capacidad antioxidante del plasma de sujetos hipertensos y obesos (Appel et al., 1997). Una posible explicación a este hecho es que estas dietas contienen una mezcla de antioxidantes, y que estos antioxidantes podrían actuar en cadena de forma más eficiente, mientras que la suplementación con una o más vitaminas no completa ese efecto antioxidante. También se sabe que si un antioxidante no se recupera después de captar un radical libre, el siguiente paso de la cadena lo convierte en un prooxidante, y por lo tanto hay que tener precaución cuando se utilizan suplementos con determinados micronutrientes, como por ejemplo las vitaminas C y E, que en determinadas circunstancias pueden tener efectos prooxidantes (Paravicini & Touyz, 2008; Ceriello, 2008).

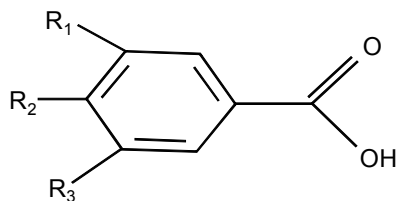
## **1.3 Polifenoles: flavonoides**

### **1.3.1 Origen, estructura y distribución**

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estas moléculas se denominan polifenoles. Los polifenoles son constituyentes habituales de la dieta que poseen principalmente un origen vegetal. Los vegetales sintetizan un elevado número de compuestos fenólicos como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para sus funciones fisiológicas. Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Los polifenoles poseen, de hecho, diferentes actividades terapéuticas, y por ello se han utilizado desde la antigüedad en fitoterapia. Recientemente han suscitado un gran interés desde el punto de vista científico, ya que presentan propiedades antiinflamatorias, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. Se ha sugerido que cuando se ingieren con la dieta pueden también prevenir el desarrollo de diferentes enfermedades (D'Archivio et al., 2007).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Figura 9). Comentaremos con más detalle, el grupo de los flavonoides en esta Tesis Doctoral.

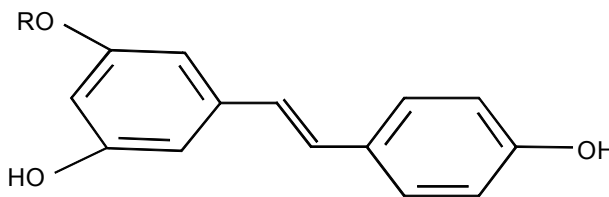
### Derivados del Ácido hidroxibenzoico



$R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$  **Ácido Gálico**

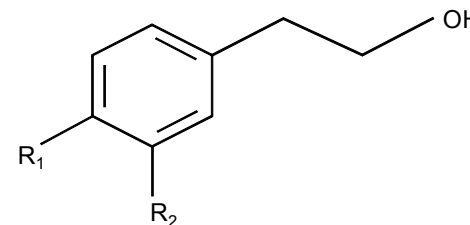
### Derivados del Ácido hidroxibenzoico

#### Estilbenos



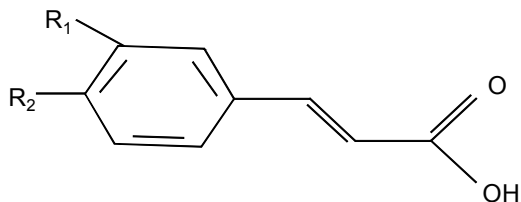
$R = \text{H}$  **Resveratrol**

#### Alcoholes fenólicos



$R_1 = \text{OH}; R_2 = \text{H}$  **Tirosol**

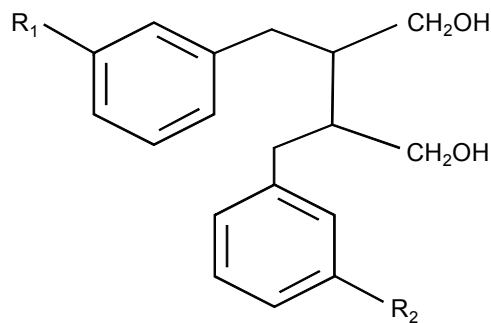
### Derivados del Ácido hidroxicinámico



$R_1 = \text{OH}$  **Ácido p-Cumárico**

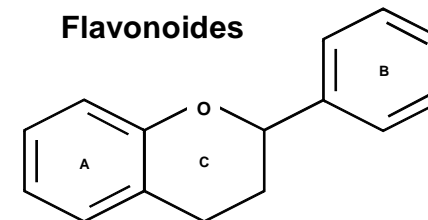
### Derivados del Ácido hidroxicinámico

#### Lignanós



$R_1 = R_2 = \text{OH}$  **Enterodiol**

#### Flavonoides



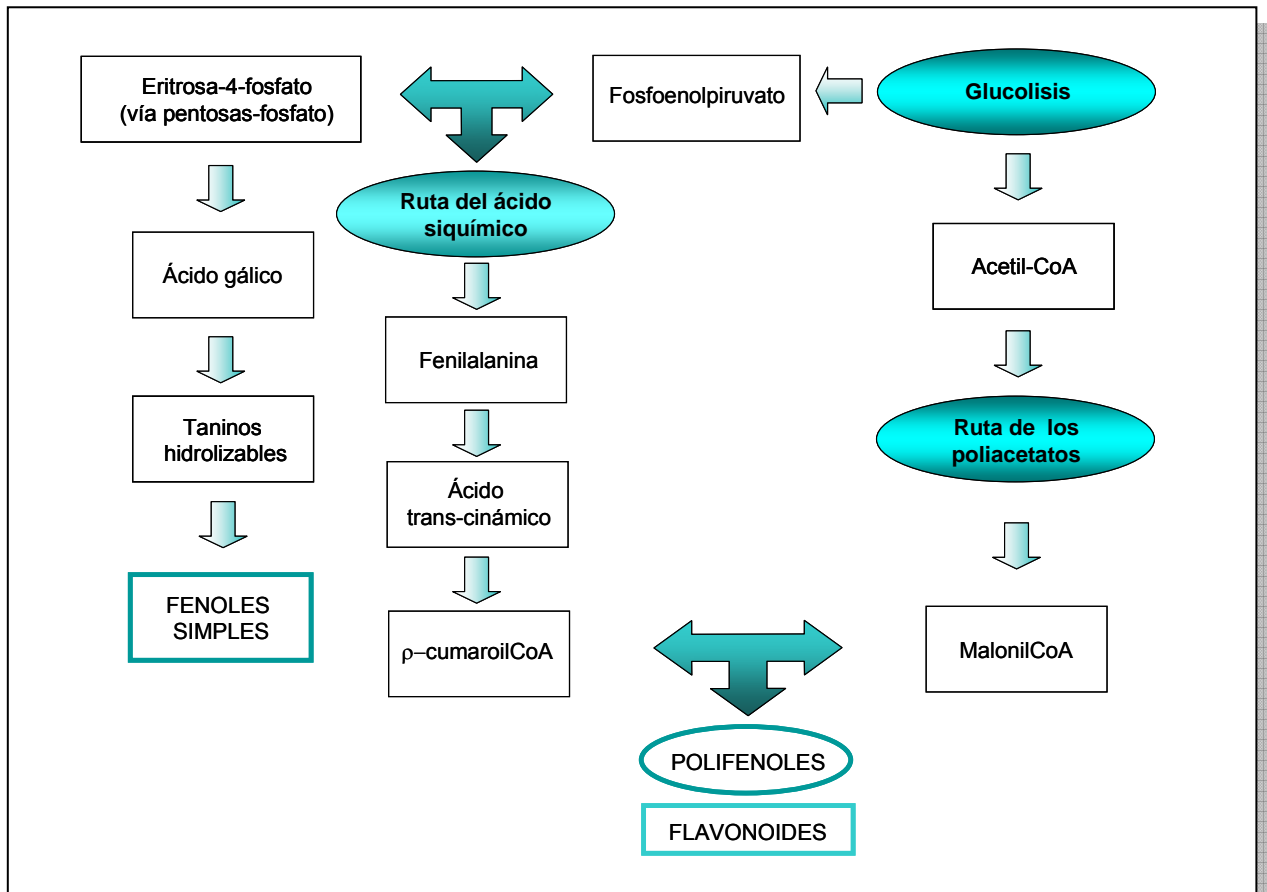
**Figura 9.** Núcleo estructural de los principales grupos de polifenoles. Se señalan los sustituyentes que corresponden a la estructura concreta de algunos compuestos. En la figura 12 se presentarán asimismo los distintos núcleos estructurales de los flavonoides que derivan del núcleo principal que aparece en esta figura.

Los polifenoles son, por lo tanto, productos del metabolismo secundario de las plantas, y su biosíntesis tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos (Bravo, 1998). La ruta del ácido siquímico proporciona la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano). La ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas.

La ruta del ácido siquímico es dependiente de la luz. Se inicia en los plastos por condensación de dos productos típicamente fotosintéticos, la eritrosa-4-fostato, procedente de la vía de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato, originario de la glucólisis. Tras diversas modificaciones, se obtiene el ácido siquímico, del que derivan directamente algunos fenoles. La vía del ácido siquímico puede continuar con la adhesión de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando lugar a la fenilalanina, un aminoácido esencial propio del metabolismo primario de las plantas. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa, que cataliza la eliminación de un grupo amonio, transformando la fenilalanina en el ácido trans-cinámico. Posteriormente, el ácido trans-cinámico se transforma en ácido  $\rho$ -cumárico por incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La acción de una Coenzima A (CoA)-ligasa transforma el ácido  $\rho$ -cumárico en  $\rho$ -cumaroilCoA, que es el precursor activo de la mayoría de los fenoles de origen vegetal.

La ruta de los poliacetatos comienza a partir de una molécula inicial de acetilCoA, y a través de una serie de condensaciones se originan los poliacetatos. Por reducción de los poliacetatos se forman los ácidos grasos, y por ciclación posterior se forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Las rutas mixtas combinan precursores tanto de la vía del ácido siquímico como de la ruta de los poliacetatos. Este es el caso de un importante grupo de

moléculas biológicamente activas, denominadas genéricamente flavonoides (Figura 10).

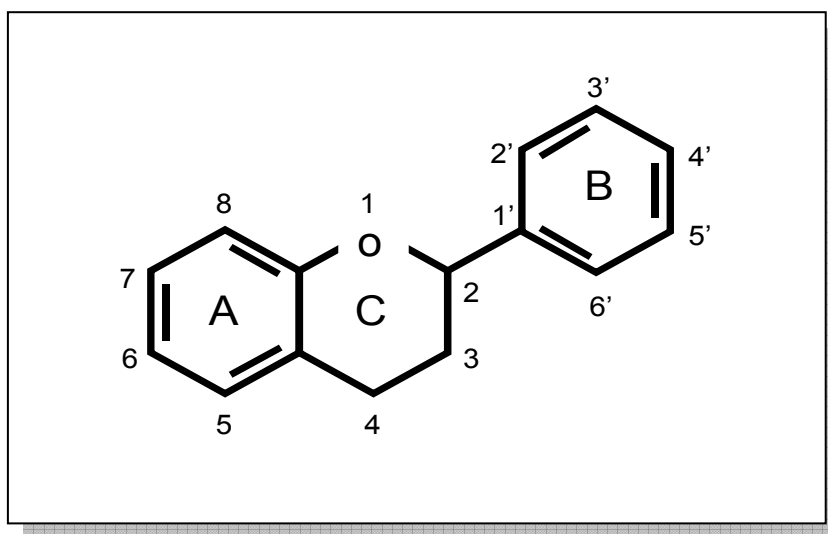


**Figura 10.** Esquema de la ruta biosintética de los polifenoles en las plantas. CoA= Coenzima A.

Los **flavonoides**, con un nombre deriva del latín “flavus”, cuyo significado es “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. El científico húngaro Albert Szent-Györgyi, premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937, los descubrió en el siglo pasado cuando aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, y demostró que su consumo regulaba la permeabilidad de los capilares. A la citrina y a los compuestos afines los denominó “vitamina P” (por permeabilidad). Posteriormente, también observó que estos compuestos poseían propiedades similares a la vitamina C. Mejoraban la absorción de esta vitamina y la

protegían de la oxidación, y por ello también se denominaron “vitamina C<sub>2</sub>” (Singleton, 1981). Sin embargo, no se pudo confirmar que los flavonoides fueran vitaminas, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenil-pirano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico. Los átomos de carbono individuales de los anillos A, B y C se numeran mediante un sistema que utiliza números ordinarios para los anillos A y C, y números primos para el anillo B. De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los poliacetatos, y el anillo B junto con la unidad C3 proceden de la ruta del ácido siquímico (Figura 11). Todos los flavonoides son estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas.



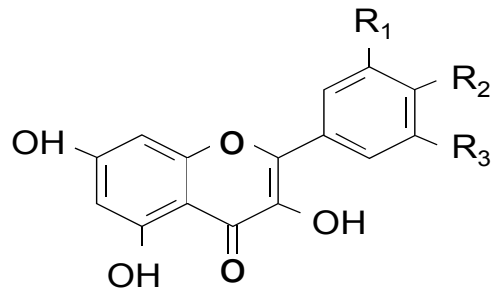
**Figura 11.** Núcleo estructural de los flavonoides con los átomos de carbono numerados.

Los flavonoides se encuentran mayoritariamente como glucósidos, pero también pueden aparecer en forma libre (también llamados agliconas flavonoides). Además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros ó

polímeros. Los glucósidos se pueden encontrar de dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal), o como C-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de enlaces carbono-carbono. De todas estas formas naturales, los O-glucósidos son los mayoritarios.

Existen varios subgrupos de flavonoides. La clasificación de estos compuestos se hace en función del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Dentro de cada familia existen una gran variedad de compuestos, que se diferencian entre sí por el número y la posición de los grupos hidroxilos, y por los distintos grupos funcionales que pueden presentar (metilos, azúcares, ácidos orgánicos). Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: **flavonoles, flavonas, flavanonas (dihidroflavonas), isoflavonas, antocianidinas y flavanoles** (Manach et al., 2004) (Figura 12).

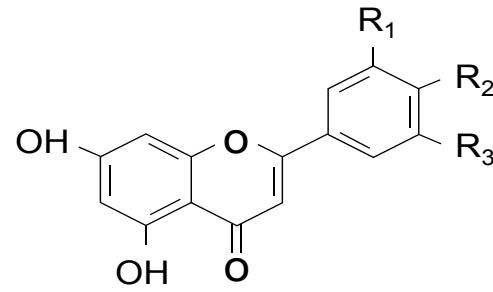
### Flavonoles



$R_1=R_2=OH$ ;  $R_3=H$  Quercetina

$R_2=OH$ ;  $R_1=R_3=H$  Kenferol

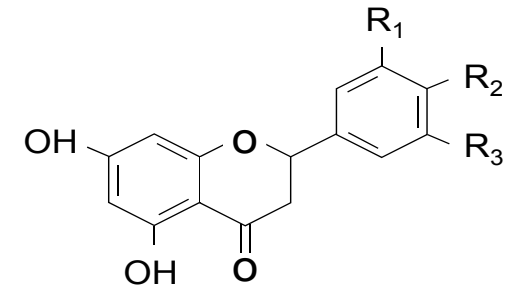
### Flavonas



$R_1=R_2=OH$  Luteolina

$R_1=H$ ;  $R_2=OH$  Apigenina

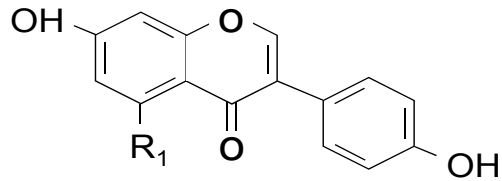
### Flavanonas



$R_1=OH$ ;  $R_2=OCH_3$  Hesperetina

$R_1=H$ ;  $R_2=OH$  Naringenina

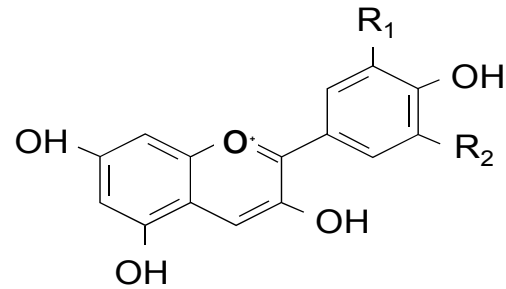
### Isoflavonas



$R_1=OH$  Genisteína

$R_1=H$  Daidzeína

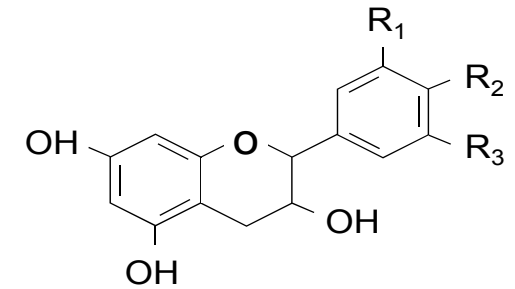
### Antocianidinas



$R_1=R_2=OH$  Delfinidina

$R_1=OH$ ;  $R_2=H$  Cianidina

### Flavanoles



$R_1=R_2=OH$ ;  $R_3=H$  Catequina

$R_1=R_2=R_3=OH$  Galocatequina

**Figura 12.** Núcleo estructural de los principales grupos de flavonoides. Se señalan ejemplos de algunos compuestos que son característicos de cada grupo.

### *Flavonoles*

Se caracterizan por poseer un grupo ceto en el carbono C<sub>4</sub> y una insaturación entre los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Poseen además un grupo hidroxilo adicional en el carbono C<sub>3</sub>. Representan el grupo más ubicuo de polifenoles presente en los alimentos. La quercetina es el compuesto más representativo. Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas. El té y el vino son también alimentos ricos en flavonoles. La biosíntesis de flavonoles es un proceso fotosintético. Por ello, estos compuestos se localizan principalmente en el tejido externo y aéreo de la planta. La distribución y la concentración de los flavonoles puede ser distinta incluso en frutas procedentes de la misma planta; esto se debe a que la localización de los frutos condiciona la exposición al sol.

### *Flavonas*

Poseen un grupo ceto en el carbono C<sub>4</sub> y una insaturación entre los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Son los flavonoides menos abundantes en los alimentos. Perejil y apio representan la única fuente comestible de flavonas. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas.

### *Flavanonas*

Son análogos de las flavonas con el anillo C saturado. Se glucosilan principalmente por la unión de un disacárido en el carbono C<sub>7</sub>. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones en cítricos y en tomates, y también se encuentran en ciertas plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas se localizan mayoritariamente en las partes sólidas de la fruta, en particular en el albedo (membranas que separan los segmentos de las frutas). Por ello, su concentración es hasta cinco veces mayor en la fruta que en los zumos.

### *Isoflavonas*

Poseen un anillo bencénico lateral en posición C<sub>3</sub>. Su estructura recuerda a la de los estrógenos. Las isoflavonas poseen grupos hidroxilos en los carbonos C<sub>7</sub> y C<sub>4'</sub>, al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona). En realidad, las isoflavonas se pueden unir a receptores de estrógenos, y por ello se clasifican como fitoestrógenos. Se pueden presentar como agliconas, o a menudo conjugadas con glucosa, pero son termosensibles y pueden hidrolizarse durante su procesamiento industrial y durante su conservación. Se presentan casi exclusivamente en plantas leguminosas, siendo la soja y sus derivados la principal fuente de isoflavonas.

### *Antocianidinas*

Son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados. La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C ó en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas.

### *Flavanoles*

Poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C<sub>3</sub>. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. A diferencia de otros grupos de flavonoides, sus combinaciones de tipo heterosídico (entre el grupo reductor del azúcar y un grupo tiol) son poco habituales. Los flavanoles más representativos en los

alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (proantocianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Epicatequina y catequina son los compuestos mayoritarios en frutas. Las catequinas también se encuentran en el vino y en el chocolate, que son las fuentes mayoritarias. En cambio, galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato aparecen principalmente en el té (Arts et al., 2000). Es bastante complejo valorar el contenido de proantocianidinas en los alimentos, debido a que poseen un amplio rango estructural y pesos moleculares muy variables. Los únicos datos disponibles hacen referencia a dímeros y trímeros de catequinas, que representan las formas mayoritarias (de Pascual-Teresa et al., 2000). Las proantocianidinas son responsables del carácter astringente de algunas frutas (uvas, manzanas, etc.) y del amargor del chocolate (Rasmussen et al., 2005).

Los flavonoides son pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, mayoritariamente en angiospermas, aunque de forma minoritaria también se encuentran en hongos y algas. Pueden localizarse en distintas zonas de la planta, aunque principalmente aparecen en las partes aéreas. Son compuestos necesarios para el desarrollo fisiológico de los vegetales, y se ubican en la membrana del tilacoide de los cloroplastos. Estas sustancias participan en la vía de expresión de dos enzimas multigénicas, la fenilalanina amonio liasa y la chalcona sintasa, que son enzimas importantes en el proceso de pigmentación de los vegetales. Además, los flavonoides juegan un papel importante en los sistemas de defensa frente a agentes agresores externos. Los flavonoides también pueden actuar como señalizadores químicos, y pueden ejercer distintos efectos directos o indirectos sobre determinadas enzimas que afectan a la fisiología y el metabolismo de los vegetales.

Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos (flavanonas en cítricos, isoflavanos en soja). Otros, como la quercetina, se

pueden encontrar en un gran número de plantas (frutas, vegetales, cereales, leguminosas, té, vino etc.). Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles. Además, numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol, etc.) juegan un papel fundamental. La exposición a la luz es, en particular, uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los polifenoles. El grado de conservación puede también determinar el contenido en polifenoles fácilmente oxidables, permitiendo la formación de más o menos sustancias polimerizadas que afectan al color y a las características organolépticas de los alimentos. La conservación en frío, sin embargo, no afecta al contenido de polifenoles (Van der Sluis et al., 2001). El contenido de polifenoles en los alimentos está también influenciado por los métodos culinarios de preparación; así, el contenido de polifenoles de las frutas y de los vegetales pueden disminuir por el simple hecho de pelar estos alimentos, ya que estas sustancias están a menudo presentes en altas concentraciones en las partes externas de los mismos. La cocción de los alimentos puede disminuir hasta un 75% el contenido inicial de polifenoles (Van der Sluis et al., 2001)

El contenido cualitativo y cuantitativo de polifenoles es diferente en cada especie vegetal. Entre las plantas con alto contenido en polifenoles se encuentran el cacao (*Theobroma cacao*), la uva (*Vitis vinifera*), el té (*Camelia sinensis*), la manzana (*Malus domestica*) y diversas bayas. Así pues, las fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana son principalmente las frutas, el té, el vino y el chocolate. En el cacao los flavanoles están principalmente en forma de epicatequinas, catequinas y procianidinas. El vino es rico en catequinas y procianidinas, y en el té los flavanoles se encuentran fundamentalmente como derivados de galatos (Adamson et al., 1999; Lazarus et al., 1999). A continuación se muestra una tabla del contenido de polifenoles encontrados en distintos alimentos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Contenido en polifenoles (mg) de distintos alimentos.

GRUPO ALIMENTICIO	ALIMENTO	Ácidos fenólicos	FLAVONOIDES					FENOLES TOTALES	
			Flavonoles	Catequinas monómeros	Procianidinas	Flavanonas	Antocianidinas	Cromatografía	Ensayo Folin <sup>3</sup>
VEGETALES	Patatas (200 g)	28						28	57
	Tomates (100 g)	8	0,5					8	37
	Lechuga (100 g)	8	1					9	23
	Cebolla (20 g)		7					7	18
FRUTAS	Manzana (200 g)	11	7	21	200 <sup>1</sup>			239	440
	Fresas (50 g)	37	1	3	35		200	276	
OTROS	Salvado de trigo (10 g)	50						50	
	Chocolate negro (20 g)			16	861			102	168
BEBIDAS	Zumo de naranja(100 mL)					22		22	75
	Café (200 mL)	150						150	179
	Té negro (200 mL)		8	130				138	200
	Vino tinto (125 mL)	12	2	34	45 <sup>2</sup>		4	97	225

Tomado de Fernández-Larrea et al., 2007. <sup>1</sup>Oligómeros hasta decámeros. <sup>2</sup>Oligómeros hasta trímeros. <sup>3</sup>Estimado mediante el ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu como equivalentes de catequina o ácido gálico. Los valores están sobreestimados para las muestras con ácido ascórbico.

### **1.3.2. Biodisponibilidad de los polifenoles**

La definición de biodisponibilidad más comúnmente aceptada hace referencia a “la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación”. Es importante conocer la cantidad total de polifenoles que está presente en un alimento o ingrediente alimentario, pero, teniendo en cuenta la definición anterior de biodisponibilidad, es más importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible, dentro del contenido total de un alimento. (Srinivasan, 2001).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. En realidad, en los alimentos, prácticamente todos los flavonoides, excepto los flavanoles, presentan formas glucosiladas. El destino de los glucósidos en el estómago aún no está claro. La mayoría de los glucósidos resisten probablemente la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino (Gee et al., 1998). Estas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales como la  $\beta$ -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa, o deben ser degradadas por la microflora del colon antes de poder asimilarse (Németh et al., 2003). Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren, por tanto, diversas modificaciones. De hecho, estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucuronidación en el hígado. 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, y esto dificulta la tarea de identificación de los metabolitos y la evaluación de su actividad biológica (Day & Williamson 2001; Natsume et al., 2003). Los principales objetivos de los estudios de biodisponibilidad son, en realidad, determinar cuáles son los polifenoles que mejor se absorben, valorar que polifenoles dan lugar a metabolitos activos, y caracterizar la actividad biológica de estos metabolitos. La estructura química

de los polifenoles, más que su concentración, determina el rango de absorción y la naturaleza de los metabolitos circulantes en el plasma. La glucosilación afecta al grado de absorción de los polifenoles. Los polifenoles más comunes de nuestra dieta no son necesariamente los que producen una mayor concentración de metabolitos activos en los tejidos diana, y, desde luego, las propiedades biológicas difieren en gran medida de unos polifenoles a otros.

Para estudiar indirectamente la biodisponibilidad de los polifenoles se puede evaluar el incremento en la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de alimentos ricos en estos compuestos (Duthie et al., 1998; Young et al., 1999). Para realizar estudios directos de biodisponibilidad, se puede medir la concentración del compuesto en el plasma y en la orina tras la ingestión de alimentos con cantidades conocidas de los polifenoles a analizar (Marrugat et al., 2004; Fitó et al., 2007).

Uno de los polifenoles más estudiado es la quercetina. Estudios experimentales en ratas, han demostrado que la quercetina puede absorberse a nivel gástrico, pero sus glucósidos no se absorben a este nivel (Piskula et al., 1999; Crespy et al., 2002). La glucosilación de la quercetina facilita, sin embargo, su absorción a nivel intestinal. Allí los glucósidos de quercetina se absorben mejor que su propia aglicona (Morand et al., 2000). Se ha sugerido que los glucósidos pueden ser transportados al interior del enterocito, por un transportador de glucosa dependiente de sodio (Hollman et al., 1995), y el glucósido se hidrolizaría después por una  $\beta$ -glucosidasa citosólica (Day et al., 1998). El metabolismo de la quercetina en humanos se ha caracterizado extensamente. En muestras de plasma de voluntarios que recibieron quercetina por vía oral, se encontraron formas conjugadas de quercetina distintas a las administradas (Graefe et al., 2001; Erlund et al., 2000; Sesink et al., 2001).

En la rata y el ratón, las antocianidinas también pueden absorberse en el estómago (Matuschek et al., 2006; Talavera et al., 2003). Las proantocianidinas

difieren del resto de polifenoles en su estructura polimérica que las caracteriza y confiere un alto peso molecular. Su peso molecular limita su absorción en el intestino delgado; sobre todo cuando se trata de compuestos con estructura superior a trímeros (Halliwell et al., 2000).

Sabemos, por tanto, que una vez absorbidos, los polifenoles están sujetos a procesos de detoxificación metabólica, que incluyen distintas modificaciones como metilación, sulfatación y glucuronidación. 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 de polifenol ingerida. El balance entre sulfatación y glucuronidación de los polifenoles varía en función de la especie y el sexo (Piskula, 2000). Es importante identificar la posición de los grupos conjugados sobre la estructura polifenólica, ya que estas modificaciones pueden afectar a sus propiedades biológicas (Day et al., 2000). Sin embargo, hay pocos datos disponibles de las cantidades en plasma de los distintos tipos de conjugados polifenólicos y sus formas libres (Shelnutt et al., 2002; Manach et al., 2003).

Los metabolitos circulantes se pueden unir a proteínas del plasma; principalmente a la albúmina. La afinidad de los polifenoles a la albúmina varía en función de su estructura química (Dangles et al., 2001; Dufour & Dangles, 2005). La capacidad de unión a la albúmina puede determinar la presencia del metabolito en células y tejidos. Sin embargo, está poco claro si los polifenoles han de estar en forma libre para ejercer su actividad biológica, o si, como se ha demostrado recientemente para la quercetina, pueden estar unidos a la albúmina (Dufour & Loonis, 2007).

La concentración de polifenoles en el plasma es muy variable; depende principalmente de su estructura química y de su fuente de origen. No suele ser superior a 1  $\mu\text{M}$ , y es necesario ingerir estos compuestos de forma reiterada a lo largo del tiempo para mantener sus concentraciones elevadas en el plasma. (van het Hof et al., 1999). Los escasos estudios realizados en humanos han

señalado que la concentración de polifenoles en plasma no está directamente relacionada con la concentración de polifenoles en los tejidos. Además, la distribución entre plasma y tejidos difiere para los distintos tipos de polifenoles (Henning et al., 2006). Por lo tanto, puede ser incluso más importante determinar polifenoles en los tejidos que conocer su concentración en el plasma. Fundamentalmente, los polifenoles se encuentran en el hígado y el intestino, tejidos donde se metabolizan estos compuestos. Los datos sobre el contenido de polifenoles en los restantes tejidos son muy escasos.

Los polifenoles que no pueden absorberse en el intestino delgado alcanzan el colon, y allí la microflora hidroliza glucósidos en agliconas y metaboliza masivamente las agliconas en distintos ácidos aromáticos (Kühnau, 1976). Las agliconas se hidrolizan por apertura del anillo heterocíclico en diferentes puntos, dependiendo de su estructura química, y además se pueden liberar diferentes ácidos que se metabolizan hasta generar ácido benzoico. La microflora del colon genera en ocasiones metabolitos activos específicos, como el equol, enterolactona y enterodiol. El equol parece que tiene propiedades fitoestrogénicas que son aún mayores que los compuestos originales de isoflavona (Setchell et al., 2002), y la enterolactona y el enterodiol, producidos a partir de la linaza (semilla del lino), presentan efectos agonistas ó antagonistas sobre los estrógenos (Mousavi & Adlercreutz, 1992).

Los polifenoles y sus derivados se excretan por vía urinaria o por vía biliar. Diversos estudios han demostrado que el contenido de polifenoles no modificados presentes en la orina, varía según se trate de unos compuestos fenólicos u otros. Se han observado incluso variaciones inter-individuales, probablemente debido a diferencias en la composición de la microflora del colon, que afecta al metabolismo de los polifenoles (Fuhr & Kummert, 1995). La cantidad total de metabolitos excretados en orina puede correlacionarse, sin embargo, con la máxima concentración en el plasma. Las concentraciones halladas en la orina son de 0,5-6% para algunas catequinas del té (Yang et al.,

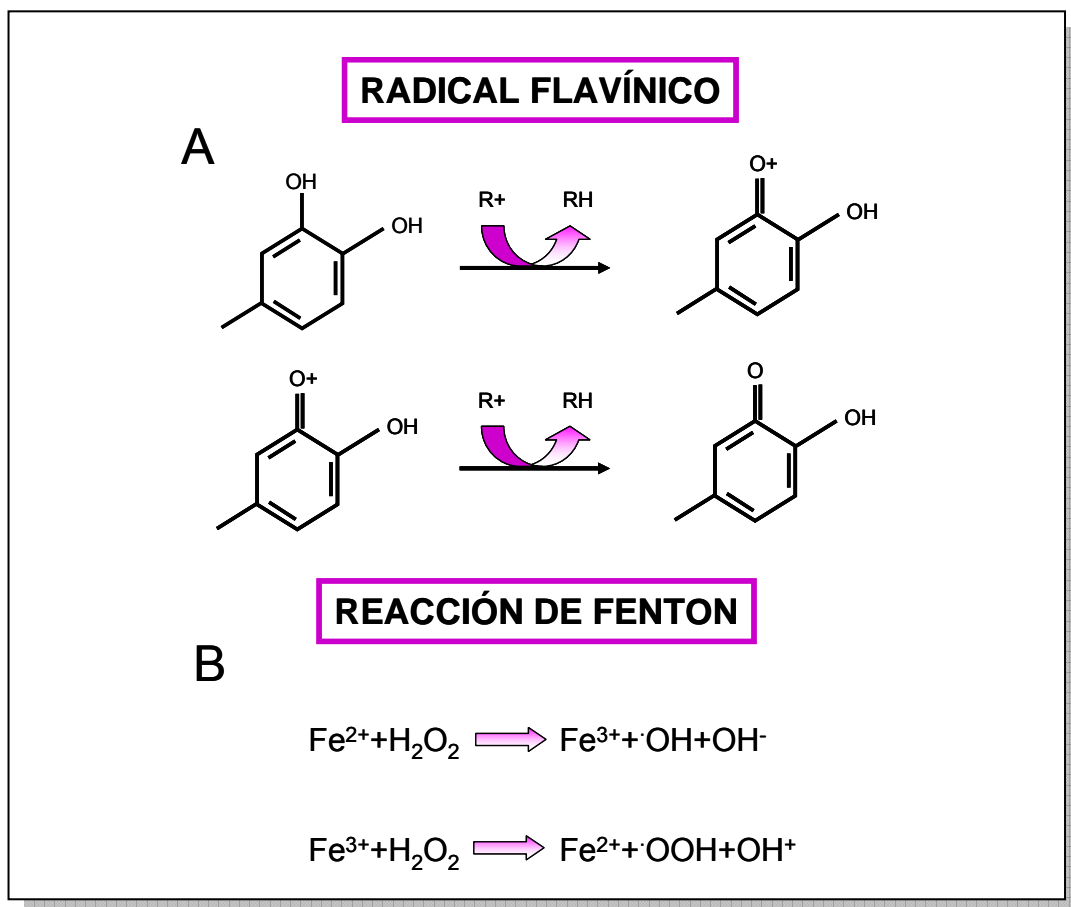
2000), de 2-10% para las catequinas del vino (Donovan et al., 2002) y de hasta un 30% para la epicatequina del cacao (Baba et al., 2000).

### **1.3.3. Propiedades beneficiosas de los flavonoides a nivel cardiovascular**

Numerosos estudios han avalado las propiedades biológicas de los polifenoles (Waterhouse et al., 1996; Rice-Evans, 2001). En los últimos años, los flavonoides han recibido una atención especial, debido a sus efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular (Schroeter et al., 2003; Grassi et al., 2005; Keen et al., 2005; Potenza et al., 2007; Perez-Vizcaíno et al., 2009). Estos efectos son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes que pueden usualmente justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como sus acciones antitrombóticas, antilipémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas. La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y consecuentemente interferir mecanismos de señalización y otros procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de oxidación y reducción.

Los polifenoles son, en realidad, los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la de la vitamina C, y 100 veces superior a la de la vitamina E o los carotenoides (Middleton et al., 2000). Algunos alimentos sabemos que destacan por su alto contenido en polifenoles. Entre ellos el té, el vino y el cacao. Los polifenoles contenidos en estos alimentos son altamente efectivos como defensa antioxidante (Cos et al., 2004). Flavonoides como la catequina o la quercetina pueden directamente neutralizar ROS, como el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  (Pannala et al., 1997) o el HClO (Binsack et al., 2001). La quercetina y la miricetina, seguidas por el kenferol, son los flavonoides que poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres. El grupo fenólico que poseen puede actuar directamente capturando electrones desapareados

de las ROS, y genera así especies menos reactivas (Cotelle et al., 1996). Los flavonoides actúan fundamentalmente como tampones, y capturan radicales libres para generar el radical flavínico, mucho menos reactivo, ya que en él los electrones desapareados están más deslocalizados (Figura 13A). Además, flavonoles como la quercetina pueden quelar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre, evitando así la formación de las ROS producidas por la reacción de Fenton (Figura 13B) (Korkina & Afanasev, 1997; Nijveldt et al., 2001; De Luis & Aller, 2008).



**Figura 13.** Formación del radical flavínico por la captura de radicales libres por los polifenoles (A). Reacción de Fenton (B).

Los polifenoles también pueden interferir con los sistemas de detoxificación celular, como la SOD, la catalasa o la GPx (Krinsky, 1992). Además, estos compuestos pueden inhibir enzimas generadoras de ROS,

como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (Nijveldt et al., 2001; Orallo et al., 2002).

Los polifenoles del té muestran una fuerte capacidad antioxidante *in vitro*, y su efecto es hasta 5 veces más efectivo que el de la vitamina C o la vitamina E (Dreosti, 1996). Recientemente, se ha observado que el flavonoide epigallocatequina galato, procedente del té, puede regular la producción de ROS, modulando la actividad del glutatión y de la enzima citocromo P450 (Raza & John, 2005). El vino también es rico en polifenoles antioxidantes, principalmente ácidos fenólicos, resveratrol, flavonoles, flavanoles, procianidinas y antocianinas (Rice-Evans & Millar, 1996; Fuhrman & Aviram, 2001). El cacao es uno de los alimentos que mayor cantidad de flavonoides contiene, principalmente epicatequina y catequina (Lee et al., 2003; Manach et al., 2004). El estudio del cacao y sus derivados ha suscitado actualmente gran interés entre los científicos, pues, por su elevado poder antioxidante, hoy día el cacao puede considerarse un buen candidato para su uso como alimento funcional en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y patologías asociadas al estrés oxidativo.

Como consecuencia de su acción antioxidante, los polifenoles pueden actuar de manera beneficiosa sobre numerosas patologías, y como ya hemos señalado, estos compuestos poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios y antiapoptóticos (Perez-Vizcaíno et al., 2002; Dell'Agli et al., 2004; Williams et al., 2004; Schroeter et al., 2006). Además de las propiedades vasodilatadoras que favorecen el control del tono arterial, se han descrito otras propiedades de los flavonoides que favorecen también su efecto cardioprotector. Los flavonoides poseen efectos antilipémicos y antiaterogénicos (Ruf, 1999; Dell'Agli et al., 2004; Williams et al., 2004). Habría además que señalar, que algunos estudios han demostrado que estos compuestos también pueden inhibir la ECA, y la inhibición de esta enzima justificaría también sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Actis-Goretta et al., 2006; Ojeda et al., 2010). A continuación comentaremos más

detalladamente algunos de los estudios que han demostrado todos estos efectos, y que, por consiguiente, avalan las propiedades cardioprotectoras de los polifenoles.

### **1.3.3.1 Efectos vasodilatadores**

Como hemos comentado en el apartado 1.2 de la Introducción, la homeostasis vascular se consigue gracias a una producción y una biodisponibilidad adecuada del NO. Este mediador juega un papel fundamental en la regulación del tono vascular. Varios estudios realizados en anillos de aorta o en arterias mesentéricas de ratas, muestran que los compuestos polifenólicos presentes en el vino tinto pueden inducir relajación endotelio-dependiente (Fitzpatrick et al., 1993; Andriambelason et al., 1997; Perez-Vizcaíno et al., 2006). Se ha descrito que este efecto está principalmente mediado por la producción de NO (Andriambelason et al., 1997; Zenebe et al., 2003; Duarte et al., 2004). En algún caso se ha descrito que los polifenoles modulan la producción de NO en células endoteliales a través de un mecanismo dependiente del calcio extracelular (Andriambelason et al., 1999), pero también podrían estar implicados en este efecto otros procesos (Fitzpatrick et al., 1995; Woodman et al., 2004). El resveratrol y la quercetina se ha demostrado que inducen un incremento de la concentración intracelular de calcio en las células endoteliales, y lo hacen por activación de canales de  $K^+$  o por inhibición de las  $Ca^{++}$ -ATPasas del retículo endoplasmático (Mckenna et al., 1996; Li et al., 2000; Romero et al., 2009). La delfinidina, una antocianina presente en el vino tinto, es también capaz de estimular las células endoteliales e inducir en ellas un incremento de  $Ca^{++}$  intracelular. Estos estudios han revelado que el efecto vasodilatador de los flavonoides, se debe principalmente a la producción de NO en el endotelio y al aumento del guanosín monofosfato cíclico ( $GMP_C$ ) (Martin & Andriantsitohaina, 2002). También se ha comprobado que una dieta rica en quercetina ocasiona un incremento en la actividad de la NOS, y con ello, aumento de la producción de NO y de  $GMP_C$ . La ausencia en la sobreexpresión del gen de la eNOS, indica que los mecanismos de acción

implicados en la activación de la enzima no son transcripcionales (Benito et al., 2002). Sin embargo, otros autores también concluyen que los flavonoides pueden incrementar la actividad de la eNOS al mismo tiempo que se inhibe por vía transcripcional la expresión del gen de la iNOS (Kim et al., 1999; Olszanecki et al., 2002). Los polifenoles del vino también pueden promover la liberación de NO endotelial a través de vías sensibles a procesos de oxido-reducción (Ndiaye et al., 2005). También se ha descrito que los compuestos polifenólicos del vino tinto pueden modular los niveles de NO en células endoteliales actuando sobre las fosfodiesterasas (PDE) PDE-2 y PDE-4, que catalizan la degradación de los nucleótidos cíclicos, adenosín monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>) y GMP<sub>c</sub> (Beretz et al., 1986; Beretz et al., 1986; Lugnier & Schini, 1990). Recientemente, se ha demostrado que las antocianinas pueden inhibir *in vitro* la PDE-5 específica de GMP<sub>c</sub> (Orallo et al., 2004; Orallo et al., 2005; Dell'Agli et al., 2005). Los flavonoides del cacao también pueden incrementar la producción de NO en el tejido endotelial, provocando así un efecto vasodilatador (Hermann et al., 2006).

Es importante también el efecto antioxidante que ejercen los flavonoides a través de la neutralización y disminución de la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que promueven. Algunos estudios realizados en animales y algunos ensayos clínicos demuestran que los polifenoles disminuyen los niveles de ROS y MDA en el corazón (Bagchi et al., 2003).

### **1.3.3.2 Efectos antilipémicos y antiaterogénicos**

Una de las propiedades beneficiosas más estudiadas de los polifenoles es su capacidad para mejorar el perfil lipídico. De este modo, pueden prevenir el desarrollo y aparición de aterosclerosis. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la progresiva obstrucción de las arterias como consecuencia de la acumulación de lípidos en la pared arterial. Estos lípidos atraviesan el endotelio y se oxidan en las células endoteliales, en las células de la musculatura lisa vascular y en los macrófagos (Aviram & Rosenblat, 1994;

Fuhrman & Aviram, 2001). La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) puede amplificarse por la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno, y se acompaña de disfunción de las células endoteliales y de la formación de las células espumosas a partir de los macrófagos. También se produce la migración de las células del músculo liso desde la capa media a la íntima, con la consecuente proliferación de las células del músculo liso en la zona neoíntima. Todo ello provoca una excesiva deposición de matriz extracelular y la adhesión al endotelio vascular de leucocitos, monocitos y linfocitos T. La acumulación de macrófagos en ese lugar, para eliminar las moléculas de LDL oxidadas, provoca además un proceso inflamatorio, con un reclutamiento de células y con la proliferación y migración de células del músculo liso. También aumenta el depósito de matriz extracelular alrededor de la zona donde se localiza la inflamación, y esto permite la formación de la llamada placa de ateroma, que ocluye más o menos el vaso (Abu-Amsha et al., 1996; Fuhrman & Aviram, 2001). El paso final del proceso aterogénico es la ruptura de la placa aterosclerótica y la activación plaquetaria que provoca la formación de trombos (Ross, 1999). Todos estos procesos van acompañados de episodios de vasoconstricción, por inhibición de la formación de NO y por la pérdida de la capacidad natural de relajación que tienen las arterias (Ridker et al., 2004).

Los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre la aterosclerosis se han estudiado ampliamente. Estos compuestos son capaces de atenuar el inicio y la progresión de esta enfermedad debido a su habilidad para atenuar la oxidación de las LDL. Son capaces además de producir un incremento en la concentración de HDL colesterol en el plasma, y también de inhibir la proliferación del músculo liso vascular (Fuhrman et al., 1995; Stein et al., 1999; Cordova et al., 2005).

Numerosos trabajos relacionan el efecto de los flavanoles, tanto monoméricos como oligoméricos, con la protección de la oxidación de las LDL (Kondo et al., 1996; Osakabe et al., 2001; Mathur et al., 2002). Se sabe, en realidad, que el consumo moderado de vino resulta beneficioso, y este hecho

fue inicialmente descrito como la “paradoja francesa” (Constant, 1997). Concretamente, se ha demostrado que el resveratrol, uno de los principales polifenoles del vino, previene la oxidación de las LDL y disminuye la citotoxicidad producida por las LDL oxidadas en células endoteliales (Ou et al., 2006). Se ha observado también que los polifenoles procedentes del vino tinto y del zumo de uva reducen la concentración de lípidos plasmáticos (Vinson et al., 2001). A largo plazo, los polifenoles del vino tinto tienen un efecto inmediato sobre la lipemia posprandial. El incremento de hidroperóxidos lipídicos, altamente aterogénicos y típicos de la situación posprandial, es mucho menor cuando se consume vino tinto en las comidas y, además, con el vino el nivel de oxidación de las LDL posprandiales es mucho menor (Ursini et al., 1998). También se ha descrito que la administración oral de polifenoles reduce el crecimiento de la neointima y la deposición de lípidos en la arteria iliaca de conejos hipercolesterolémicos (Elbaz et al., 2005).

Las procianidinas del cacao afectan también muy favorablemente al perfil lipoproteico (Kondo et al., 1996; Osakabe et al., 2001; Mathur et al., 2002). Se ha demostrado que la administración crónica de procianidinas en conejos alimentados con dieta hipercolesterolemica, disminuye los niveles plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos e incrementa la capacidad antioxidante del plasma de estos animales. De hecho, esta administración previno la aparición de aterosclerosis e inhibió su progresión en los animales (Ursini et al., 1999). También se comprobó que la administración crónica de procianidinas en hámsteres que desarrollan depósitos lipídicos aterogénicos similares a los que aparecen en humanos hipercolesterolémicos, reducía los niveles plasmáticos de colesterol, triglicéridos, apolipoproteína B y MDA, cuando los hámsteres se alimentaban con una dieta hipercolesterolémica. Este efecto se asoció con una disminución en los depósitos de células espumosas en la pared arterial y con una inhibición del desarrollo de la placa aterosclerótica (Auger et al., 2004). La administración aguda de procianidinas en ratas normolipémicas alimentadas con dieta estándar, produjo también una disminución drástica de los valores de triglicéridos, ácidos grasos libres y apolipoproteína B, así como un aumento del

cociente colesterol-HDL/colesterol LDL en plasma, lo que representa una situación de lipemia posprandial claramente antiaterogénica (Del Bas et al., 2005). En algunos ensayos clínicos también se ha comprobado que los suplementos de procianidinas reducen significativamente los valores de las LDL oxidadas en pacientes hipercolesterolémicos (Bagchi et al., 2003).

Se ha descrito también que las procianidinas del cacao inhiben el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), marcador pro-inflamatorio en las células endoteliales vasculares, reduciendo así la adhesión al endotelio de los linfocitos-T (Bagchi et al., 2003; Kalin et al., 2002). En las células del músculo liso, las procianidinas se unen al receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR). Este bloqueo produce la inhibición de las señales proliferativas y migratorias mediadas por este factor, e inhibe la migración de las células del músculo liso a la zona íntima, y también su proliferación (Iijima et al., 2002). Así, la epigallocatequina-3 galato y la catequina-3 galato se unen al receptor PDGFR e inhiben la señal proliferativa de las células de músculo liso. Este efecto evita uno de los principales componentes de la inflamación crónica de los vasos sanguíneos que promueve la aterosclerosis (Esterbauer et al., 1992; Steinberg, 1997).

### **1.3.3.3 Efecto antitrombótico**

La agregación plaquetaria también juega un papel fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis, y el efecto antiagregante puede asociarse con una menor incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular. En un estudio realizado con antocianinas pudo demostrarse que estos compuestos son capaces de inhibir la función plaquetaria (Rechner et al., 2005). El efecto antitrombótico de los polifenoles puede justificarse en base a su capacidad para inhibir enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides, como el  $TXA_2$ , la ciclooxigenasa (COX), y la lipooxigenasa (LPO). Estos compuestos inhiben por lo tanto la síntesis de moléculas derivadas del ácido araquidónico que están directamente involucradas en la regulación de la homeostasis vascular

(de Gaetano et al., 2002). Los efectos positivos de los flavanoles del cacao y el chocolate, se han demostrado mayoritariamente con modelos *in vitro*. Se ha visto que las procianidinas del cacao estimulan la formación de PGI<sub>2</sub> (inhibidor de la agregación plaquetaria) e inhiben la formación de los leucotrienos (agentes vasoconstrictores y estimulantes de la inflamación) (Rein et al., 2000). Por ello, podemos decir que los polifenoles del cacao, inhiben la coagulación y favorecen la fluidez sanguínea, evitando la formación de trombos. Disminuyen, por tanto, el riesgo de un accidente vascular (Schramm et al., 2001; Schewe et al., 2001). Al parecer los polifenoles del cacao actúan en cierto modo a través de mecanismos diferentes a los de la aspirina, y sus efectos con ella serían complementarios (Pearson et al., 2002).

#### **1.3.3.4 Efecto antiinflamatorio**

Se sabe que en la enfermedad cardiovascular tiene lugar un importante proceso inflamatorio (Rader, 2000). Se han publicado diversos estudios que implican a las células y a las moléculas relacionadas con la respuesta inmunológica en el proceso de la lesión vascular asociado a la aterosclerosis (Ridker, 1997; Tracy et al., 1997; Ridker, 1997). El estrés oxidativo produce un aumento de enzimas tales como la COX y la LPO, implicadas en la liberación de factores tales como interleuquinas y quimocinas. Se ha demostrado que los polifenoles, y especialmente la quercetina, inhiben la COX y la LPO (Ferrándiz & Alcaráz, 1991; Crescente et al., 2009). El resveratrol también se considera una molécula con acción antiinflamatoria, ya que es capaz de inhibir la biosíntesis de prostaglandinas (Martínez et al., 2000; Fan et al., 2008). Badia et al., en 2004, observaron que el consumo moderado de vino tinto en humanos era capaz de reducir la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, y este efecto se relacionaba con la regulación de las moléculas de adhesión localizadas sobre la superficie del monocito (Badia et al., 2004). La curcumina, un pigmento polifenólico procedente de la cúrcuma y componente del “curry”, también tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y se ha comprobado que este pigmento bloquea la activación del factor de transcripción

NF- $\kappa$ B, un factor decisivo en las respuestas de señalización rápida, que se localiza en el citoplasma, y que participa en las vías de señalización de la célula cardíaca (Jobin et al., 1999).

### **1.3.3.5 Efecto apoptótico y antiapoptótico**

La apoptosis, o “muerte celular programada”, es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que tiene lugar de forma fisiológica durante la morfogénesis y la renovación tisular, y también en los procesos de regulación del sistema inmunitario. La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos en los seres vivos. Cuando una célula muere por apoptosis, empaqueta su contenido genético y evita que se produzca la respuesta inflamatoria característica de la muerte accidental o necrosis. Las células en proceso de apoptosis reducen su tamaño y fragmentan su contenido genético. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocitosis y, consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente. La aparición de trastornos en la regulación de los genes responsables del proceso apoptótico puede contribuir al desarrollo de diversas enfermedades como tumores, enfermedades autoinmunes, o enfermedades neurodegenerativas (Thompson, 1995; Hetts, 1998). En los últimos años se han publicado varios estudios que sugieren que las alteraciones de los procesos apoptóticos pueden estar relacionadas con la enfermedad cardiovascular (Tedgui & Mallat, 2003; Gurbanov & Shiliang, 2006).

La regulación de la proliferación y de la muerte celular por apoptosis en las células del músculo liso vascular, es un factor importante para la configuración de la estructura normal de la pared vascular en condiciones fisiológicas. Cuando la proliferación de las células del músculo liso vascular sobrepasa el fenómeno de apoptosis, se produce una acumulación de células en este tejido, y consecuentemente el engrosamiento de la capa media y la pared de las arterias pequeñas, característico de la hipertensión (Hamet, 1995).

La apoptosis es además el principal mecanismo de muerte celular en el endotelio en condiciones fisiológicas. El equilibrio proliferación-apoptosis de las células endoteliales, desempeña un papel fundamental en la formación y regresión de los vasos sanguíneos, especialmente en las arteriolas y los capilares. Una apoptosis excesiva de estas células puede provocar la disfunción endotelial característica de las enfermedades cardiovasculares, y merece especial consideración la apoptosis endotelial durante el desarrollo de la aterosclerosis (Karsan & Harlan, 1996; Bombeli et al., 1997; Dimmeler et al., 1997; Galle et al., 1999).

Se ha descrito que los flavonoides poseen distintos efectos moduladores de la apoptosis. Se comprobó que algunos flavonoides como el resveratrol pueden inducir apoptosis en células endoteliales de vena umbilical humana (Szende et al., 2000). También se ha descrito que la teasinensina A, un polímero formado por unidades de antocianidinas procedente del té de *oolong*, induce apoptosis en células tumorales (Pan et al., 2000). Los polifenoles también pueden modular el nivel de expresión de distintos factores pro-apoptóticos. De hecho, se ha descrito que el resveratrol induce procesos de apoptosis mediante la regulación de factores pro-apoptóticos (Nam et al., 2001; Tinhofer et al., 2001).

Estudios *in vitro* en células endoteliales de aorta bovina y en fibroblastos, han demostrado que los polifenoles también poseen una actividad inhibitoria de la apoptosis inducida por la oxidación de las LDL y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vieira et al., 1998).

Debido a las propiedades pleiotrópicas de los polifenoles y el potencial sinérgico de acción sobre el endotelio vascular, estos compuestos podrían considerarse buenos candidatos para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. No obstante, los efectos saludables de los polifenoles no afectan solo al aparato cardiovascular. Aunque no se han estudiado tan extensamente los efectos beneficiosos de los polifenoles sobre otras patologías, existen algunos estudios que demuestran los efectos del

chocolate o de los extractos del cacao sobre células tumorales de animales (Yamagishi et al., 2002; Yamagishi et al., 2003), sobre el daño gástrico y hepático producido por el alcohol (McKim et al., 2002; Osakabe et al., 1998), sobre la protección del intestino (Scalbert et al., 2000), sobre la estabilidad de los glóbulos rojos (Zhu et al., 2005), sobre las cataratas inducidas por la diabetes (Osakabe et al., 2004), y sobre la inflamación (Sies et al., 2005), Todos estos estudios respaldan de algún modo el efecto beneficioso de estos compuestos.

## **1.4. El cacao**

### **1.4.1 Historia del cacao**

El origen del cacao se remonta a más de 2.500 años, cuando los mayas empezaron a cultivar el árbol del cacao. En la época de los mayas, las semillas del cacao tenían un gran valor por sus cualidades nutritivas y porque se utilizaban además como moneda de cambio. De hecho, la palabra cacao proviene del término “cac”, que en maya significa rojo (en referencia al color de la cáscara del fruto), y del término “cau”, que expresa las ideas de fuerza y fuego. Posteriormente, los aztecas aprendieron de los mayas el cultivo y el uso del cacao y elaboraron una bebida aromática con las semillas denominada “xocolatl”, que proporcionaba gran energía y vitalidad. Cristóbal Colón fue el primer europeo que descubrió los granos de cacao. Durante su cuarto viaje al continente americano, al llegar a lo que hoy en día es Nicaragua, recibió unas semillas de regalo, pero no les dio mucha importancia debido a su sabor amargo. Posteriormente, Hernán Cortés, en 1519, propició sin embargo su conocimiento y difusión al comprobar el valor nutritivo de la bebida elaborada con las semillas del cacao, pues comprobó que sus tropas podían aguantar un día entero de marcha con sólo un vaso de esta bebida.

El cacao llegó a España de la mano de algunos monjes que viajaban en las expediciones de Hernán Cortés. Estos monjes enviaron semillas de cacao junto con las instrucciones para su preparación al Abad del Monasterio de Piedra de Nuévalos en Zaragoza. A partir de entonces, este alimento consiguió gran popularidad, gracias por una parte a que la Iglesia consideró que no rompía el ayuno, y por otra a que se declaró bebida oficial de los reyes y de la Corte española. La Corona logró mantener este secreto durante aproximadamente un siglo, y fue durante los siglos XVII y XVIII cuando su consumo se extendió por Europa. Así, beber este líquido se convirtió en un signo de distinción y elegancia. Los Monasterios y las farmacias eran las dos vías principales de fabricación y distribución del chocolate. A principios del siglo

XIX se inició en España la fabricación del chocolate en forma de tabletas, y ya en el siglo XX se llevó a cabo la comercialización del cacao soluble y su comercialización en forma de cremas, chocolatinas, grageas y caramelos.

El cacao ocupa el tercer lugar después del azúcar y el café en el mercado mundial de materias primas. La producción de cacao se concentra al Oeste de África y la producción allí representa cerca del 70 % de la producción mundial. Los principales productores se encuentran en la Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún. Además de África, otros grandes productores de cacao son Indonesia, Brasil, Ecuador, República Dominicana y Malasia.

En España, el cacao es un alimento de bajo consumo, pese a su riqueza en polifenoles y a que es una buena fuente de minerales y vitaminas. El consumo en nuestro país es de solo 3,5 kg por español y año, frente a los 10 kilos que ingiere cada suizo. Galicia y las comunidades de la cornisa Cantábrica son las zonas donde se ingiere más cantidad de chocolate. En España la producción y la ingesta de chocolate y derivados del cacao está actualmente estabilizándose, pero hasta hace poco este alimento tenía muy mala prensa. El chocolate como alimento es nutricionalmente completo, ya que contiene aproximadamente un 30% de materia grasa, un 6% de proteínas, un 61% de carbohidratos, y un 3% de humedad y de minerales (fósforo, calcio, hierro), además de aportar vitamina A, vitaminas del complejo B y flavonoides. La materia grasa del chocolate es la manteca de cacao, que contiene un 35% de ácido oleico, un 35% de ácido esteárico y un 25% de ácido palmítico. El 5% restante está formado por diversos ácidos grasos de cadena corta (Vinson et al., 1999). La estructura de los triglicéridos que componen la materia grasa del chocolate se caracteriza por tener el punto de fusión en el rango de 27°C a 32°C, y ésta es la característica organoléptica más interesante del chocolate, ya que este producto se funde con relativa rapidez en el paladar humano, generando una textura y un sabor muy agradable.

Aunque el chocolate se ha consumido durante cientos de años, muy recientemente se han empezado a conocer y a entender los beneficios de este

sabroso alimento, que derivan principalmente de su alto contenido en flavonoides. Existen muchas fuentes de flavonoides, y la recomendación es combinar adecuadamente el consumo de frutas y verduras, pero tampoco privarnos del placer de comer un buen chocolate. Una porción frecuente de chocolate, puede ser, sin lugar a dudas, un trocito más de salud.

#### **1.4.2 Estructura, composición y procesamiento del grano de cacao**

El árbol del cacao es el cacaotero, cuyo nombre científico se debe a Carl von Linne quién lo denominó *Theobroma cacao*, que significa «cacao, alimento de los dioses» (Dillinger et al., 2000). Es una planta tropical que crece en una franja geográfica muy determinada, con centro en el Ecuador y que se extiende por el norte y el sur unos 20 grados sin sobrepasar nunca el Trópico de Cáncer ni el de Capricornio. Pertenece a la familia de las Esterculiáceas. Su fruto es una baya con forma ovoidea también denominada mazorca, de unos 25 cm de largo por 15 cm de ancho (Figura 14). La superficie del fruto puede variar desde muy rugosa hasta completamente lisa. El color varía entre blanco, verde y rojo en los frutos verdes hasta el amarillo, naranja y morado de los maduros. Cuando el fruto es joven tiene 5 compartimentos rellenos de granos, pero al madurar las paredes desaparecen, quedando una cavidad única llena de granos o semillas que pueden variar según las especies entre las 25-70 unidades. La semilla se encuentra recubierta por una capa de mucílago de color blanco que puede tener entre 15 y 30 mm de longitud y entre 5 y 15 mm de diámetro. Constituye la materia prima fundamental para la elaboración del chocolate. La cáscara que envuelve el grano de cacao se conoce usualmente como la cascarilla del cacao. La cascarilla del cacao también se ha usado como material crudo para extraer teobromina, un alcaloide de la familia de la cafeína característico del cacao (Bonvehi & Coll, 1999).



**Figura 14.** Sección transversal del fruto del cacao. La mazorca posee una corteza rugosa de casi 4 cm de espesor. Está rellena de una pulpa rosada viscosa, dulce y comestible, que encierra de 25 a 70 granos o semillas de cacao.

La composición física y química de los granos de cacao varía a lo largo del periodo de crecimiento del grano. Cada semilla consta de dos cotiledones y del pequeño embrión de la planta. Los cotiledones almacenan el alimento para el desarrollo de la planta. Este almacén consta de grasa, conocida como manteca de cacao, que conforma casi la mitad del peso seco de la semilla. La cantidad de grasa y sus propiedades, tales como su punto de fusión y dureza, dependen de la variedad del cacao y de las condiciones ambientales. Existen tres variedades principales de cacao:

-*El criollo o nativo*: Originario de Centroamérica. Es el cacao genuino reconocido como de gran calidad, de escaso contenido en taninos y reservado para la fabricación de los chocolates más exquisitos. El árbol es frágil y de escaso rendimiento. El grano es de cáscara fina, suave y poco aromática. Representa, como mucho, el 10% de la producción mundial.

-*El forastero*: Originario de la alta Amazonia. Se trata de un cacao normal, con el contenido en taninos más elevado. Es el más cultivado y proviene normalmente de África. El grano tiene una cáscara gruesa, es resistente y poco aromático. Los mejores productores usan granos de la variedad *forastero* en sus mezclas, para dar cuerpo y amplitud al chocolate,

pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates proviene de la variedad criolla.

-Los *híbridos*, entre los que destaca *el trinitario*: Originario de Trinidad, es un cruce entre el criollo y el forastero, aunque su calidad es más próxima al del segundo. Este cacao, heredó la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo, y se usa también normalmente mezclado con otras variedades.

El cacao ordinario procedente de la variedad “forastero” representa el 95 % de la producción mundial. El cacao fino o aromático, que proviene de las variedades “criollo” o “trinitario”, representa el 5 % de la producción mundial.

En el procedimiento tradicional para procesar el cacao, las semillas se fermentan. Durante el proceso fermentativo se producen diversos cambios químicos en el grano de cacao. Este proceso se lleva a cabo por bacterias y levaduras presentes en el ambiente, que se multiplican en la pulpa que rodea los granos de cacao, debido a su alta concentración en azúcares. La pulpa, tras el proceso de fermentación, se descompone en ácido y alcohol. Su color cambia del púrpura al marrón chocolate y el olor a cacao empieza ya a manifestarse en este proceso. El objetivo de esta fermentación es doble: en primer lugar la pulpa se convierte en ácido acético que se evapora y aumenta el tamaño de la semilla. En segundo lugar, se reduce el amargor y la astringencia, y se desarrollan los precursores del aroma. La calidad de los granos de cacao dependerá de este proceso de fermentación. A continuación, las semillas se secan y se prensan, y a partir de este momento se pueden utilizar como materia prima para la elaboración de la masa o licor de cacao, del cacao en polvo y de la manteca.

### *Licor de cacao*

La primera etapa del proceso incluye el tostado de los granos de cacao y la eliminación de la cáscara. El licor de cacao se produce mediante la molienda

de los granos de cacao sin cáscara. La calidad del licor de cacao dependerá de los granos utilizados. A menudo, los fabricantes mezclan diversos tipos de granos para lograr la calidad, el aroma y el sabor requerido. Este producto puede sufrir posteriormente un proceso de alcalinización para alterar su color y sabor, y también su composición química.

#### *Manteca de cacao*

La grasa o manteca de cacao puede extraerse del grano de cacao por diversos procedimientos. La manteca pura se extrae a partir de la masa de cacao utilizando una prensa horizontal. La manteca pura de cacao obtenida por presión horizontal no necesita un tratamiento posterior pero a menudo tiene que desodorizarse. Asimismo, para extraer la manteca de la pasta residual proveniente del prensado, se puede utilizar un proceso adicional de extracción por solventes. En este caso, la manteca así extraída deberá refinarse.

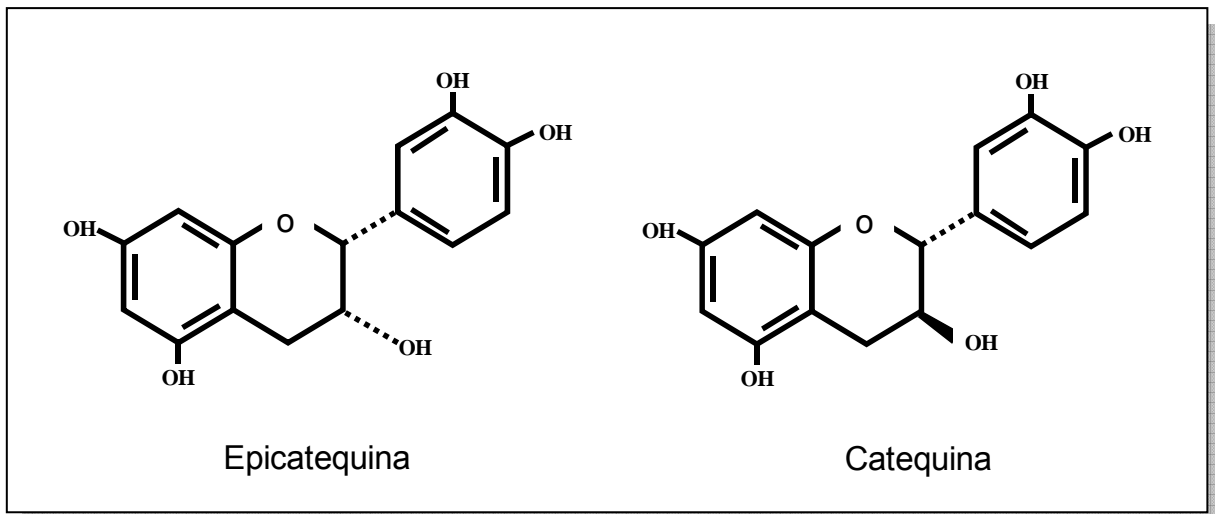
#### *Polvo de cacao*

El polvo de cacao se forma a partir de la masa de cacao. Se utilizan prensas especiales para remover parte del contenido graso y obtener finalmente un material sólido denominado pasta de cacao prensada. Este producto posteriormente se tritura para dar lugar al polvo de cacao. El proceso puede alterarse para producir polvos de cacao de diversas composiciones y con diferentes niveles de grasa. La composición química de este producto variará según el tostado, la alcalinización y el tipo de prensado realizado.

La mezcla de estos 3 componentes (licor, manteca y polvo de cacao) origina la pasta de cacao, que es la base para la fabricación de las tabletas de chocolate y de los diferentes tipos de chocolate que existen en la actualidad. Fue un fabricante suizo de leche evaporada, Henry Nestlé quien tuvo la original idea de mezclar la pasta de cacao con leche evaporada y azúcar, iniciando así la fama del chocolate suizo. Esta idea fue secundada por otro suizo, Rudolf Lindt que comenzó la fabricación de tabletas de chocolate sobre una fórmula similar a la de Nestlé.

La variedad botánica y las distintas etapas del procesado del cacao (tales como la fermentación, el secado, el tostado de la semilla y el tratamiento de alcalinización) afectan, sin embargo, al contenido total de flavonoides y a la calidad de los productos derivados del cacao. Kim y Keeney demostraron que la concentración de (-)-epicatequina disminuía un 90% después de la fermentación y el secado del grano de cacao (Kim & Keeney, 1984). Se han observado también disminuciones significativas en el contenido total de flavonoides después de la fermentación y los procesos de tostado del grano de cacao (Kim & Keeney, 1984). Además, se ha demostrado que las altas temperaturas durante la fermentación reducen el contenido de polifenoles, y producen una disminución de 3 a 5 veces inferior en los niveles de procianidinas (Kealey et al., 1998). También se pierden gran cantidad de flavonoides, durante el proceso de alcalinización. Las pérdidas se estiman en un 36% para la (+)-catequina, el 67 % para la (-)-epicatequina, el 69 % para el dímero B<sub>2</sub>, el 67 % para el trímero C<sub>1</sub>, y el 31% para el tetrámero D (Gu et al., 2006; Andres-Lacueva et al., 2008). Por estos motivos, para mantener las propiedades saludables asociadas al consumo de cacao, es muy importante la preservación de los polifenoles durante la fabricación y procesamiento del cacao.

El cacao es, en realidad, uno de los alimentos que posee mayor contenido en polifenoles, principalmente flavanoles como la epicatequina y la catequina (Figura 15) (Lee et al., 2003; Manach et al., 2004).



**Figura 15.** Estructura molecular de la epicatequina y catequina, dos flavonoides mayoritarios del cacao.

En un estudio reciente se han caracterizado por electroforesis capilar quiral, los distintos epímeros de (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-catequina, en las semillas de cacao y en los derivados del cacao. Los componentes mayoritarios de la semilla del cacao sin tostar y sin fermentar eran (-)-epicatequina y (+)-catequina. Sin embargo, en semillas fermentadas y en productos derivados del cacao, se encontró adicionalmente un flavonoide atípico, la (-)-catequina. La (-)-catequina se generaría probablemente durante el procesamiento del cacao por epimerización de la (-)-epicatequina (Kofink et al., 2007). En la Figura 16 se muestran las estructuras de los distintos epímeros de epicatequina y catequina.

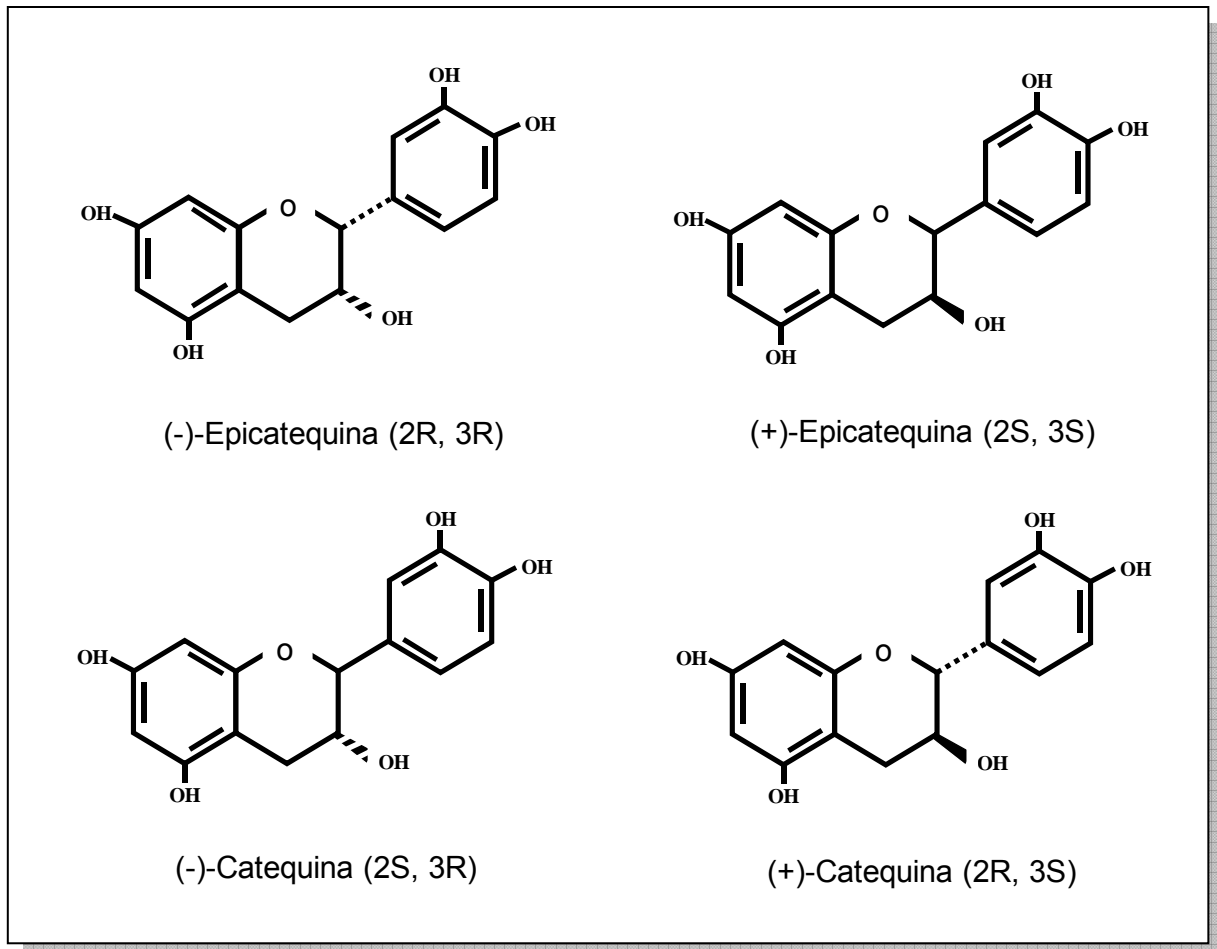


Figura 16. Estructuras de los enantiómeros de epicatequina y catequina.

### 1.4.3. Consumo de cacao e hipertensión arterial

A finales de los años 90, se observó en las poblaciones indígenas que habitaban en las Islas Kuna en Centroamérica, que existía una interesante asociación entre el consumo de cacao y la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión arterial. Curiosamente, cuando los habitantes de estas islas emigraron al continente, desarrollaron hipertensión, y se observó que la aparición de esta patología estaba relacionada con la menor ingesta de cacao en su dieta (Hollenberg et al., 1997). Posteriormente, otros estudios han confirmado la relación inversa entre el consumo de cacao y la prevalencia de hipertensión arterial. Un importante estudio epidemiológico

relacionó en 2006, el alto consumo de chocolate con niveles bajos de presión arterial, menor riesgo de enfermedad cardiovascular y menor riesgo de muerte en general (Buijsse et al., 2006). También hay estudios que han demostrado que la función endotelial mejora en las personas que consumen cacao (Hung et al., 2004; Heiss et al., 2005). Existen también algunos trabajos que demuestran que los polifenoles del cacao tienen efecto vasodilatador y antihipertensivo (Ding et al. 2006; Schroeter et al., 2003).

Como ya hemos comentado en el apartado 1.3.3 de esta Introducción, los flavanoles y las procianidinas del cacao poseen acción antioxidante, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lotito et al., 2000; Osakabe et al., 2002; Ottaviani et al., 2002; Orozco et al., 2003; Grassi et al. 2005; Hermann et al., 2006). Algunos estudios en humanos han demostrado, que tras el consumo de cacao se produce un aumento de la capacidad antioxidante total del plasma (Rein et al., 2000; Wang et al., 2000; Wan et al., 2001; Serafini et al., 2003), una reducción de los niveles plasmáticos de productos oxidados (Keen et al., 2005) y una reducción de la oxidación de las LDL (Kondo et al., 1996; Osakabe & Yamahishi, 2009). Sin embargo, una limitación para considerar que la acción antioxidante de los flavanoles pueda justificar sus efectos, es que estos compuestos no alcanzan una concentración en sangre que avale su capacidad para neutralizar radicales libres o quelar metales (Holt et al., 2002). Por lo tanto, se presume que existen otros mecanismos de protección celular, basados en la regulación de señales celulares, a través de los cuales actuarían los flavanoles (Mackenzie et al., 2004).

La mayoría de las hipótesis convergen en afirmar que el efecto beneficioso de los flavonoides podría deberse a la mayor biodisponibilidad de NO que promueven. Estudios clínicos recientes señalan que productos ricos en flavanoles como el cacao, estimulan la vasodilatación y mejoran la función endotelial, y lo hacen debido en parte a que aumentan la biodisponibilidad de NO (Fitzpatrick et al., 1993; Schroeter et al., 2006). Sin embargo, es posible que otros mecanismos de acción estén también implicados en el efecto de los

flavanoles. Se sabe que estos compuestos también pueden inhibir un gran número de enzimas (Middleton et al., 2000). La inhibición farmacológica de la ECA está considerada actualmente como un enfoque farmacológico importante en el tratamiento de la hipertensión arterial, y tiene también efectos adicionales positivos sobre la disfunción renal y la insuficiencia cardíaca. La inhibición de la ECA reduce los valores de angiotensina II, con la consecuente inhibición de la enzima NADPH oxidasa, una de las principales productoras de anión superóxido (Cai & Harrison, 2000). Cuando esto ocurre, aumenta la biodisponibilidad del NO y disminuye el estrés oxidativo (Dzau et al., 2002; Cai & Harrison, 2000). Varios estudios han demostrado que los flavonoides inhiben la ECA *in vitro* (Wagner & Elbl, 1992; Parker et al., 1999; Cyrino et al., 2002; Actis-Goretta et al., 2006). Aviram et al., en 2001, demostraron asimismo que el consumo de productos ricos en flavanoles reducía un 30% la actividad de la ECA en el plasma humano, y disminuía también un 5% la presión arterial de los pacientes hipertensos (Aviram et al., 2001). Recientemente se ha demostrado que los flavanoles y procianidinas del cacao son también capaces de inhibir la ECA (Actis-Goretta et al., 2006; Ottaviani et al., 2006).

Aún se encuentran, sin embargo, en investigación los mecanismos bioquímicos que podrían explicar los efectos beneficiosos de los flavanoles del cacao, y de los flavanoles en general, sobre el sistema cardiovascular.

Como hemos visto a lo largo de esta Introducción, el consumo de cacao y sus derivados ricos en polifenoles, así como el consumo de otros alimentos que contienen estos compuestos, pueden inhibir la peroxidación lipídica, reducir la presión arterial, estimular la vasodilatación, atenuar el proceso inflamatorio, etc. Todo ello sería importante para prevenir la enfermedad cardiovascular y otras patologías asociadas, tales como la diabetes, la obesidad, el síndrome metabólico y el accidente cerebrovascular. Por lo tanto, estaría justificada, la preparación de alimentos enriquecidos con polifenoles y la inclusión de cantidades equilibradas de estos alimentos en la dieta.

## 1.5 Ingredientes bioactivos y alimentos funcionales

Desde los tiempos de Hipócrates, y a lo largo de la historia de la humanidad, se ha reconocido que los hábitos alimenticios influyen sobre el desarrollo de ciertas enfermedades. Recientemente se admite, por ejemplo, el beneficio de la llamada “dieta mediterránea” en la baja incidencia de enfermedades cardiovasculares.

El consumo de dietas más saludables responde actualmente a los resultados de diferentes estudios epidemiológicos y al creciente interés de la población, que considera a los alimentos desde una nueva perspectiva. Los alimentos suministran nutrientes en mayor o menor medida, pero algunos, aportan además componentes fisiológicamente activos que contribuyen a reducir el riesgo de desarrollar algunas enfermedades o que ayudan a atenuarlas, y que, por lo tanto, promueven un buen estado de salud. Entre las enfermedades que pueden prevenir los alimentos se encuentran las enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer como el de colon y el de próstata, las cataratas y la degeneración de mácula. Entre las que se pueden atenuar destacan la hipercolesterolemia, la diabetes tipo II y la osteoporosis (Weaver & Liebman, 2002; Pelletier et al., 2003; Montonen et al., 2004; Roudebush et al., 2004).

Los alimentos funcionales se definen según el “Internacional Life Science Institute” (ILSI), como aquellos alimentos, que además de su efecto nutricional, aportan efectos beneficiosos adicionales sobre una o más funciones fisiológicas, y que pueden, por lo tanto, mejorar la salud y el bienestar o reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Diplock *et al.*, 1998). Los alimentos funcionales están ampliamente distribuidos en la Naturaleza, y pueden tener origen animal o vegetal. Este tipo de alimentos deben consumirse en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de los alimentos. Dentro de una dieta sana y equilibrada, un alimento funcional puede encuadrarse en unos de los siguientes esquemas:

- Un alimento natural en el que la proporción de uno de sus componentes se ha incrementado.
- Un alimento al que se ha añadido un componente que proporciona beneficios para la salud.
- Un alimento del que se han eliminado componentes, de forma que el alimento tiene menos efectos adversos.
- Un alimento en el que uno o más de sus componentes se han modificado química, bioquímica o biotecnológicamente para mejorar sus efectos sobre la salud.
- Un alimento en el que se ha mejorado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes beneficiosos, consiguiéndose en realidad una absorción mayor.
- Cualquier combinación de los anteriores alimentos.

Los ciudadanos japoneses llevan décadas consumiendo estos productos que, en su entorno, gozan de gran popularidad. El concepto de alimento funcional nació, de hecho, en Japón. En los años 80, las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta de que el incremento en la esperanza de vida había provocado un aumento del gasto sanitario. Esto provocó que el gobierno nipón se planteara la necesidad de desarrollar productos alimenticios que mejorasen la salud de los ciudadanos. Japón fue, en realidad, el primer país con una legislación específica para la comercialización y etiquetado de los alimentos funcionales: "Foods for Specified Health Use" (FOSHU). Durante esta última década, también los consumidores europeos se han familiarizado con los alimentos funcionales, y estos alimentos han conseguido crecer de forma importante en el mercado europeo. Concretamente, en España los alimentos funcionales alcanzan una cuota de mercado del 26 % del gasto en alimentación, y un 40% de los consumidores optan por este tipo de productos. Sin embargo, hasta hace solo unos años las legislaciones europea y española no exigían a los fabricantes de estos productos que demostrasen científicamente los efectos beneficiosos que publicitaban. En realidad, en la

Comunidad Europea no había una legislación específica hasta hace poco. Dentro de los países miembros existían reglamentaciones sobre las posibles cualidades beneficiosas de los alimentos funcionales, pero no se permitían propiamente alegaciones funcionales para los alimentos. La falta de un marco legal propio para respetar las características de los alimentos funcionales, provocó que las empresas productoras de estos alimentos interpretaran "a su manera" la normativa general existente sobre los mismos, así como la información que se ofrecía al consumidor a través del etiquetado, la presentación y la publicidad de productos en los que se resaltaban los beneficios para la salud y la disminución del riesgo de sufrir determinadas enfermedades. Todo ello, a pesar de que el marco legal permitido no era permisivo con este tipo de alegaciones. Durante los últimos años, y debido al creciente interés por este tipo de alimentos, la Unión Europea, a través de una Acción Concertada denominada "Functional Food Science in Europe" (FUFOSE), ha conseguido regular las alegaciones funcionales; es decir, la información dirigida al consumidor sobre los efectos favorables que este tipo de alimentos ejercen sobre la salud y la prevención de enfermedades. Concretamente, el 1 de julio de 2007 entró en vigor el reglamento que establece en toda la Unión Europea las nuevas reglas para promocionar los alimentos funcionales, el llamado "Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre las Alegaciones Nutricionales y de Propiedades Saludables en los Alimentos". La nueva normativa sobre el etiquetado prohíbe atribuir a un alimento propiedades de prevención, tratamiento y curación de una enfermedad, pero diferencia entre "prevención" y "reducción de un factor de riesgo de enfermedad". Además, en ningún caso se admitirán alegaciones que no se hayan demostrado; así se evitará el posible fraude para el consumidor y los riesgos para su salud por la ingesta confiada de alimentos con un potencial efecto nutritivo o beneficioso del que carece. Deberá informarse también en la etiqueta de la importancia de una dieta equilibrada y un estilo de vida saludable, de la cantidad de alimento que se debe consumir y del patrón de consumo requerido para obtener el efecto beneficioso alegado. También deberá incluirse una declaración dirigida a las personas que deberían evitar el

consumo de ese alimento, y la advertencia de no superar las cantidades de producto que puedan presentar un riesgo para la salud (Reglamento (CE) N° 1924/2006).

El sector de la alimentación tendrá tres años para adaptarse a esta nueva normativa, que exige pruebas científicas que avalen la validez de los mensajes con los que se promocionan los productos. Así, aquellos alimentos con aportaciones innovadoras sobre determinadas enfermedades deberán aportar investigaciones que lo demuestren. Únicamente van a permitirse alegaciones de propiedades saludables que se hayan evaluado científicamente por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria.

Cuando se desarrollen alimentos funcionales será por lo tanto imprescindible comprobar científicamente las propiedades de estos alimentos, principalmente cuando se trate de nuevos alimentos. Hay que identificar los principios activos, confirmar su seguridad, establecer las dosis necesarias para que ejerzan su efecto, y dilucidar la base en que se fundamenta el mecanismo de acción. Para demostrar sus efectos bioquímicos y fisiológicos son de gran utilidad los marcadores analíticos, y deberán realizarse ensayos en humanos. La sociedad misma demanda que las propiedades saludables de los alimentos estén demostradas científicamente.

## 1.6. CoccoanOX

CoccoanOX (CCX) es un polvo de cacao obtenido mediante un procedimiento industrial. Este proceso preserva los compuestos fenólicos contenidos naturalmente en los granos de cacao. La empresa *Natraceutical Group* patentó este procedimiento en el año 2006 en España con número P200600462 y fecha de solicitud 27/02/06 (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2006). Dicha empresa con posterioridad, y dentro de los 12 meses que marca la ley para reivindicar prioridad, solicitó este registro como Patente Europea con número EP2036601 y con fecha 27/02/07 (Pasamar et al., 2007), reivindicando entonces también la prioridad de depósito de la Patente Española. Asimismo, la empresa extendió la solicitud como una Patente Internacional vía PCT con número WO2007/096449 y con la misma fecha de solicitud y prioridad que la Patente Europea (Pasamar et al., 2007).

### 1.6.1 Proceso de fabricación de CCX

La obtención de este polvo de cacao es posible gracias a un procedimiento industrial muy similar al convencional, pero en el cual se incluyen ligeras modificaciones. Los cambios más destacados en el proceso de elaboración de CCX, respecto al proceso convencional, se resumen a continuación.

- *Selección del tipo de grano de cacao en origen*

Para obtener CCX se partió de variedades tradicionales de cacao que habían demostrado un historial de uso alimentario seguro. Entre ellas se seleccionó la variedad botánica que mayor contenido inicial de polifenoles tenía. El grano de cacao seleccionado para la producción de CCX corresponde al clon híbrido CCN51 procedente de la región de Quevedo en Ecuador. Este triple híbrido se obtuvo después de cruzar el clon *amazónico* IMC67 con el clon *trinitario* IC595. Posteriormente este híbrido se cruzó con el genotipo *canelo*

*amazónico*, procedente de la región de Quevedo. Este grano tiene aproximadamente un 12% de polifenoles, mientras que un grano de cacao estándar tiene únicamente entre un 3% y un 5% de polifenoles.

- *Eliminación del proceso de fermentación*

La fermentación es una etapa del procesado del grano de cacao que provoca grandes pérdidas en el contenido total de polifenoles, y la pérdida es mayor a medida que se alarga esta etapa en el tiempo. Además, hay que tener en cuenta que la fermentación del grano de cacao es difícil de controlar. Ello justifica la gran variabilidad en las distintas producciones de cacao. Por ello, cuando se procesa CCX se evita que el grano fermente.

- *Adición de una etapa de escaldado*

El escaldado es un proceso habitual en la industria agroalimentaria para el tratamiento de productos vegetales. El objetivo de este proceso es inactivar distintas enzimas que puedan ocasionar alteraciones en los alimentos a largo plazo. Con la adición de esta etapa en el proceso de elaboración de CCX se consigue concretamente inactivar la enzima polifenol oxidasa, y con ello se evita la oxidación de los distintos polifenoles contenidos en CCX. La incorporación de este proceso no parece afectar el perfil nutricional, y preserva la mayor parte de los polifenoles que inicialmente estaban presentes en el grano de cacao.

En la siguiente tabla se muestra el perfil nutricional estándar del CCX.

**Tabla 3.** Perfil nutricional estándar de CcoanOX.

<b>Perfil nutricional (en 100 g de producto)</b>	
Energía (kcal)	283
Proteínas (g)	23,4
Carbohidratos (g)	27,8
- Almidón	- 13,9
- Azúcares simples	- 13,9
Fibra dietética total (g)	25,2
- Fibra dietética insoluble	- 22,7
- Fibra dietética soluble	- 2,5
Grasas (g)	8,6
Cenizas (g)	5,5
Teobromina (g)	1,78
Cafeína (g)	0,25
Potasio (mg)	168,26
Sodio (mg)	15,46
Calcio (mg)	227,47
Magnesio (mg)	542,14
Fósforo (mg)	778,86
Hierro (mg)	39,83
Zinc (mg)	9,91
Cobre (mg)	3,57

### 1.6.2 Propiedades biológicas de CCX

La capacidad antioxidante de un compuesto puede medirse *in vitro* por el método "Oxygen Radical Absorbance Capacity" (ORAC). El ORAC indica el poder que tienen los alimentos o los suplementos dietéticos para neutralizar y destruir los radicales libres. Este índice fue 3,5 veces mayor en CCX que en un polvo de cacao estándar (Ríos et al., 2009). En la siguiente tabla se muestra la capacidad antioxidante medida por el método ORAC de diferentes alimentos.

**Tabla 4.** Capacidad antioxidante total (ORAC) de diferentes alimentos.

<b>ALIMENTOS</b>	<b>ORAC<sub>hydro</sub> (μmolTE/g)</b>
<b>Productos de cacao</b>	
<b>CocoanOX</b>	<b>2861</b>
Polvo de cacao	<b>826</b>
Chocolate negro	<b>131</b>
Chocolate con leche	<b>67</b>
<b>Frutas</b>	
Ciruelas secas	58
Uvas pasas	28
Pomelos rosas	5
<b>Vegetales</b>	
Col rizada	18
Espinacas	13
Berenjenas	4

Tomado de Adamson et al., 1999 y Gu et al., 2006.

Estudios previos realizados en humanos han demostrado que los polifenoles presentes en el CCX son biodisponibles y que, además, su absorción conlleva un aumento de la capacidad antioxidante del plasma. La ingesta de una bebida preparada con CCX provocó una acumulación de metabolitos derivados de las procianidinas en el plasma humano, y la cantidad de metabolitos detectada fue muy superior que la obtenida tras el consumo de un polvo de cacao estándar. Asimismo, el consumo de CCX aumentó la concentración de metabolitos en la orina. Los metabolitos sulfatados detectados en la orina fueron mayoritarios y además más abundantes que los derivados glucurónidos (Tomás-Barberán et al., 2007). En este estudio, se describió además, un incremento de la capacidad antioxidante del plasma dos horas después de la ingesta de CCX y también 2 horas después de la ingesta de cacao estándar, pero la capacidad antioxidante fue 8 veces mayor tras la ingesta de CCX que tras la ingesta del cacao estándar (Tomás-Barberán et al., 2007).

Recientemente, se ha demostrado también el papel protector de CCX frente al estrés térmico. Se ha comprobado que CCX aumenta la longevidad en el modelo *Caenorhabditis elegans*, un nemátodo comúnmente utilizado para estudios biológicos de genética del desarrollo (Ramón et al., 2008). También se ha demostrado que CCX presenta efecto antiinflamatorio en un modelo de colitis ulcerosa (Andújar et al., 2009).

## **1.7 La rata espontáneamente hipertensa como modelo experimental de hipertensión**

Los ensayos en animales de experimentación son muy útiles para investigar factores concretos que pueden determinar el desarrollo o el mantenimiento de la hipertensión. Se utilizan además, modelos animales experimentales de hipertensión arterial, como instrumento para ensayar posibles compuestos antihipertensivos.

Los modelos animales para investigación deben ser fáciles de desarrollar y deben ser relativamente baratos, y en principio se prefiere utilizar animales pequeños. La localización anatómica de las diferentes arterias en la rata hace que este animal sea el más idóneo para la investigación de compuestos antihipertensivos. Se pueden llevar a cabo medidas de presión arterial en la arteria caudal de la rata con relativa facilidad. Para ello, se utiliza un pequeño manguito inflable y un transductor de presión semejante al esfigmomanómetro que permite llevar a cabo la medida en humanos. La rata tiene además un tamaño muy adecuado que facilita su manejo, y su coste es relativamente bajo. Se han desarrollado, por eso, diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial en ratas. Los de origen genético son los más utilizados actualmente. Ello se debe a que el desarrollo de hipertensión en estos modelos de ratas hipertensas es muy parecido al desarrollo de la hipertensión esencial en humanos. Entre los modelos animales para el estudio de la hipertensión esencial destacan las ratas espontáneamente hipertensas (SHR). El modelo se desarrolló mediante la selección y el cruce de ratas de la cepa Wistar, de la Universidad de Kyoto, que presentaban una presión arterial elevada. A partir de la sexta generación endogámica se consiguió una nueva raza de ratas, que se conoce hoy día como ratas SHR (Okamoto & Aoki, 1963). La cepa de las ratas Wistar-Kyoto (WKY), de la que se partió para desarrollar este modelo, quedó definida en 1971 como el control normotenso de las ratas SHR. La diferencia que existe entre las ratas SHR y las ratas WKY es sustancial, comparable a la existente entre personas no relacionadas (St Lezin

et al., 1992). Sin embargo, es importante destacar que teniendo en cuenta el desarrollo de las ratas SHR, algunos investigadores consideran a las ratas WKY como animales prehipertensos (Wright & Rankin, 1982). La esperanza media de vida de las ratas SHR en condiciones normales de cuidado y mantenimiento es de 18 meses, pero las ratas WKY suelen vivir unos 24 meses.

El desarrollo de la hipertensión arterial es muy semejante en las ratas SHR y en la especie humana. En ambos casos la hipertensión arterial se instaura en edades tempranas y está condicionada genéticamente, existiendo por ello un importante factor de agregación familiar. También en ambos casos los niveles de presión arterial van aumentando paulatinamente a lo largo de la vida, como consecuencia del incremento progresivo de las resistencias vasculares periféricas. Además, la rata SHR presenta una progresión de las alteraciones hemodinámicas similar a la que se observa en los pacientes hipertensos. Así, esta raza presenta una fase de pre-hipertensión, seguida por una fase de desarrollo de esta anomalía, y un período final donde la hipertensión ya está establecida. La hipertensión arterial en estos animales se ve además agravada por la ingesta de una dieta rica en sodio, por el estrés, y por otros factores ambientales, al igual que en la especie humana. En la cepa SHR, al igual que en los humanos, existe diferencia de género en el desarrollo de la hipertensión, alcanzando valores de presión arterial mayores las ratas macho que las ratas hembra (Iams & Wexler, 1979). No obstante, existen algunas diferencias entre la hipertensión arterial humana y la hipertensión arterial de las ratas SHR. Así, por ejemplo, los pacientes hipertensos suelen tener un exceso de peso corporal y, sin embargo, las ratas SHR pesan menos que sus controles normotensos. Se ha descrito además que en las ratas SHR existe una alteración en la función tiroidea, pero los pacientes hipertensos no presentan necesariamente este tipo de alteración. Desde el punto de vista terapéutico, hay también que señalar que las ratas SHR no muestran una respuesta definida a los diuréticos y, por el contrario, el uso de estos fármacos es altamente efectivo para la reducción de la presión arterial en los pacientes

hipertensos. Otra diferencia importante es que la aparición de arterioesclerosis en personas hipertensas es muy frecuente, pero las ratas parecen mostrar cierta resistencia a su desarrollo (Trippodo & Frohlich, 1981).

En conjunto, podemos decir que son, sin embargo, muchas las similitudes funcionales y estructurales que presentan las ratas de la cepa SHR y los pacientes con hipertensión esencial, y por eso esta cepa es una de las más utilizadas para probar nuevas terapias antihipertensivas. Será también la que utilizaremos en esta Tesis Doctoral para evaluar los efectos de CoconOX, el cacao rico en polifenoles descrito en el apartado anterior.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **Hipótesis**

CocoanOX (CCX) es un cacao rico en polifenoles que presenta efecto antihipertensivo y los polifenoles que contiene son los responsables de sus efectos sobre la presión arterial.

## **Objetivos**

1. Caracterizar la composición de las muestras del cacao denominado CCX después de su producción industrial.

2. Estudiar el efecto que ocasiona la administración aguda y crónica de CCX sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas, y también los efectos que tiene la administración aguda de los principales polifenoles de CCX sobre la presión arterial de estos animales.

3. Dilucidar cuales son los principales mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo de CCX. Intentaremos comprobar fundamentalmente si las propiedades antioxidantes de CCX pueden justificar su efecto sobre la presión arterial, y si el efecto de este cacao es endotelio dependiente.



## **METODOLOGÍA Y RESULTADOS**



### 3.1 Relación de Publicaciones

A continuación se detallan las publicaciones y manuscritos que ha originado el presente trabajo y que se discuten de manera conjunta en el apartado “Discusión General” de esta Tesis Doctoral:

- I. Cienfuegos-Jovellanos E\*, **Quiñones M\***, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids in cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57, 6156-6162. **\*equally contributed to this study.**
- II. **Quiñones M**, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Aleixandre A. Long-term intake of CooanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 2010, 112, 1013-1019.
- III. **Quiñones M**, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of the main polyphenols contained in a cocoa powder in spontaneously hypertensive rats. *Enviado para su publicación al British Journal of Nutrition*.
- IV. **Quiñones M**, Sánchez D, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A. Contribution of different mechanisms to explain the antihypertensive effect of CooanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats. *Enviado para su publicación al Journal of Nutritional Biochemistry*.
- V. **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. *Enviado para su publicación al Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

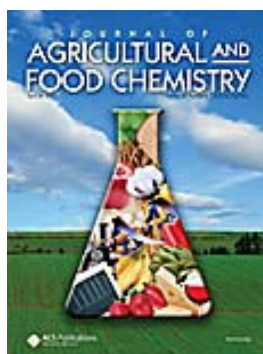


**Antihypertensive effect of polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids in cocoa beans**

Cienfuego-Jovellanos E\*, Quiñones M\*, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Alexandre A

\*contributed equally to this study

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57, 6156-6162



Indice de impacto SCI: 2,562

Posición dentro del área: 2/35, Agriculture Multidisciplinary



## Antihypertensive Effect of a Polyphenol-Rich Cocoa Powder Industrially Processed To Preserve the Original Flavonoids of the Cocoa Beans

ELENA CIENFUEGOS-JOVELLANOS,<sup>§,||</sup> MARÍA DEL MAR QUIÑONES,<sup>#,||</sup>  
BEGOÑA MUGUERZA,<sup>§</sup> LEILA MOULAY,<sup>§</sup> MARTA MIGUEL,<sup>#</sup> AND AMAYA ALEIXANDRE\*<sup>#,§</sup>

<sup>#</sup>Departamento Farmacología, Facultad Medicina, Universidad Complutense, Avenida Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain, and <sup>§</sup>Natraceutical Group, Autovía A-3, Salida 343, Camino de Torrent s/n, Quart de Poblet, 46930 Valencia, Spain. <sup>||</sup>E.C.-J. and M.Q. contributed equally to this study.

A natural flavonoid-enriched cocoa powder, commercially named CooanOX and developed via a patented industrial process, was characterized and tested for a possible antihypertensive effect. The bioavailability of this polyphenol-rich cocoa powder developed at pilot scale was previously demonstrated in humans. The present results showed that this product was very rich in total procyanidins (128.9 mg/g), especially monomers, dimers, and trimers (54.1 mg/g), and mainly (–)-epicatechin (19.36 mg/g). The effect of a single oral administration of CooanOX in spontaneously hypertensive rats (SHR) was evaluated at different doses (50, 100, 300, and 600 mg/kg). This product produced a clear antihypertensive effect in these animals, but these doses did not modify the arterial blood pressure in the normotensive Wistar–Kyoto rats. Paradoxically, the maximum effect in the systolic blood pressure (SBP) of SHR was caused by 300 mg/kg of CooanOX. This dose brought about a decrease in this variable very similar to that caused by 50 mg/kg Captopril. It was also surprising that the maximum effect in the diastolic blood pressure (DBP) was caused by 100 mg/kg CooanOX. The initial values of DBP and SBP were recovered in SHR, respectively, 24 and 48 h postadministration of the different doses of CooanOX or Captopril. These results suggest that CooanOX could be used as a functional ingredient with antihypertensive effect, although it would be also necessary to carry out bioavailability and clinical studies to demonstrate its long-term antihypertensive efficiency in humans.

**KEYWORDS:** CooanOX; polyphenols; procyanidins; flavanols; epicatechin; hypertension; spontaneously hypertensive rats

### INTRODUCTION

Hypertension is an important problem in our society given its high prevalence and its role as a critical cardiovascular risk factor. This pathology is a common and usually progressive disorder, which, if not effectively treated, has a high mortality rate. Epidemiological studies have shown an inverse association of flavonoid-rich diet consumption with the risk of hypertension and cardiovascular disease (1–5).

Cocoa and cocoa derivatives are known as significant sources of flavonoids, particularly of flavan-3-ols and procyanidins. Other examples of sources rich in this kind of flavanoids are wine and tea. However, cocoa has been shown to have the highest content of flavanols (6, 7). Several studies have published the quantitative determination of (+)-catechin, (–)-epicatechin, and procyanidins in cocoa products by normal- and reverse-phase liquid chromatography–mass spectrometry (8–11). Monomer units contribute most to the total procyanidin content in cocoa, (–)-epicatechin being the main component (12). Great interest is

focused on cocoa compounds for their possible beneficial health effects, and flavanols have made cocoa a candidate as a functional food. In fact, a recent epidemiological long-term study has reported a lowering effect of cocoa intake on cardiovascular mortality in elderly men (13). In addition, a prospective study in postmenopausal women demonstrated a borderline inverse correlation of chocolate intake and cardiovascular disease (14). Moreover, animal and human intervention studies have shown that cocoa polyphenols exhibit many health benefits (15, 16). In addition, the ingestion of cocoa beverage by Kuna Indians, a small population of Indians living in the San Blas Island, is related with a low prevalence of atherosclerotic diseases and no rise in blood pressure with age (17). These results are in agreement with data from human studies that showed the antihypertensive properties of cocoa polyphenols (18–23).

The botanical variety and manufacturing factors related to the processing of cocoa beans (such as postharvest handling, fermentation, drying, roasting, and alkalization treatment) affect, however, the flavonoid quantity and quality of a cocoa-based products. Kim and Keeney reported a 90% drop in the concentration of epicatechin after fermentation and drying (24).

\*Author to whom correspondence should be addressed (telephone 34-91-3941475; fax 34-91-3941463; e-mail amaya@med.ucm.es).



**Long-term intake of CocoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats**

**Quiñones M**, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Alexandre A.

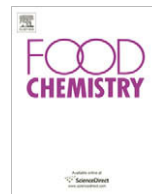
*Food Chemistry*, 2010, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.059



Indice de impacto SCI: 2,696

Posición dentro del área: 9/107, Food Science & Technology





## Long-term intake of CocoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats

M. Quiñones<sup>a,1</sup>, D. Sánchez<sup>a,1</sup>, B. Muguerza<sup>b</sup>, L. Moulay<sup>b</sup>, S. Laghi<sup>b</sup>, M. Miguel<sup>a,c,\*</sup>, A. Aleixandre<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, U. Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Nutraceutical Group, Autovía A-3, Salida 343, Camino de Torrent s/n, Quart de Poblet, 46930 Valencia, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), C/Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 May 2009

Received in revised form 30 January 2010

Accepted 16 March 2010

#### Keywords:

Antihypertensive activity

Cocoa

Polyphenols

Spontaneously hypertensive rats

### ABSTRACT

We have evaluated the effect of the long-term intake of a cocoa powder, with high concentration of polyphenols, named CocoanOX (CCX), on the development of hypertension of spontaneously hypertensive rats (SHR). Systolic blood pressure was measured weekly in the rats, from the 6th to 24th week of life, by the tail cuff method. The development of hypertension was attenuated in the groups treated with captopril or CCX. The antihypertensive effect was more accentuated in the group treated with captopril, and it was paradoxically more accentuated in the group treated with the lowest dose of CCX than in the other CCX groups. The arterial blood pressure increased in the treated SHR when the corresponding antihypertensive treatment was removed. Both, CCX and the standard cocoa, improved the aorta endothelial function in the SHR. In conclusion, CCX could be used as a functional food ingredient with antihypertensive activity.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several studies provide evidence suggesting that dietary flavonoids may play a protective role against cardiovascular disease (Hooper et al., 2008; Knekt et al., 2002), the primary chronic disease afflicting industrialised countries. Foods with high polyphenolic flavonoid contents include many fruits and vegetables, such as apples, onions, tea, red wine and cocoa. In recent years much interest has been focused on cocoa and cocoa derivatives. Most of the healthy effects of cocoa are attributed to the flavanols, which are one class of flavonoids, including (–)-epicatechin and (+)-catechin and oligomers of these molecules, also named procyanidins. The presence of these compounds has qualified cocoa and chocolate products as functional food, with especial cardiovascular functionality. In this context, the ingestion of a cocoa beverage by Kuna Indians, a small population of Indians living in the San Blas island chain off the Coast of Panama, was related to low prevalence of atherosclerotic diseases and no rise in blood pressure with age (Hollenberg et al., 1997). More recently, an epidemiological study has reported that long-term cocoa intake lowered cardiovascular mortality in elderly men (Buijsse, Feskens, Kok, & Kromhout,

2006). In addition, a prospective study in post-menopausal women demonstrated a borderline inverse correlation of chocolate intake and cardiovascular disease (Mink et al., 2007).

Cocoa polyphenols have also shown antihypertensive properties (Taubert, Roesen, & Schömig, 2007). They also stimulate nitric oxide production and improve endothelial function (Heiss et al., 2003).

The concentration of flavanols in cocoa products depends on the initial flavanol content of the cocoa beans and the processing steps. The loss by the manufacture process can reach 90% of the initial flavonoids (Keen, Holt, Oteiza, Fraga, & Schmitz, 2005). A new controlled process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans has been reported (Tomas-Barberan et al., 2007). This flavanol-enriched cocoa powder (CocoanOX, CCX) contained four times more procyanidins and eight times more (–)-epicatechin and procyanidin B2 than did conventional cocoa powder. In previous studies, this product has demonstrated a high antioxidant capacity and has also shown a blood pressure lowering effect after a single oral administration in spontaneously hypertensive rats (Cienfuegos-Jovellanos et al., 2009; Ramos et al., 2008). However, hypertension is a chronic pathology which requires chronic treatment, and the long-term administration of functional products without side effects is an attractive possibility, to be considered in treating this pathology.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the long-term intake of CCX on the development of hypertension in

\* Corresponding author at: Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), C/ Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 5622900; fax: +34 91 5644853.

E-mail address: [marta.miguel@ifi.csic.es](mailto:marta.miguel@ifi.csic.es) (M. Miguel).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this study.



**Antihypertensive effect of the main polyphenols  
contained in a cocoa powder in spontaneously  
hypertensive rats**

**Quiñones M**, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A

*Enviado para su publicación al British Journal of Nutrition*



Índice de impacto SCI: 2,764

Posición dentro del área: 15/59, Nutrition & Dietetics



**Antihypertensive effect of the main polyphenols contained in a cocoa powder in spontaneously hypertensive rats**

Quiñones M<sup>1</sup>, Muguerra B<sup>2</sup>, Miguel M<sup>3\*</sup>, Aleixandre A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, U. Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Natraceutical Group, Autovía A-3, Salida 343, Camino de Torrent s/n, Quart de Poblet, 46930 Valencia, Spain. <sup>3</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) C/ Juan de la Cierva, 3 28006, Madrid, Spain.

**Running title:** Antihypertensive effect of cocoa polyphenols

\*Dra. Marta Miguel  
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)  
C/ Juan de la Cierva, 3  
28006, Madrid, Spain  
Telephone: 34-91-5622900  
Fax: 34-91-5644853  
E-mail: marta.miguel@ifi.csic.es

## **Abstract**

In this study the antihypertensive effect of the principal monomers contained in a functional polyphenol-rich cocoa powder, named *CocoanOX*<sup>TM</sup> (CCX) was evaluated on spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats. Animals were used with 17-22-week-old. Different doses of the main monomers were administered to the SHR. The dose which produced the best blood pressure lowering effect for each polyphenol was administered to WKY rats. All monomers decreased SBP in SHR in a dose-dependent manner. The maximum decrease in SBP was caused by 6 mg/kg of (-)-epicatechin and was observed 6-8 hours post-administration. The administration of (+)-catechin, also result in a significant decrease of the SBP in SHR, and the maximum decrease in SBP was caused by 0.5 mg/kg and was observed 4 hours post-administration. The administration of (-)-catechin also caused a blood pressure lowering effect in SHR. The maximum decrease in SBP was caused by 0.5 mg/kg of (-)-catechin and was observed 6-8 hours post-administration, but its effect was less accentuated than the effect of (-)-epicatechin or (+)-catechin. The initial values of SBP after administration of different monomers were recovered 48 or 72 hours post-administration. None of the monomers administered modified the SBP in WKY rats. In conclusion, the main polyphenols included on it would be beneficial for controlling blood pressure.

**Key words:** antihypertensive effect, cocoa, polyphenols, spontaneously hypertensive rats.

## **Introduction**

Cardiovascular disease (CVD) is the primary chronic disease in industrialized societies and the number one cause of death in these populations<sup>(1)</sup>. The consumption of polyphenols has been associated with a reduced risk of CVD<sup>(2-4)</sup> and a large number of epidemiological studies indicating that increased consumption of foods and beverages rich in flavonoids, reduces the risk of CVD death<sup>(5-7)</sup>.

Cocoa is one of the foods that possess major content in flavanols<sup>(8,9)</sup>. At the end of the 90s, it was observed an association between the consumption of cocoa and the low incident of CVD in the indigenous populations of Kuna islands<sup>(10)</sup>. From this time, the healthy benefits of cocoa and cocoa derivatives on CVD have been extensively studied<sup>(11-13)</sup>. Cocoa flavanols consist of a complex mixture of the monomeric (-)-epicatechin and (+)-catechin and the oligomers of these monomeric base units known as procyanidins<sup>(14)</sup>. It is worth noting that the preservation of polyphenols during the cocoa manufacturing is important to exhibit the health effects associated to cocoa consumption. Recently it has been described that roasted cocoa beans and cocoa products additionally contained the atypical flavan-3-ol (-)-catechin. This is generally formed during the manufacturing process by an epimerization which converts (-)-epicatechin to its epimer (-)-catechin. High temperatures during the cocoa bean roasting process and particularly the alkalization of the cocoa powder are the main factors inducing the epimerization reaction<sup>(15)</sup>.

It is known that cocoa flavanols and their oligomers have the ability to inhibit LDL oxidation<sup>(16)</sup>, promote endothelium-dependent relaxation<sup>(17)</sup>, and modulate the production of inflammatory cytokines<sup>(18)</sup> on *in vitro* systems. However, there is little information about the effects of cocoa flavanols on *in vivo* models of CVD and particularly, on animal models of systemic hypertension. The *in vitro* effects observed with the monomers are often significantly different from those observed with the oligomers, suggesting that there may be considerable structure specificity for these compounds. In addition, although the potent *in vitro* effects of the flavanols and their oligomers have generated considerable interest in these compounds, it has been

suggested that their *in vivo* effects may be minimal because of gastric degradation <sup>(19)</sup> or because are hardly absorbed in the intestine <sup>(20)</sup>. Therefore, careful distinction between *in vitro* and *in vivo* effects of flavanols is mandatory.

In a previous study the antihypertensive properties of a polyphenol-rich cocoa powder, named CocoanOX<sup>TM</sup> (CCX), produced by an innovative industrial patented process <sup>(21)</sup>, were demonstrated after short- <sup>(22)</sup> and long-term treatment <sup>(23)</sup>. The principal polyphenols contained in cocoa are (-)-epicatechin and (+)-catechin <sup>(24,25)</sup> and the quantities of these polyphenols found by our research group in 100 mg CocoanOX<sup>TM</sup> (expressed on a wet basis as mean  $\pm$  SD, n=2) were 1.94 $\pm$ 0.03 mg and 0.52 $\pm$ 0.09 mg respectively <sup>(22)</sup>.

The aim of this work was to characterize the antihypertensive effect of the principal polyphenols contained in CCX, (-)-epicatechin and (+)-catechin, and also the antihypertensive effect of (-)-catechin on spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats.

## **Material and Methods**

### *Products*

Captopril, (-)-epicatechin, (+)-catechin and (-)-catechin were used for the experiments, and all these products were purchased from Sigma Chemical (Sigma Chemical, USA). Captopril was dissolved in distilled deionized water to be administered to the rats. (+)-catechin, (-)-catechin and (-)-epicatechin were prepared in 10% DMSO in distilled deionized water and sonicated 45 minutes before administration to the animals.

### *Experimental Procedure in Rats.*

In this study we have used thirty 17-22 week-old male SHR, weighing 314 $\pm$ 3 g, and ten 17-22 week-old male WKY rats, weighing 337 $\pm$ 6 g. All animals were obtained from Charles River Laboratories España S.A. The rats remained at a temperature of 23° C with 12 hour light/dark cycles, and consumed tap

water and a standard diet for rats (A04 Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum*, during the experiments.

Four different doses of (-)-epicatechin (1 mg/kg, 2 mg/kg, 6 mg/kg and 12 mg/kg), (+)-catechin (0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg and 3 mg/kg), and (-)-catechin (0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.5 mg/kg and 3 mg/kg), were administered to the SHR. The doses which produced the best blood pressure lowering effect for each polyphenol were administered to WKY rats: (-)-epicatechin (6 mg/kg), (+)-catechin (0.5 mg/kg), and (-)-catechin (0.5 mg/kg). These compounds (1 ml of the corresponding solution) were orally administered by gastric intubation, between 9 and 10 a.m to the rats. Captopril (50 mg/kg), a known antihypertensive drug, served as positive control, and 1 ml of 10% DMSO solution in distilled deionized water served as negative control. We measured the SBP of the rats by the tail cuff method <sup>(26)</sup> before administration and also 2, 4, 6, 8, 24, 48 and 72 hours post-administration. Before the measurement, the rats were kept at 30°C for 10 minutes to make the pulsations of the tail artery detectable. To establish the value of SBP, five measurements were taken, and the average of all of them was obtained. To minimize 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 before the actual trial time, and during this period the rats were accustomed to the procedure.

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

#### Statistical analysis

The results are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for a minimum of 8 rats. They were analyzed by a two-way analysis of variance (ANOVA), using the GraphPad Prism 4 software. In addition, in order to compare the different treatments and to assess the effect of time within each treatment, some data were also analyzed by a one-way ANOVA, and

differences between the groups were assessed by the Bonferroni test. Differences between the means were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

Before administration of the different products, the SHR showed SBP values of  $236 \pm 2.5$ ;  $n=30$ . The values of SBP obtained after oral administration of 1 ml of the 10% DMSO solution were very similar to those obtained before its administration. Captopril caused a clear decrease in SBP in the SHR. The maximum decreases in SBP caused by 50 mg/kg of this drug were observed 4 hours post-administration, and this variable returned to baseline 48 hours post-administration. The oral administration of (-)-epicatechin, also resulted in a significant decrease of the SBP in the SHR. The maximum decreases in SBP caused by 6 mg/kg of (-)-epicatechin was observed 6-8 hours post-administration ( $-34.04 \pm 4.8$  mm Hg and  $-34.30 \pm 5.6$  mm Hg, respectively), but these decreases were less pronounced than those caused by 50 mg/kg of captopril. The values of SBP obtained 72 hours post-administration of (-)-epicatechin, were similar to those obtained before the administration (Figure 1A). The administration of (+)-catechin, also caused a significant decrease in the SBP of the SHR. The maximum decrease in SBP ( $-29.9 \pm 0.8$  mm Hg) was caused by the dose of 0.5 mg/kg of (+)-catechin, and it was observed 4 hours post-administration. The values of SBP returned to baseline 48 hours post-administration of 0.5 mg/kg of (+)-catechin (Figure 2A). The administration of (-)-catechin, also caused a significant decrease in the SBP of the SHR. Nevertheless, the effect of this polyphenol on this variable was less accentuated than the effect of (-)-epicatechin or (+)-catechin. The maximum decrease in SBP was caused by 0.5 mg/kg of (-)-catechin and it was observed 6-8 hours post-administration. At these moments, the decreases were  $-23.6 \pm 5.9$  mm Hg and  $-24.5 \pm 5.7$  mm Hg, respectively. 72 hours post-administration of 0.5 mg/kg of (-)-catechin the values of SBP were always very similar to those obtained before the administration (Figure 3A).

None of the assayed polyphenol monomers modified the SBP in WKY rats. These variables were similar in the WKY rats treated with these products and in the WKY rats treated with water (Figures 1B, 2B and 3B).

## **Discussion**

It has been reported that the healthy properties attributed to cocoa seem to be related to the high amount of monomeric and dimeric compounds <sup>(27)</sup>. The high amount of (-)-epicatechin is thought to be important because an increment in plasma of this monomer was accompanied by a dose-dependent increment in plasma antioxidant capacity <sup>(24,28)</sup>, a dose-dependent decrease in plasma lipid oxidation <sup>(24)</sup>, a beneficial effect on vascular function <sup>(29)</sup> and a significant reduction of serum oxidative stress <sup>(30)</sup>.

In previous studies, a cocoa powder named CCX had revealed values of flavan-3-ols, especially (-)-epicatechin and catechin, higher than those reported for other cocoa powder products <sup>(22,31)</sup>. We could establish the antihypertensive effect of CCX in SHR <sup>(22)</sup>, and in this study, we have demonstrated that the above mentioned polyphenol monomers contained in CCX, decreased also arterial blood pressure in these animals. This rat strain is frequently used to carry out the initial studies on the antihypertensive effect of functional food ingredients, because it represents nowadays the best experimental model for essential hypertension in humans <sup>(32)</sup>. The development of hypertension in these animals is very similar to that in humans. In both cases hypertension appears at an early age, there is a family history of this pathology and it is worsened by a sodium-rich diet <sup>(33)</sup>.

In the present study, we have also evaluated the effect of the atypical flavan-3-ol (-)-catechin in SHR, because as we have previously mentioned in the section Introduction, a change in the chiral nature of (-)-epicatechin has been described as a consequence of the cocoa manufacturing, and this atypical flavan-3-ol is also present in CCX <sup>(34)</sup>.

All the polyphenol monomers assayed showed a blood pressure lowering effect in the SHR, but the maximal decreases were obtained when 50

mg/kg of Captopril, a drug known as a very effective antihypertensive treatment in clinical practice, was administered in these rats. Among the three polyphenols, (-)-epicatechin caused the maximal decrease in arterial blood pressure, but (+)-catechin and (-)-catechin were more potent to decrease arterial blood pressure than (-)-epicatechin.

It is important to point out that the antihypertensive effect of CCX in SHR<sup>(22)</sup> was more pronounced than the antihypertensive effect obtained when the monomers have been used. Therefore, although the antihypertensive effect of CCX can be most likely attributable to its high content of monomers, the potential contribution of other polyphenolic compounds or the synergy between them cannot be ruled out.

It is also important to highlight that in this study we failed to demonstrate a dose-dependent response with the used polyphenols, and in all the cases the maximum effect was attained with a dose different from the highest dose of the used polyphenol. In fact, the highest doses of the different polyphenols (12 mg/kg of (-)-epicatechin, 1 mg/kg of (+)-catechin and 3 mg/kg of (-)-catechin) demonstrated a lower antihypertensive effect in the SHR than other doses of these monomers, and the maximum effect was obtained when 6 mg/kg of (-)-epicatechin, 0.5 mg/kg of (+)-catechin and 0.5 mg/kg of (-)-catechin were administered. A similar paradox was observed when we used CCX, because the maximum antihypertensive effect was neither obtained when we administered the highest dose of this cocoa powder<sup>(22)</sup>. These data could be explained because different studies have demonstrated that a high quantity of polyphenols could exhibit pro-oxidant properties instead of antioxidant properties<sup>(35,36)</sup>.

A high bioavailability of the compounds contained in CCX in humans was demonstrated<sup>(31)</sup>. The *in vivo* bioactivity of the polyphenol monomers depends on their process of absorption and metabolism after ingestion, and the reducing properties of resulting metabolites. The highest plasma peak concentrations of flavanols in humans are obtained 2 to 3 hours after ingestion of these compounds<sup>(24,28)</sup> and they are still measurable after 8 hours<sup>(37)</sup>. In this study, the effect of (-)-epicatechin, (+)-catechin and (-)-catechin could also be appreciated

8 hours post administration when these polyphenol monomers were administered to SHR. However, it is important to note that monomers such as epicatechin are metabolised to O-methylated forms or conjugated as glucuronides and sulphates and the breakdown products of procyanidins have not been fully identified nor characterized for possible beneficial effects <sup>(38)</sup>.

In addition, in the last years an important role has been attributed to the chiral nature of polyphenols and the effects of chirality on bioavailability. The (+)-catechin predominates in cocoa beans and the (-)-catechin in chocolate <sup>(34)</sup>, and it has been postulated that (+)-catechin is almost 10 times more absorbed than (-)-catechin. These facts may explain why catechin from cocoa processed is not as well absorbed as from other food <sup>(25,39,40)</sup>. In any case, the effects of (+)-catechin and (-)- catechin in SHR were very similar. When these polyphenols were administered, SBP decreased in a very similar way in the animals. However, the initial values of SBP in SHR were recovered 48 hours post-administration of 0.5 mg/kg (+)-catechin and 72 hours post-administration of 0.5 mg/kg (-)- catechin.

In conclusion, we have demonstrated the antihypertensive properties of the main CCX monomers in hypertensive rats, but It is important to point out that the administration of these polyphenols to normotensive WKY rats did not change the arterial blood pressure of these animals. This indicates that the effect of the evaluated cocoa monomers is specific to the hypertensive condition. Nevertheless, more studies are necessary to elucidate the final products responsible of the antihypertensive effect of CCX and the mechanisms involved.

## **Acknowledgements**

This study was supported by Natraceutical Group (36/2007 U.C.M. Project). We also thank Manuel Bas Caro, Technician in Pharmacology, for his excellent care of the rats. Miguel M. holds a Ramon and Cajal work contract.

## References

1. Vinson JA, Proch J, Bose P *et al.* (2006) Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J Agric Food Chem* **54**, 8071-8076.
2. Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R *et al.* (2009) Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* **61**, 67-75.
3. Heiss C, Schroeter H, Balzer J *et al.* (2006) Endothelial function, nitric oxide, and cocoa flavanols. *J Cardiovasc Pharmacol* **47**, 128-135.
4. Engler MB & Engler MM. (2006) The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutr Rev* **64**, 109-118.
5. Liu Z, Ma LP, Zhou B *et al.* (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.
6. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE *et al.* (2001) The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* **134**, 1106-1114.
7. Kris-Etherton PM & Keen CL. (2002) Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* **13**, 41-49.
8. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ *et al.* (2003) Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J Agric Food Chem* **51**, 7292-7295.
9. Manach C, Scalbert A, Morand C *et al.* (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
10. Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M *et al.* (1997) Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension* **29**, 171-176.
11. Steinberg FM, Bearden MM, Keen CL. (2003) Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. *J Am Diet Assoc* **103**, 215-223.

12. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P *et al.* (2003) Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* **290**, 1030-1031.

13. Ding EL, Hutfless SM, Ding X *et al.* (2006) Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* **3**, 2.

14. Lazarus SA, Adamson GE, Hammerstone JF *et al.* (1999) High-performance liquid Chromatography/Mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in foods and beverages. *J Agric Food Chem* **47**, 3693-3701.

15. Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R. (2007) (-)-Catechin in Cocoa and Chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. *Molecules* **12**, 1274-1288.

16. Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. (1996) Antioxidants in chocolate. *Lancet* **348**, 834.

17. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. (2000) Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr* **130**, 2105-2108.

18. Ramiro E, Franch A, Castellote C *et al.* (2005) Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J Agric Food Chem* **53**, 8506-8511.

19. Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS *et al.* (2000) Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 236-241.

20. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK *et al.* (2009) Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* **119**, 1433-1441.

21. Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MA, Fritz J *et al.* (2007) Method for obtaining polyphenol-rich cocoa powder with a low fat content and cocoa thus obtained. *Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 2007/096449A1*, Natraceutical Industrial, España.

22. Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones M, Muguera B *et al.* (2009) Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *J Agric Food Chem* **57**, 6156-6162.

23. Quiñones M, Sanchez D, Muguerza B *et al.* (2010). Long-term intake of CocioanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.059
24. Rein D, Lotito S, Holt RR *et al.* (2000) Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* **130**, 2109-2114.
25. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC. (2002) Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* **76**, 798-804.
26. Buñag RD. (1973) Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* **34**, 279-282.
27. Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL *et al.* (2008) Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr* **99**, 1-11.
28. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G *et al.* (2003) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* **424**, 1013.
29. Schroeter H, Heiss C, Balzer J *et al.* (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**, 1024-1029.
30. Flammer AJ, Hermann F, Sudano I. (2007) Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* **116**, 2376-2382.
31. Tomas-Barberan FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marin A *et al.* (2007) A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem* **55**, 3926-3935.
32. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* **134**, 980S-988S.
33. Okamoto K & Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **27**, 282-293.
34. Gotti R, Furlanetto S, Pinzauti S *et al.* (2006) Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* **1112**, 345-352.

35. Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* **1**, 569-590.
36. Lahouel M, Amedah S, Zellagui A *et al.* (2006) The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Therapie* **61**, 347-355.
37. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M *et al.* (1999) Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* **53**, 22-26.
38. Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B *et al.* (2001) Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 588-593.
39. Donovan JL, Luthria DL, Stremple P *et al.* (1999) Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs. A comparison of sensitive methods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **726**, 277-283.
40. Donovan JL, Crespy V, Oliveira M *et al.* (2006) (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radic Res* **40**, 1029-1034.

## Figure legends

**Figure 1.** A) Decreases in systolic blood pressure (SBP) caused in spontaneously hypertensive rats by negative control (○), Captopril (50 mg/kg) (□) or different doses of (-)-epicatechin: 1 mg/kg (◆), 2 mg/kg (▲), 6 mg/kg (●) and 12 mg/kg (■). B) Decreases in SBP caused in Wistar-Kyoto rats by negative control (○) or 6 mg/kg (-)-epicatechin (●). Data are expressed as mean ± SEM. The experimental groups always have a minimum of 8 animals. Different letters represent statistical differences ( $p < 0.05$ ). P estimated by two-way ANOVA.

**Figure 2.** A) Decreases in systolic blood pressure (SBP) caused in spontaneously hypertensive rats by negative control (○), Captopril (50 mg/kg) (□) or different doses of (+)-catechin: 0.25 mg/kg (◆), 0.5 mg/kg (▲), 1.5 mg/kg (●) and 3 mg/kg (■). B) Decreases in SBP caused in Wistar-Kyoto rats by negative control (○) or 0.5 mg/kg (+)-catechin (▲). Data are expressed as mean ± SEM. The experimental groups always have a minimum of 8 animals. Different letters represent statistical differences ( $p < 0.05$ ). P estimated by two-way ANOVA.

**Figure 3.** A) Decreases in systolic blood pressure (SBP) caused in spontaneously hypertensive rats by negative control (○), Captopril (50 mg/kg) (□) or different doses of (-)-catechin: 0.25 mg/kg (◆), 0.5 mg/kg (▲), 1.5 mg/kg (●) and 3 mg/kg (■). B) Decreases in SBP caused in Wistar-Kyoto rats by negative control (○) or 0.5 mg/kg (-)-catechin (▲). Data are expressed as mean ± SEM. The experimental groups always have a minimum of 8 animals. Different letters represent statistical differences ( $p < 0.05$ ). P estimated by two-way ANOVA.

Figure 1

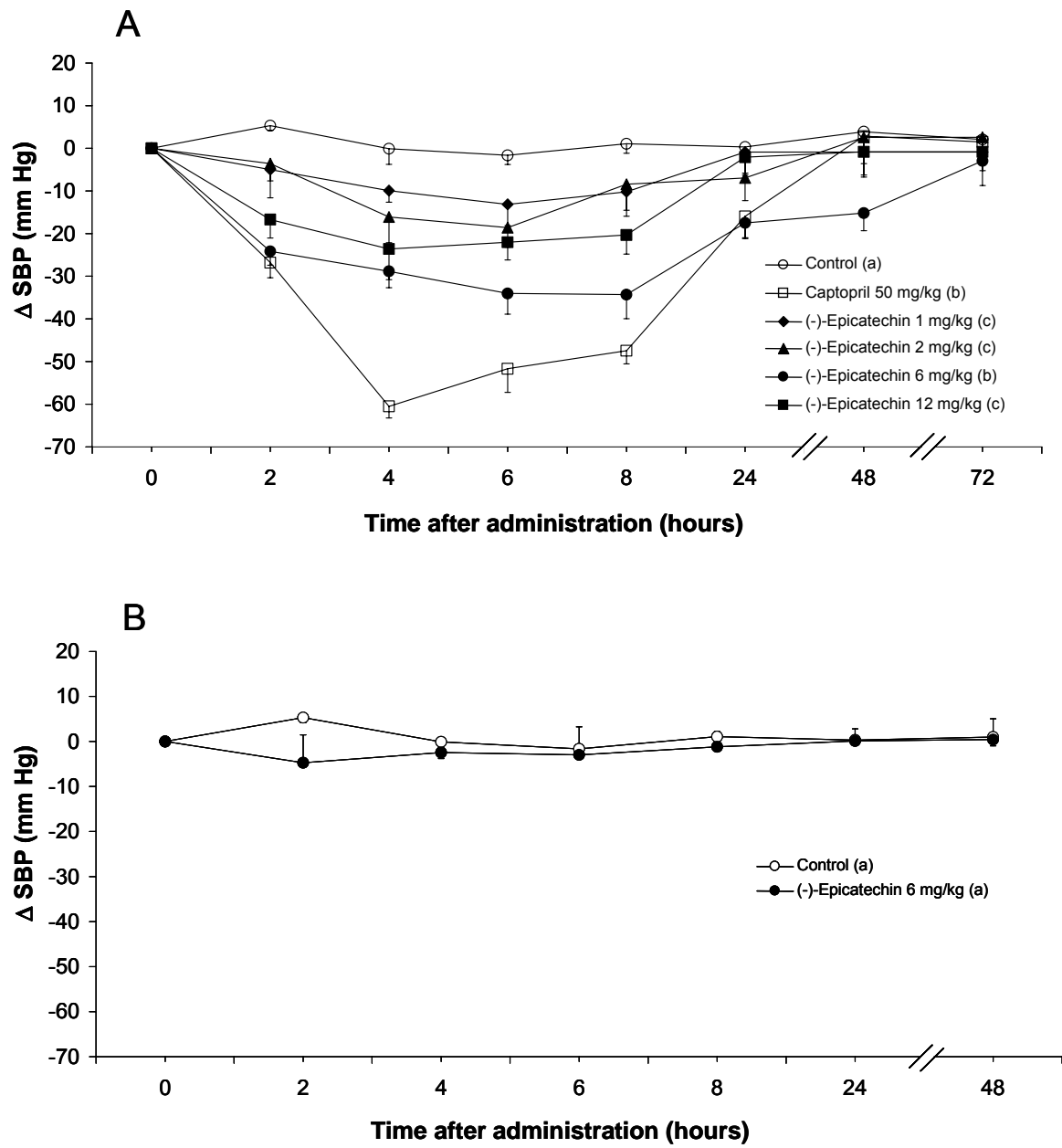


Figure 2

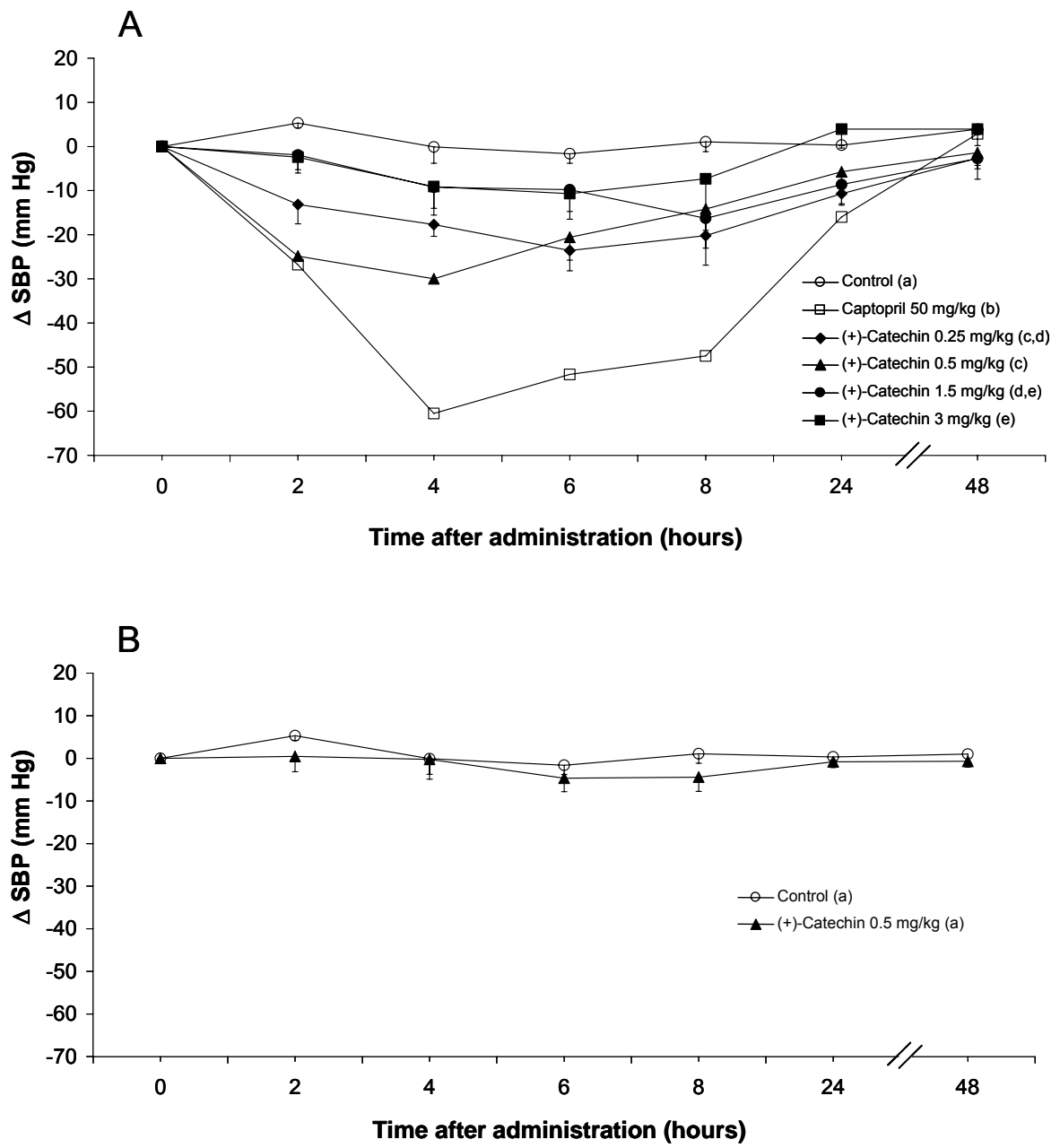
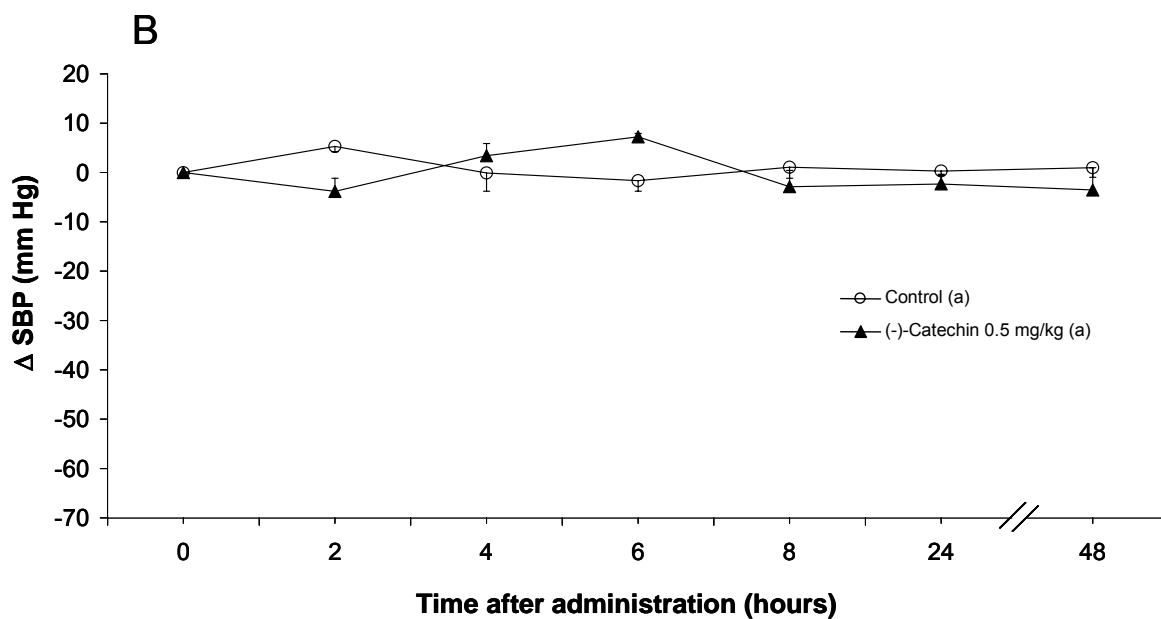
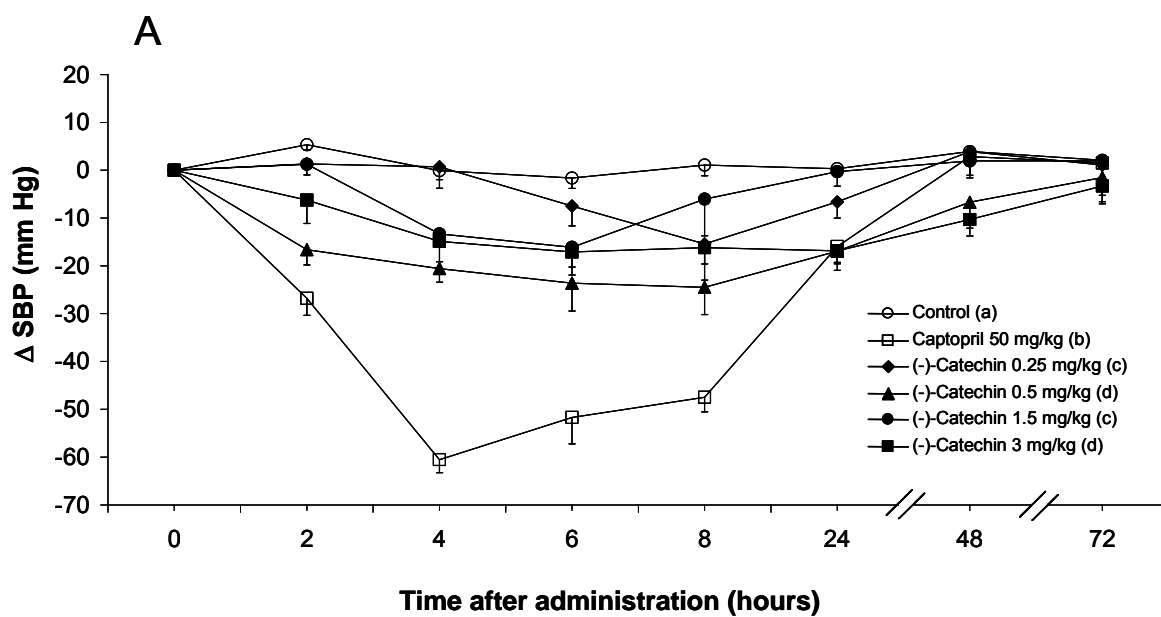


Figure 3



**Contribution of different mechanisms to explain the antihypertensive effect of CocoanOX, a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats**

**Quiñones M**, Sánchez D, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre A

*Enviado para su publicación al Journal of Nutritional Biochemistry*



Índice de impacto: 4,352

Posición dentro del área: 4/59, Nutrition & Dietetics



**Contribution of different mechanisms to explain the antihypertensive effect of CooanOX. a polyphenol-rich cocoa powder, in spontaneously hypertensive rats**

Quiñones M<sup>1</sup>, Sánchez D, Muguerza B<sup>3</sup>, Miguel M<sup>2\*</sup>, Aleixandre A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, U. Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC). C/ Juan de la Cierva, 3 28006, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Natraceutical Group, Autovía A-3, Salida 343, Camino de Torrent s/n, Quart de Poblet, 46930 Valencia, Spain.

**Running title:** Mechanisms of action of a polyphenol-rich cocoa powder

**\*Author for correspondence:**

Dr. Marta Miguel

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

C/ Juan de la Cierva, 3

28006 Madrid, Spain

Tel: + 34 91 5622900

Fax + 34 91 5644853

e-mail: [marta.miguel@ifi.csic.es](mailto:marta.miguel@ifi.csic.es)

## **Abstract**

We investigate the mechanism (s) involved in the antihypertensive effect of CoccoanOX (CCX), a cocoa powder prepared by an industrial procedure to prevent polyphenol degradation. Male 3-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into four groups of ten animals that were respectively long-term administered tap water (control), 100 mg/kg/day CCX, 200 mg/kg/day CCX or 400 mg/kg/day CCX. Five 20-week-old SHR in each group were sacrificed and the different treatments were then removed in the remaining rats. All the living rats drank tap water until the end of the experimental period and were then sacrificed. The following measurements were performed in all the sacrificed SHR: plasma malonildialdehyde (MDA), reduced-glutathione in the liver, plasma and aorta angiotensin converting enzyme (ACE) activity and plasma angiotensin II. We also evaluated the relaxations caused by CCX in four different aorta preparations from SHR: intact, endothelium denuded,  $10^{-4}$  M N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-treated and  $10^{-5}$  M indomethacin-treated. Plasma MDA decreased in the CCX treated SHR and reduced-glutathione increased in the liver of these animals. The effects mentioned before were not observed in the SHR after the withdrawal of CCX. CCX treatment did not modify aorta ACE activity, but the activity of this enzyme and the levels of angiotensin II increased in the plasma of the SHR treated with the highest dose of CCX. ACE activity returned to basal values after the withdrawal of CCX. However, angiotensin II levels were slightly higher after withdrawal of CCX. CCX did not relax the endothelium-denuded aorta ring preparations from SHR. L-NAME, but not indomethacin, impaired the relaxation caused by CCX in the

SHR aorta preparations. The antihypertensive effect of CCX in SHR is mainly mediated by an improvement of endothelial release of nitric oxide and by a reduction of oxidative stress. Other mechanisms, as the inhibition of ACE, could also be implicated in the antihypertensive effect of CCX.

**Key words:** Angiotensin converting enzyme, Cocoa, Nitric oxide, Oxidative stress, Polyphenols, Spontaneously hypertensive rats.

## **Introduction**

Several studies have shown that consumption of foods rich in flavonoid compounds is associated with lower incidence of cardiovascular disease (1-3). Foods with high polyphenolic flavonoid content include many fruits and vegetables such as apples, onions, tea, red wine and cocoa. Cocoa and cocoa derivatives have been shown to have the highest content of flavanols, particularly flavan-3-ols and procyanidins [4,5]. A very important epidemiological study, related the high consumption of chocolate with lower blood pressure and lower risk of cardiovascular disease [6]. Other human studies have also shown an improvement in endothelial function after cocoa [7,8], wine [9] and tea [10] consumption. However, the biochemical mechanisms that explain the benefits of flavonoids on the cardiovascular system have not yet been elucidated.

Different mechanisms may justify the antihypertensive properties of polyphenols. The vasodilatation occasioned by these compounds has been related to the production of nitric oxide [11], the inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) [12,13] and the reduction of oxidative stress [14-16]. Only a better understanding of the mechanism and the factors determining the antihypertensive activity of polyphenols will allow a rational development of rich polyphenol functional foods for blood pressure control.

Cocoa beans are rich in polyphenols. In particular, they are rich in flavanols, but the concentration of these compounds in cocoa products not only depends on the initial flavanol content of the cocoa beans. The processing steps are also very important to condition the final content of flavanols in cocoa derivatives. CocoanOX (CCX) is a cocoa powder prepared by an industrial

procedure to prevent polyphenol degradation [17]. CCX has therefore a high content in polyphenols (162 mg/g). In previous studies, we have demonstrated the short-term [18] and long-term [19] antihypertensive effect of CCX in spontaneously hypertensive rats (SHR). The aim of this study was to investigate the main mechanisms of action involved in the antihypertensive effect of CCX.

### **Material and Methods**

In this study we carried out a batch of experiments with different tissues (plasma, aorta and liver) from CCX treated SHR, and also another batch of experiments with different aorta ring preparations obtained from untreated SHR.

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

#### *General protocol for the experiments with tissues from CCX treated SHR*

After being weaned at 3 weeks, male SHR (Charles River Laboratories España S.A.) were housed in groups of five rats at a temperature of 23° C with 12 h light/dark cycles. They were in turn randomly divided with *ad libitum* intake into five groups of 10 animals, and during the experimental period (until the rats were 24-weeks-old), the SHR of these groups were fed on a solid standard diet (A04 Panlab, Barcelona, Spain). Until the rats were 20-week-old (treatment period), the drinking fluids in these groups were tap water (control), standard cocoa 400 mg/kg/day, CCX 100 mg/kg/day, CCX 200 mg/kg/day or CCX 400

mg/kg/day. Body weight, solid and liquid intake and systolic blood pressure in these rats are described in detail in Quiñones et al. [19]. After over-night fasting, five 20-week-old rats of each group were sacrificed by decapitation. Blood samples were obtained from the sacrificed rats to carry out the analysis of plasma malondialdehyde (MDA), plasma ACE activity and plasma angiotensin II. Aorta samples were also obtained to determine ACE activity in this tissue, and liver samples were also obtained to assess reduced-glutathione in this tissue. We describe below the procedures to evaluate all these parameters. The drinking fluid was always tap water in all groups of animals from the 20<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup> week of life (follow-up period). At the end of the experimental period, the 24-week-old rats were sacrificed by decapitation after over-night fasting, and the same determinations and procedures described above were done in these animals.

#### *Plasma, aorta and liver preparations for biochemical determinations*

Blood samples from the sacrificed animals were collected into tubes containing lithium heparin as anticoagulant. These samples were centrifuged at 2500 g for 20 minutes at 4°C to obtain the plasma which was divided into aliquots and kept frozen at -80°C until analysis of MDA and ACE activity. Aorta and liver tissue were homogenized at 4 °C in a Potter with PBS (0.01 M PBS, 0.15 M NaCl, pH 7.4), the homogenates were centrifuged at 5000g for 15 min at 4 °C and the supernatant was recovered. The supernatants of the centrifuged samples were kept frozen at – 80 °C until used for evaluate ACE activity and reduced-glutathione, respectively. The protein content of the homogenates was

determined by the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), using bovine serum albumin as standard.

#### *Malondialdehyde determination*

Plasma malondialdehyde (MDA) levels were measured by a thiobarbituric acid assay based on that proposed by Rodríguez-Martínez et al. [20] and modified as previously described Manso et al. [21]. Plasma was mixed with 20% trichloroacetic acid in 0.6 M HCl (1:1, v/v), and the tubes were kept in ice for 20 min to precipitate plasma components and avoid possible interferences. 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 proportion of 1:5 (v/v); then, the mixture was boiled at 97°C for 30 min. Spectrophotometric measurements at 535 nm were made at 20°C. The plasma MDA values were expressed as nmol MDA.

#### *Reduced-glutathione determination*

Reduced-glutathione in the liver was measured by the monochlorobimane fluorimetric method [22]. For this, 90 µl of liver homogenized supernatant were mixed with 10 µl of glutathione S-transferase solution (1U/ml), obtained from horse liver (Sigma-Aldrich, USA), and monochlorobimane (Fluka Biochemical, Switzerland) (100 mM). This reaction is catalysed by glutathione S-transferase. The levels of glutathione were quantified by a fluorimeter (Multiscan Ascent Labsystems, Spain) and were expressed as µmol/g tissue protein.

*Determination of ACE activity in plasma and aorta*

ACE activity in plasma and aorta were measured by a fluorimetric method as explained in [23]. Briefly, triplicate plasma (3  $\mu$ l) and supernatant (10  $\mu$ l, 30–80  $\mu$ g protein) aliquots from homogenized aorta were incubated for 15 and 60 min, respectively at 37°C with 40  $\mu$ l of assay buffer containing the ACE substrate 5 mM Hip-His-Leu (Sigma). The reaction was stopped by addition of 190  $\mu$ l of 0.35 N HCl. The generated product, His-Leu, was measured fluorimetrically following 10 min incubation with 100  $\mu$ l of 2% o-phthalaldehyde in methanol. Fluorescence measurements were carried out at 37°C in a Fluostar Optima plate reader (BMG Labtech, GmbH, Offenburg, Germany) with 350-nm excitation and 520-nm emission filters. The fluorescent plate reader was controlled by the Fluostar Optima software. Black 96-well polystyrene microplates (Biogen Científica, Madrid, Spain) were used. A calibration curve with ACE from rabbit lung (Sigma, St. Louis, MO, USA) was included in each plate. ACE activity was expressed as mU ACE /ml in plasma samples, and as mU ACE/mg tissue protein in aorta samples.

*Determination of angiotensin II in plasma*

Angiotensin II (Ang II) was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit (Assay Pro, USA) according to the manufacturer's instructions. Angiotensin II levels were expressed as ng/ml plasma.

*Experiments in aorta ring preparations*

For these experiments we used 17-22 week old SHR. The animals were sacrificed by decapitation. The thorax was opened, and the aorta from the aortic arch to the diaphragm was rapidly excised and transferred to a beaker containing Krebs-Henseleit Solution with the following composition (mmol/L): NaCl, 118.2; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; and glucose, 10.0. 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 also containing Krebs-Henseleit Solution. The medium was maintained at 37°C, and continuously bubbled with a 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture, which gave a pH of 7.4. An optimal resting tension of 2 g was applied to all aortic segments. This tension was adjusted every 15 min during a 60-90 min equilibration period before adding drugs. 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 first contracted by 80 mmol/L KCl to assess their functionality and when the contraction had reached the steady state (about 15 min. after the administration), the preparations were washed until the basal tension was recovered. Then the rings were exposed to 10<sup>-6</sup> mol/L methoxamine, and dose-response curves to CCX (10<sup>-4</sup> mg/ml – 1 mg/ml) were performed in the methoxamine-precontracted rings. Relaxant responses to CCX were expressed as a percentage of the precontraction induced by methoxamine.

The previously described procedure was applied to intact and endothelium-disrupted tissue. It was also applied to another two groups of intact

preparations; one with the addition of N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ( $10^{-4}$  M), an *in vivo* and *in vitro* inhibitor of NO-synthase, and the other one with the addition of indomethacin ( $10^{-5}$  M), a drug that inhibits cyclooxygenase and prostacyclin synthesis, to the bath solution 30 minutes before methoxamine administration. The denuded endothelium preparations were prepared by gently rubbing the tissue before it was cut into rings, and the efficacy of the procedure used to remove the endothelial cells was judged by the loss of acetylcholine-induced relaxation in the aorta preparations precontracted with methoxamine, as these cells, according to the studies published by Furchgott in 1980 and in 1999 [24,25], are necessary for this response.

#### *Statistical analysis*

The results are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M. for at least 5 rats or 5 determinations, and were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), using the GraphPad Prism software. Differences between the groups were assessed by the Bonferroni test. Differences between the means were considered to be significant when  $P < 0.05$ .

#### **Results**

The concentration of MDA was significantly lower in the plasma of all the different groups of CCX treated rats than in the plasma of the non-treated rats. Nevertheless, the withdrawal of CCX caused an increase in plasma MDA

concentration, and at the end of the follow up period, the concentration of this metabolite was similar in all the rats that had been treated with CCX and in the non-treated rats (Figure 1).

Long-term intake of CCX increased the levels of reduced glutathione in the liver of the SHR. Reduced glutathione decreased after the follow-up period and returned to basal values in the liver from the animals that had received 100 mg/kg or 200 mg/kg of CCX. Nevertheless, the 24 week-old animals that had been treated with 400 mg/kg of CCX maintained high levels of reduced glutathione in the liver after the follow-up period (Figure 2).

Long-term intake of CCX did not modify ACE activity in the aorta of the SHR. However, ACE activity was higher in the plasma of the rats treated with 200 mg/kg or 400 mg/kg of CCX than in the plasma from the non-treated SHR (see Figures 3 and 4). Angiotensin II plasma levels also increased in the groups of rats treated with 200 mg/kg or 400 mg/kg of CCX. Plasma ACE activity decreased when we interrupted these treatments, and four weeks after the withdrawal of CCX the activity of this enzyme returned to basal values. However, angiotensin II levels were slightly higher after withdrawal of CCX (Figure 5).

CCX did not relax the endothelium-denuded aorta ring preparations. In addition, the relaxations caused by CCX in the  $10^{-4}$  M L-NAME treated aorta ring preparations were lower than the relaxations caused by this cocoa powder in the non-treated aorta ring preparations, but the presence of  $10^{-5}$  M indomethacin in the bath solution did not modify the relaxations induced by CCX in this tissue (Figure 6).

## **Discussion**

Hypertension is a multifactorial pathology that is conditioned by different ambiental and social factors, as well as by different endocrine, genetic and metabolic disorders. CCX is a cocoa powder that has demonstrated antihypertensive effects [18,19]. Scientific evidence of bioactivity is required to commercialize functional foods, and it is advisable to explain the mechanism involved in their beneficial effects. Since CCX is a polyphenol rich cocoa powder, in this paper we have evaluated different biomarkers implicated in the antihypertensive properties of these compounds.

Among other factors, hypertension has been associated with free radical production, lipid peroxidation and oxidative stress [26,27]. It is nowadays assumed that plasma MDA reflects all these alterations. On the contrary, reduced glutathione is a molecule which can scavenge reactive oxygen species and other free radicals. Its production is very important in the liver reaching other organs when levels are adequate. Therefore, the balance between plasma MDA and liver reduced glutathione enable us to know the redox state and the antioxidant protection degree of the organism. In this paper, we have clearly demonstrated that the long-term treatment with CCX could decrease plasma MDA and could also increase liver reduced glutathione. These effects disappear when the treatment with CCX was removed. Therefore, the treatment with this cocoa powder, undoubtedly improves the redox state and decreases oxidative stress.

In addition, it is known that endothelial dysfunction could justify, at least in part, the increased blood pressure of hypertensive subjects. In 1980, Furchgott reported that endothelial cells have an obligatory role in the relaxation of arteries by acetylcholine and related muscarinic agonists [25]. The relaxation results from the stimulation by the muscarinic agonist, of the release from the endothelial cells of a very labile diffusible factor that was later characterized as nitric oxide (NO) [24]. It has been demonstrated that polyphenol could improved endothelial function and could release NO [28,29]. We have previously demonstrated that the responses to acethylcholine improved in the aorta from the CCX treated SHR [19]. The endothelial activity could be therefore implicated in the antihypertensive effect of CCX. In this paper, we have demonstrated that the vasorelaxant effect of this cocoa powder is, in fact, endothelium dependent, because this cocoa powder did not relax the endothelium denuded aorta preparations from SHR. Morevoer, the effect of CCX in the aorta preparations was impaired when NO synthase was inhibited. These results correlate CCX activity with the release of NO. On the contrary, prostacyclin seems not to participate in the vasodilator effect of CCX, because this coccoa powder clearly relaxed the aorta tissue when indomethacin, a COX inhibitor, was present in the organ bath.

It has been demonstrated that a variety of tissues, including blood vessels, heart and kidney contain all the essential components of the rennin-angiotensin system [30]. In our study, we obtained plasma and aorta samples from CCX treated SHR to measure ACE activity. ACE activity in aorta samples from the CCX treated SHR was very similar to ACE activity in aorta from non

treated rats. However, the ACE activity in the plasma from the SHR treated with 200 mg/kg/day or 400 mg/kg/day CCX, was significantly higher than the ACE activity in the plasma from non treated rats. Angiotensin II was also higher in the plasma obtained from the rats that had been treated with these doses of CCX than in the plasma from non treated SHR. CCX is a cocoa powder rich overall in monomers through trimers of flavonoids, and it has been described that the procyanidins are the flavonoids that mainly inhibits ACE [31,32]. Our results could be justified having in mind these ideas, because the long-term decrease in arterial blood produces compensatory mechanisms that try to increase this variable. Our results in fact indicate that CCX could also have ACE inhibitory properties. An elevation in plasma ACE concentration has been documented in humans and rats treated with ACE inhibitors [33-35]. In previous works, our research group also demonstrated increased ACE activity in the plasma from SHR that had been long-term treated with captopril [23]. Costerousse et al. (1998) indicated that the increase in circulating ACE levels in rats treated with ACE inhibitors was associated to a generalized increase in ACE gene transcription and ACE synthesis in somatic cells. According to these researchers, this may be due to an adaptative response to the inhibition of the enzyme, but it could be independent of angiotensin II suppression. The consequences of ACE induction during inhibition of the enzyme are not known, but it does not seem to reduce the therapeutic effect of these drugs [36]. It is also true those other mechanisms than ACE inhibition could justify the therapeutic effect of ACE inhibitors [30]. In our study, ACE activity returned to basal values after the follow up period. However, angiotensin II levels were

slightly higher after withdrawal of CCX. This could also be understood, because the feedback that could be produced when ACE is inhibited for a long time, disappears when the block of this enzyme is finished, and in turn a massive synthesis of this vasoconstrictor peptide occurs.

The results obtained in this study have demonstrated that the antihypertensive effect of CCX is endothelium dependent. CCX effect is mediated, at least in part, by endothelial release of NO and by a reduction of oxidative stress. Other mechanisms, like ACE inhibition could also justify the effect of this cocoa powder. In conclusion, we have described some mechanisms implicated in the antihypertensive effect of CCX, a cocoa powder that could be used as a functional food ingredient for controlling blood pressure and other related disorders.

### **Acknowledgements**

This study was supported by Natraceutical Group (36/2007 U.C.M. Project). We also thank Manuel Bas Caro, Technician in Pharmacology, for his excellent care of the rats. Miguel M is recipient of a Ramon y Cajal contract from MICINN.

## **References**

1. Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M, Meinking T, Passan D, Preston M, Rivera A, Taplin D, Vicaria-Clement M. Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension* 1997;29:171-6.
2. Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature* 2003;426:787-8.
3. Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol* 2004;500:299-313.
4. Arts, I.C.; Hollman, P.C.; Kromhout, D. Chocolate as a source of tea flavonoids. *Lancet* 1999;354:488.
5. Lee, K.W.; Kim, Y.J.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J. Agric Food Chem.* 2003;51:7292-5.
6. Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med.* 2006;166:411-7.
7. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1577-84.
8. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1276-83.

9. Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension* 2001;38:159-65.
10. Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:151-6.
11. Emura K, Yokomizo A, Toyoshi T, Moriwaki M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2007;53:68-74.
12. Li JX, Xue B, Chai Q, Liu ZX, Zhao AP, Chen LB. Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* in hypertensive rats. *Chin J Physiol.* 2005;48:101-6.
13. 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 Sci.* 2003;73:1543-55.
14. Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001;133:117-24.
15. 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;134:38-42.

16. 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;112:2436-45.
17. Tomas-Barberan FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo A, Cerda B, Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Ibarra A, Pasamar MA, Ramón D, Espín JC. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem.* 2007;55:26-3935.
18. Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones Mdel M, Muguerza B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre 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;57:6156-62.
19. Quiñones M, Sánchez D, Moulay L, Muguerza B, Miguel M, Aleixandre. Long-term intake of CocaoOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 2010 (in press).
20. Rodríguez-Martínez, MA, Ruiz-Torres, A. Homeostasis between lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in healthy human aging. *Mech Ageing Dev.* 1992;66:213-22.
21. Manso MA, Miguel M, Even J, Hernandez R, Aleixandre MA, López-Fandiño R. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 2008;109:361-7.

22. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ. Monochlorobimane Fluorimetric Method to Measure Tissue Glutathione. *Anal Biochem.* 2000;286:35-7.
23. Miguel M.; Manso M.A.; Aleixandre M.A.; López-Fandiño R. Angiotensin converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after short- and long-term intake of an egg white hydrolysate. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:555-63.
24. Furchgott R.F.; Zawadzki J.V. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
25. Furchgott R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci. Reports* 1999;19:233-51.
26. Pudu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, Muscari A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press.* 2008;17:70-7.
27. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am.* 2009;93:621-35.
28. Grassi D, Aggio A, Onori L, Croce G, Tiberti S, Ferri C, Ferri L, Desideri G. Tea, flavonoids, and nitric oxide-mediated vascular reactivity. *J Nutr.* 2008;138:1554-60.
29. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric oxide* 2009;21:77-91.
30. Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M. Significant target organs for hypertension and cardiac hypertrophy by angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Hypertens Res.* 2004;27:213-9.

31. Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett.* 2003;555:597-600.
32. Ottaviani JI, Actis-Goretta L, Villordo JJ, Fraga CG. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 2006;88:359-65.
33. Fyhrquist F, Forslund T, Tikkanen I, Grönhagen-Riska C. Induction of angiotensin I-converting enzyme rat lung with Captopril (SQ 14225). *Eur J Pharmacol.* 1980;67:473-5.
34. Boomsma F, Debruyjn JHB, Derkx FHM, Schalekamp MADH. Opposite effects of captopril on angiotensin I-converting enzyme activity and concentration: relation between enzyme inhibition and long-term blood pressure response. *Clin Sci.* 1981;60:491-8.
35. Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem.* 2001;49:501-6.
36. Costerousse O, Allegrini J, Clozel JP, Ménard J, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme inhibition but not angiotensin II suppression alters angiotensin I-converting enzyme gene expression in vessels and epithelia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284:1180-7.

### **Figure legends**

**Figure 1.** Histograms of plasma malondialdehyde (MDA) from 20 (■) and 24 week-old (□) spontaneously hypertensive rats. The animals had received from weaning until the 20<sup>th</sup> week of life different daily treatments: tap water (control), CocoanOX (CCX) 100 mg/kg, CCX 200 mg/kg and CCX 400 mg/kg. All rats drank tap water from the 20<sup>th</sup> week of life until the 24<sup>th</sup> week of life. Data are mean values  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. \*P<0.05 vs tap water (control). There are not significative differences between 20 week-old and 24 week-old rats

**Figure 2.** Histograms of the reduced-glutathione in the liver from 20 (■) and 24 week-old (□) spontaneously hypertensive rats. The animals had received from weaning until the 20<sup>th</sup> week of life different daily treatments: tap water (control), CocoanOX (CCX) 100 mg/kg, CCX 200 mg/kg and CCX 400 mg/kg. All rats drank tap water from the 20<sup>th</sup> week of life until the 24<sup>th</sup> week of life. Data are mean values  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. \*P<0.05 vs tap water (control); #P<0.05 vs 20 week-old treated rats.

**Figure 3.** Histograms of the plasma angiotensin converting enzyme activity (ACE) from 20 (■) and 24 week-old (□) spontaneously hypertensive rats. The animals had received from weaning until the 20<sup>th</sup> week of life different daily treatments: tap water (control), CocoanOX (CCX) 100 mg/kg, CCX 200 mg/kg and CCX 400 mg/kg). All rats drank tap water from the 20<sup>th</sup> week of life until the

24<sup>th</sup> week of life. Data are mean values  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. \*P<0.05 vs control tap water (control); #P<0.05 vs 20 week-old treated animals.

**Figure 4.** Histograms of the aorta angiotensin converting enzyme activity (ACE) from 20 ( ) and 24 week-old ( ) spontaneously hypertensive rats. The animals had received from weaning until the 20<sup>th</sup> week of life different daily treatments: tap water (control), CocoanOX (CCX) 100 mg/kg, CCX 200 mg/kg and CCX 400 mg/kg. All rats drank tap water from the 20<sup>th</sup> week of life until the 24<sup>th</sup> week of life. Data are mean values  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. There are not significative differences.

**Figure 5.** Histograms of angiotensin II plasma levels from 20 (■) and 24 week-old (□) spontaneously hypertensive rats. The animals had received from weaning until the 20<sup>th</sup> week of life different daily treatments: tap water (control), CocoanOX (CCX) 100 mg/kg, CCX 200 mg/kg and CCX 400 mg/kg). All rats drank tap water from the 20<sup>th</sup> week of life until the 24<sup>th</sup> week of life. Data are mean values  $\pm$  S.E.M. for 5 animals. \*P<0.05 vs tap water (control); #P<0.05 vs 20 week-old treated animals.

**Figure 6.** Cumulative dose-response curves to CocoanOX (CCX) ( $10^{-4}$  mg/ml – 1 mg/ml) in different aorta ring preparations from spontaneously hypertensive rats: intact (●), endothelium denuded (○), L-NAME ( $10^{-4}$  M)-treated (▲) and indomethacin ( $10^{-5}$  M)-treated (■). The results (mean  $\pm$  SEM for at least 8

preparations and 3 animals) are expressed as the percentage of the previous methoxamine induced contraction. \*P<0.05 vs intact preparations.

Figure 1

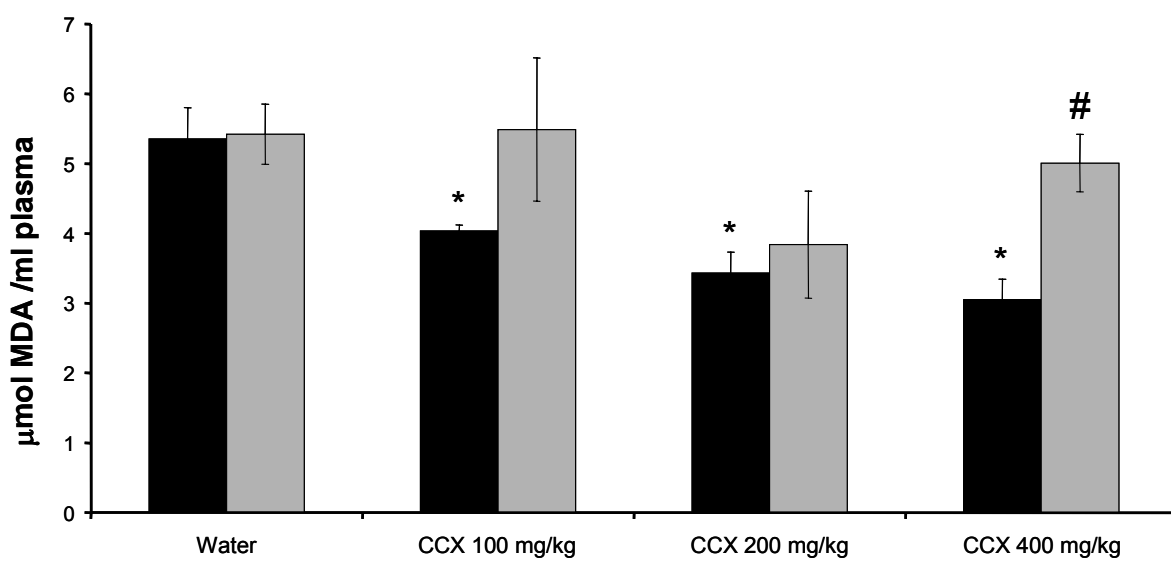


Figure 2

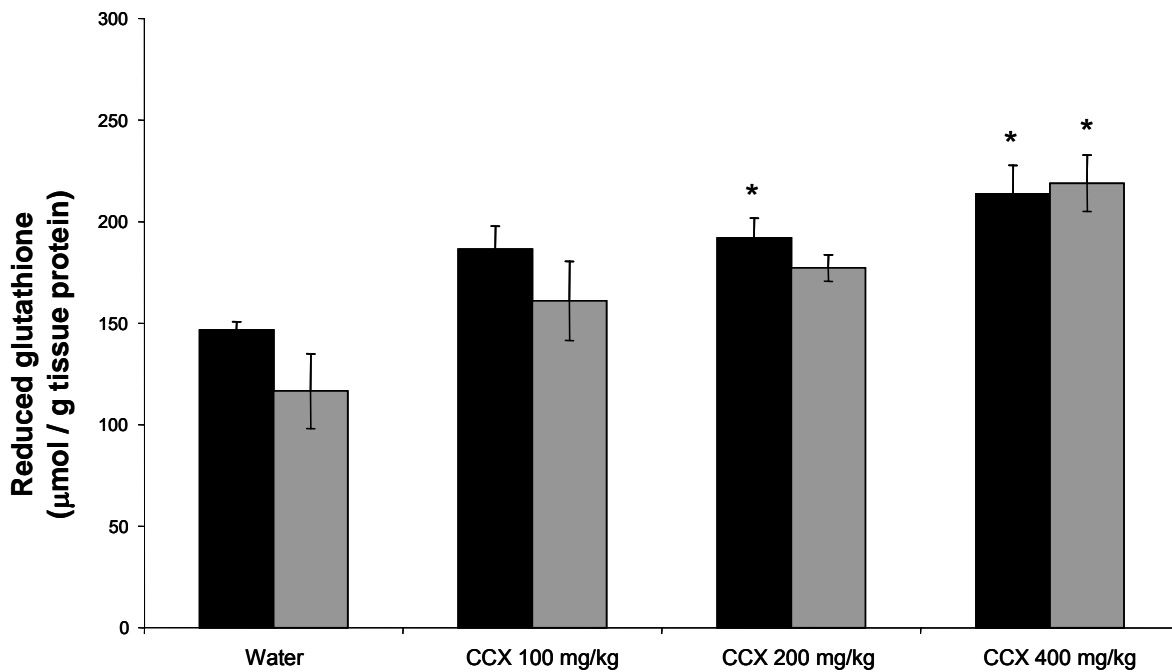


Figure 3

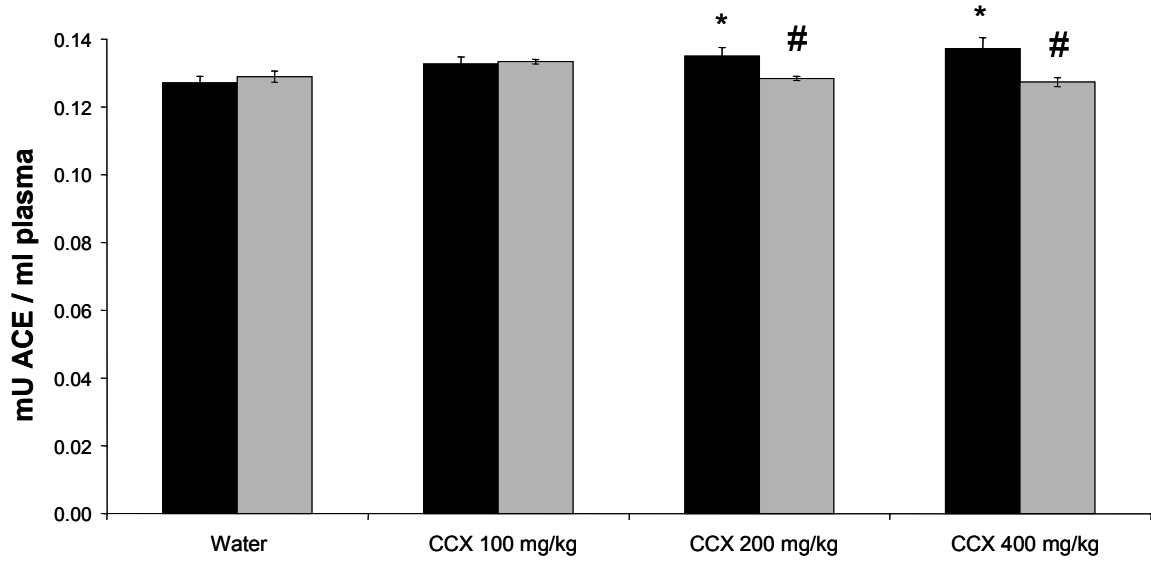


Figure 4

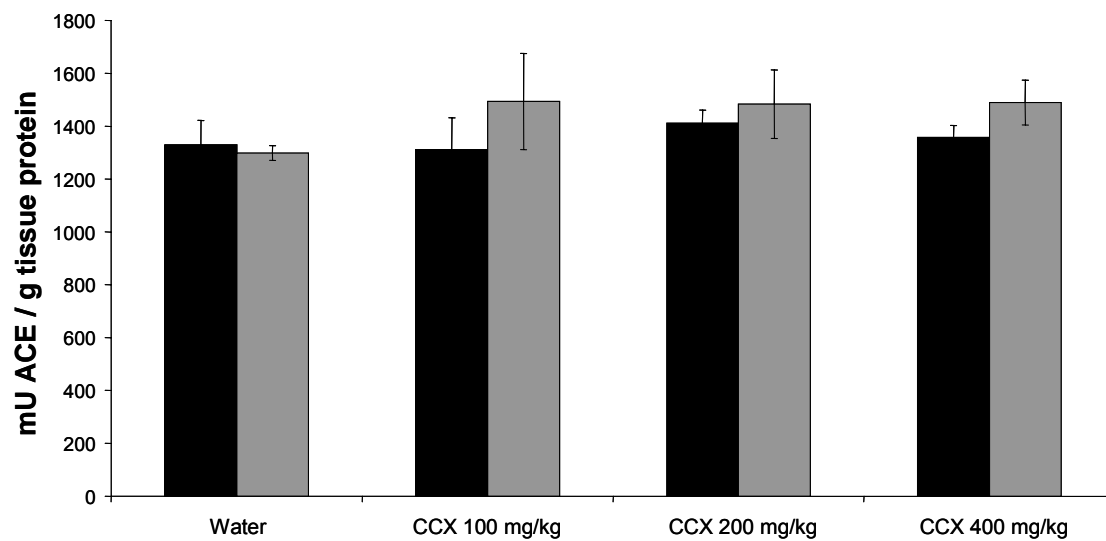


Figure 5

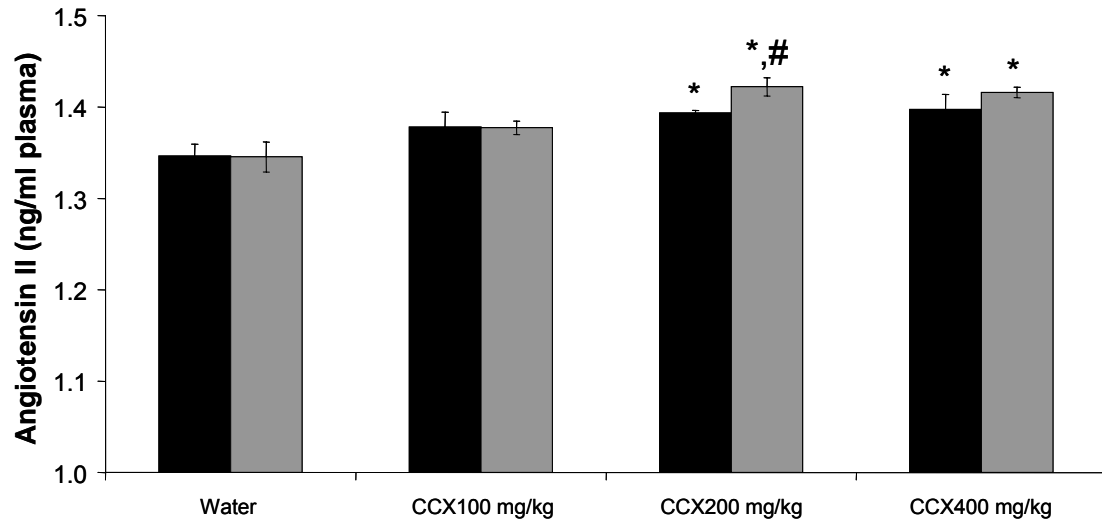
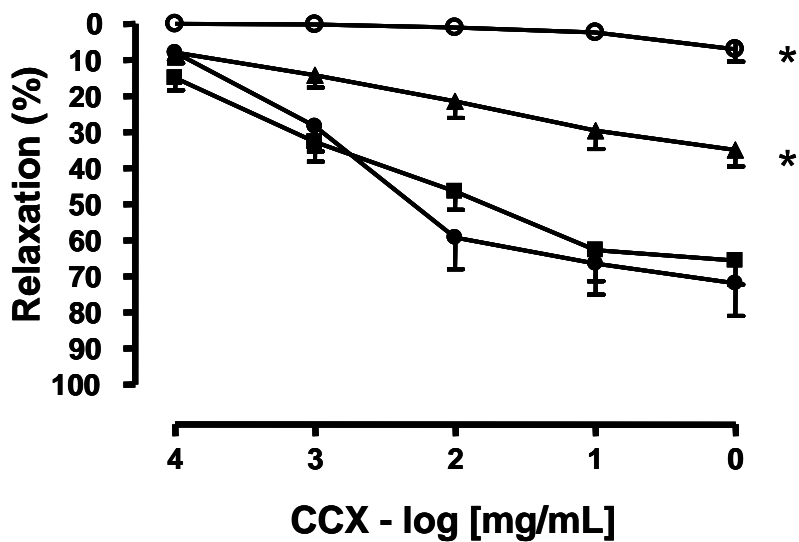


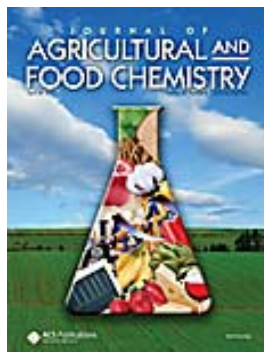
Figure 6



**Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats**

**Quiñones M\***, Mugerza B, Miguel M, Aleixandre A

*Enviado para su publicación al Journal of Agricultural and Food Chemistry*



Indice de impacto SCI: 2,562

Posición dentro del área: 2/35, Agriculture Multidisciplinar



**Evidence that nitric oxide mediates the blood pressure lowering effect of a polyphenol-rich cocoa powder in spontaneously hypertensive rats**

Quiñones M<sup>1</sup>, Muguerza B<sup>2</sup>, Miguel M<sup>3\*</sup>, Aleixandre A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, U. Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Natraceutical Group, Autovía A-3, Salida 343, Camino de Torrent s/n, Quart de Poblet, 46930 Valencia, Spain. <sup>3</sup>Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC) C/ Juan de la Cierva, 3 28006, Madrid, Spain.

**Running title:** Nitric oxide mediates a cocoa powder effect in hypertensive rats

\*Dra. Marta Miguel

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

C/ Juan de la Cierva, 3

28006, Madrid, Spain

Telephone: 34-91-5622900

Fax: 34-91-5644853

E-mail: [marta.miguel@ifi.csic.es](mailto:marta.miguel@ifi.csic.es)

## **Abstract**

The involvement of endothelial-relaxing factors on the antihypertensive effect of CocoanOX (CCX), a cocoa powder with high concentration of polyphenols, was studied. Thirty 17-20-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHR), weighing  $314 \pm 3$  g were used. They were divided into two groups of fifteen animals, that were respectively administered by gastric intubation distilled water or 300 mg/kg CCX dissolved in distilled water, between 9 and 10 am. Two hours after the oral administration, 5 of the animals in each group were intraperitoneally administered 1 ml saline. The remaining rats in both groups were divided into another two groups of 5 animals that were intraperitoneally administered 30 mg/kg Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) dissolved in 1 ml of saline or 5 mg/kg indomethacin also dissolved in 1 ml of saline. Systolic blood pressure (SBP) was recorded in the rats by the tail cuff method before the initial oral administration and also 4 hours after this administration. CCX caused a significant decrease in SBP. L-NAME caused a clear increase in SBP in the rats, and the effect of CCX was not observed in the SHR that were treated with L-NAME. Nevertheless, indomethacin treatment did not modify SBP in the SHR and this compound clearly failed to modify CCX effect in these animals

In conclusion, the antihypertensive effect of CCX, at least in the SHR strain, may be due to changes in endothelium-derived NO bioavailability. In particular, our results suggest that CCX affects endothelial NO synthesis in these animals.

**Key words:** Cocoa, Nitric oxide, Polyphenols, Spontaneously hypertensive rats

## **Introduction**

Hypertension is a major risk factor for stroke, myocardial infarction and kidney failure. In addition, worldwide hypertension is estimated to cause 7.1 million premature deaths and 4.5 % of disease burden (1). Treating hypertension has been associated with about a 40% reduction in the risk of stroke and about a 15% reduction in the risk of myocardial infarction (2). In spite of this, hypertension remains inadequately managed everyone (3). The current and common method for controlling hypertension is the use of a long term drug therapy, but It is well known that drugs have many side effects which may complicate the patient's medical condition. In this context, the new strategies for treating hypertension based in natural products could greatly benefit the hypertensive patients.

Some human studies have demonstrated the antihypertensive properties of cocoa polyphenols (4-9). However, it is worth noting that the preservation of polyphenols during the cocoa manufacturing is important to exhibit the health effects associated to cocoa consumption. It has been reported that high processing temperatures and longer roasting times, as well as alkali treatments, reduce the content of polyphenols in cocoa (10).

A polyphenol-rich cocoa powder, named *CocoanOX*<sup>TM</sup> (CCX), was produced by an innovative industrial patented process (11). The antioxidant capacity of CCX has been described (12), and we have also demonstrated the antihypertensive properties of this product in spontaneously hypertensive rats

(SHR) after short-(13) and long-term treatment (14). Moreover, the main polyphenols of CCX have also shown antihypertensive effect in SHR (15).

In general terms, the antihypertensive properties of polyphenols have been associated with some conditions such as nitric oxide mediated-vasodilation (16-19), angiotensin converting enzyme inhibition (20,21) and a reduced oxidative status caused by the antioxidant capacity of these compounds (22-25). Nevertheless, the underlying mechanisms involved in the antihypertensive effect of CCX have not been examined in detail. Previous studies show that the long-term treatment with this cocoa attenuated the development of hypertension in SHR, and improved also the aorta relaxation to acetylcholine in these animals (14). These data suggested an effect on endothelial function to justify, at least in part, the antihypertensive properties of CCX. The purpose of this study was to investigate the actual participation of the endothelial relaxing factors nitric oxide and prostacyclin in the antihypertensive effect of CCX in SHR.

## **Material and Methods**

### *Experimental procedure in rats*

#### *Products*

CocoanOX was supplied by Natraceutical Group (Valencia, Spain). This product, obtained via an enzymatic patented process, was previously characterized physico-chemically and their antihypertensive properties were proven in an experimental model of hypertension (14). Nw-nitro-L-arginine

methyl ester (L-NAME) and indomethacin were purchased from Sigma Chemical, Co. (St. Louis, MO, USA).

#### *General protocol*

Thirty 17-20-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHR), weighing  $314 \pm 3$  g were used. All these animals were obtained from Charles River Laboratories Spain. The rats were maintained at a temperature of 23° C with 12 hour light/dark cycles, and consumed tap water and a standard diet (A04 Panlab, Barcelona, Spain) *ad libitum* during the experiments. They were divided into two groups of fifteen animals, that were respectively administered by gastric intubation distilled water or 300 mg/kg CCX dissolved in distilled water, between 9 and 10 am. The total volume orally administered to the rats, either of water or of the CCX water solution, was always 1 ml. Two hours after the oral administration, 5 of the animals in each group were intraperitoneally administered 1 ml saline. The remaining rats in both groups were divided into another two groups of 5 animals that were intraperitoneally administered 30 mg/kg Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) dissolved in 1 ml of saline or 5 mg/kg indomethacin also dissolved in 1 ml of saline. Systolic blood pressure (SBP) was recorded in the rats by the tail cuff method (26) before the initial oral administration and also 4 hours after this administration. Before the measurements, the rats were kept at 38°C for 10 minutes in order to detect the pulsations of the tail artery. To guarantee the reliability of the measurements we established a training period of two weeks before the actual trial time, and during this period the rats were accustomed to the procedure. Moreover, to

establish the value of SBP five measurements were taken and the average of all of them was obtained, and to minimize stress-induced variations in blood pressure all measurements were taken by the same person in the same peaceful environment. Nevertheless, the researcher advised to carry out the measurements did not know the exact treatment of each animal.

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

#### *Statistical analysis*

The results are expressed as mean values  $\pm$  standard error of the mean (SEM) for 5 rats, and were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA), using the GraphPad Prism software. Differences between the groups were assessed by the Bonferroni test. Differences between the means was considered to be significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

The initial value of the SBP in the SHR was  $223.3 \pm 2.4$  mm Hg. The changes in this variable after the oral and the intraperitoneal administration of the different products are shown in Figures 1 and 2.

As expected, the animals that received only water and saline did not modify their SBP. 300 mg/kg CCX caused a significant decrease in SBP that could be appreciated 4 hours post-administration in the animals that received

only saline after this cocoa powder. On the contrary, 30 mg of L-NAME caused a clear increase in the SBP in the water-treated rats. The effect of L-NAME could be clearly appreciated two hours after the intraperitoneal administration of this arginine derivative. As shown in Figure 1, the antihypertensive effect of CCX was completely abolished by L-NAME, and therefore the effect of CCX was not observed in the rats that were treated with L-NAME after the cocoa administration. Nevertheless, 5 mg/kg indomethacin had not effect in the water-treated rats, and as shown in Figure 2, the effect of CCX was not modified in the rats that were treated with indomethacin after the cocoa administration.

## **Discussion**

Cocoa and cocoa derivatives are known as a significant source of flavonoids, particularly flavan-3-ols and procyanidins. CCX was produced by an innovative industrial patented process (11) and as we have mentioned in the section Introduction it was characterized as a polyphenol-rich cocoa powder. This study was performed to clarify the mechanisms implicated in the antihypertensive effect of CCX. Our study investigates the possible participation of endothelial relaxing factors in the blood pressure lowering effect of this product. We have used SHR rats, a well known experimental model for essential hypertension in humans (27). As in a previous research carried out in these animals (13), a clear decrease in arterial blood pressure was observed 4 hours post-administration of 300 mg/kg CCX. Therefore, the present study corroborates the short-term antihypertensive effect of CCX in SHR.

The study carried out by Quiñones et al., (14) demonstrated the long-term antihypertensive effect of CCX and also showed that this treatment improved the aorta relaxation to acetylcholine in these animals. According to Furchgott and Zawadzki the vascular relaxation to acetylcholine was endothelium-dependent (28). The first endothelium-derived relaxing substance described was prostacyclin, which is produced by the action of the cyclo-oxygenase enzyme (29). Nevertheless, NO was later identified as another important endothelial relaxing factor (30). The role of NO in arterial tone was clearly established soon later (31) and it was accepted that the source of endothelial NO was a guanidinium nitrogen of L-arginine and that the enzyme responsible for its formation was an oxygenase called endothelial NO synthase (eNOS) (32). In fact, except for some apparent inconsistencies, it became generally accepted that NO was the main endothelium derived relaxing factor (33). NO is actually an important mediator of blood pressure homeostasis and the increase in arterial tone that characterizes the hypertensive state implies frequently an excess of free radicals that destroy this mediator. Enhanced endothelial superoxide anion production has been described in hypertension and these effects are related to impairment of endothelium-dependent relaxation (34,35). In previous studies CCX has demonstrated a high antioxidant capacity (12) and in view of the displayed reasoning this is consistent with the antihypertensive and endothelial effect of this cocoa. Nevertheless, it is also true that the hypertensive process in spontaneously hypertensive rats has been associated with the release of endothelial vasoconstrictor factors (mainly cyclo-oxygenase-

dependent endoperoxides and endothelin-1) (36). Alterations in the function of arterial endothelium have been demonstrated also in prehypertensive SHR (37).

L-NAME is an *in vivo* and *in vitro* inhibitor of eNOS (38,39) and in the present study, a clear increase in SBP was observed after L-NAME treatment to the SHR. The inhibition of basal NO synthesis by this treatment in these animals could justify these results, but what is more important in order to fulfil the aim of this study is the impairment of CCX effect that we have observed in the SHR administered the eNOS inhibitor two hours after cocoa treatment. The study carried out recently by Quiñones et al. (14) already suggests that CCX may cause a decrease in arterial blood pressure by facilitating endothelial relaxing factors, but the results mentioned above provide clear evidence that CCX could facilitate NO release in the SHR. Nevertheless, the endothelium secretes other vasodilator agents different from NO such as prostacyclin, and we have also evaluate the effect of CCX in SHR intraperitoneally injected indomethacin, an inhibitor of endothelial prostanoid biosynthesis. However, since indomethacin treatment did not modify SBP in the SHR and this compound clearly failed to modify CCX effect we could discard endothelial prostacyclin release as a mechanism implicated in the antihypertensive effect of this cocoa powder.

The results obtained in the present study provide novel evidence to identify the mechanisms by which CCX lowers blood pressure in the hypertensive state. This is important because CCX would be beneficial for improving blood pressure also in hypertensive patients and this cocoa would be used as a functional food ingredient. In this study, we have shown that the

blood pressure lowering effect of CCX is mediated through NO pathway. According to our results, the antihypertensive effect of CCX, at least in the SHR strain, may be due to changes in endothelium-derived NO bioavailability, and in particular our results suggest that CCX affects endothelial NO synthesis in these animals. However, to elucidate the actual mechanism(s) responsible for CCX antihypertensive effect further investigation should be carried out and vascular reactivity experiments are recommended.

### **Acknowledgements**

This study was supported by Natraceutical Group (36/2007 U.C.M. Project). We also thank Manuel Bas Caro, Technician in Pharmacology, for his excellent care of the rats. Miguel M. holds a Ramon and Cajal work contract.

## References

- (1) World Health Organization. The World Health Report: Risks to Health. **1996**.  
*World Health Organization*, Geneva.
- (2) Collins, R.; Peto, R.; MacMahon, S.; Hebert, P.; Ffiebach, N.H.; Eberlein, K.A. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease Part 2: short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. *Lancet* **1990**, *335*, 827–838.
- (3) Mancia, G.; Bombelli, M.; Lanzarotti, A.; Grassi, G.; Cesana, G.; Zanchetti, A.; Sega, R.; Systolic vs. diastolic blood pressure control in the hypertensive patients of the PAMELA population. *Arch. Intern. Med.* **2002**, *162*, 582–586.
- (4) Taubert, D.; Berkels, R.; Roesen, R.; Klaus, W. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA.* **2003**, *290*, 1029-30.
- (5) 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.
- (6) Taubert, D.; Roesen, R.; Schömig, E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **2007**, *167*, 626-34.
- (7) Grassi, D.; Necozione, S.; Lippi, C. et al. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* **2005**, *46*, 398-405.
- (8) Grassi, D.; Lippi, C.; Necozione, S.; Desideri, G.; Ferri, C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in

- insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 611-4.
- (9) Buijsse, B.; Feskens, E.J.M.; Kok, F.J.; Kromhout, D. Cocoa Intake, Blood Pressure and Cardiovascular Mortality. *Arch. Intern. Med.* **2006**, *166*, 411-417.
- (10) Gu, L.; House, S.E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R.L. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4057-61;
- (11) Cienfuegos-Jovellanos, E.; Pasamar, M.A.; Fritz, J.; Arcos, J.; Ramón, D.; Castilla, Y. Method for obtaining polyphenol-rich cocoa powder with a low fat content and cocoa thus obtained. **2007**, *Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 2007/096449A1*, Natraceutical Industrial, España.
- (12) Ríos, J.L.; Schinella, G.; Mosca, S.; Cienfuegos-Jovellanos, E.; Pasamar M.A.; Muguerza, B.; Ramón, D. Antioxidant activity of three polyphenol-enriched cocoa products obtained on an industrial scale. *Planta Med.* **2009**, *75 (supl.)*, 1064.
- (13) Cienfuegos-Jovellanos, E.; Quiñones, M.; Muguerza, B.; Moulay, L.; Miguel, M.; Aleixandre, 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.
- (14) Quiñones, M.; Sánchez, D.; Muguerza, B.; Moulay, L.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Long-term intake of CocioanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* **2010**, *122*, 1013-1019

- (15) Quiñones, M.; Sánchez, D.; Muguerza, B.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Efecto agudo de los principales polifenoles del cacao sobre la presión arterial de ratas espontáneamente hipertensas. *14ª Reunión Nacional Sociedad Española de Hipertensión - Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial* (Málaga, **2009**); Poster 12, 5.
- (16) Emura, K.; Yokomizo, A.; Toyoshi, T.; Moriwaki, M. Effect of enzymatically modified isoquercetin in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokio)*. **2007**, *1*, 68-74.
- (17) Yamamoto, M.; Suzuki, A.; Hase, T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokio)*. **2008**, *1*, 95-98.
- (18) Ichimura, T.; Yamanaka, A.; Ichiba, T.; Toyokawa, T.; Kamada, Y.; Tamamura, T.; Maruyama, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *3*, 718-721.
- (19) Mukai, Y.; Sato, S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2009**, *19*, 491-497.
- (20) Li, JX.; Xue, B.; Chai, Q.; Liu, Z.X.; Zhao, A.P.; Chen, L.B. Antihypertensive effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* in hipertensive rats. *Chin. J. Physiol.* **2005**, *2*, 101-106.

- (21) Liu, J.C.; Hsu, F.L.; Tsa, J.C.; Chan, P.; Liu, J.Y.; Thomas, G.N.; Tomlinson, B.; Lo, M.Y.; Lin, J.Y. Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Life. Sci.* **2003**, *12*, 1543-1555.
- (22) Duarte, J.; Perez-Palencia, R.; Vargas, F.; Ocete, M.A.; Pérez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; Tamargo, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *1*, 117-124.
- (23) Negishi, H.; Xu, J.W.; 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**, *1*, 38-42.
- (24) Villar, I.C.; Jiménez, R.; Galisteo, M.; Garcia-Saura, M.F.; Zarzuelo, A.; Duarte, J. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.* **2002**, *9*, 847-850.
- (25) Peng, N.; Clark, J.T.; Prasain, J.; Kim, H.; White, C.R.; Wyss, J.M. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2005**, *3*, 771-775.
- (26) Buñag, R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J. Appl. Physiol.* **1973**, *34*, 279-282.
- (27) FitzGerald, R.J.; Murray, B.A.; Walsh, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 980-988.

- (28) Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. **1980**, *288*, 373-376.
- (29) Vane, J.R.; Greglewski, R.J.; Botting, R.M. The endothelial cells as a metabolic and endocrine organ *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, *8*, 491-496.
- (30) Moncada, S.; Herman, A.G.; Vanhoutte, P. Endothelium-derived relaxing factor identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, *8*, 365-368.
- (31) Moncada, S.; Radomski, M.W.; Palmer, R.M.J. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2495-2501.
- (32) Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S.; Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **1988**, *333*, 664-666.
- (33) Furchgott, R.F.; Khan, M, T.; Jothianandan, D. Comparison of properties of nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: Some cautionary findings. In *Endothelium-derived Relaxing Factors*, edited by GM Rubanyi and PM Vanhoutte, 1990; pp. 8-21, Karger, Basel.
- (34) Kumar, K.V.; Das, U.N. Are free radicals involved in the pathology of human essential hypertension?. *Free Radic. Res. Commun.* **1993**, *19*, 59-66.
- (35) Sekiguchi, F.; Yanamoto, A.; Sunano, S. Superoxide dismutase reduces the impairment of endothelium-dependent relaxation in the spontaneously hypertensive rat aorta. *J. Smooth Muscle Res.* **2004**, *40*, 65-74.

- (36) Félétou, M.; Vanhoutte, P.M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H985-H1002.
- (37) Jameson, M.; Dai, F.X.; Lüscher, T.; Skopec, J.; Dierderich, A.; Diederich, D. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension. *Hypertension* **1993**, *21*, 280-288.
- (38) Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109-142.
- (39) Rees, D.D.; Palmer, R.M.J.; Schulz, R.; Hodson, H.F.; Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **1990**, *101*, 746-752.

### **Figure legends**

**Figure 1.** Changes in systolic blood pressure (SBP) caused in spontaneously hypertensive rats after different treatments: water + saline (☐), 300 mg/kg CCX + saline (■), water + 30 mg/kg L-NAME (▣) or 300 mg/kg CCX + 30 mg/kg L-NAME (□). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The experimental groups always have 5 animals. Different letters represent statistical differences ( $p < 0.05$ ). P estimated by one-way ANOVA.

**Figure 2.** Changes in systolic blood pressure (SBP) caused in spontaneously hypertensive rats after different treatments: water + saline (☐), 300 mg/kg CCX + saline (■), water + 5 mg/kg indomethacin (▣) or 300 mg/kg CCX + 5 mg/kg indomethacin (□). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The experimental groups always have 5 animals. Different letters represent statistical differences ( $p < 0.05$ ). P estimated by one-way ANOVA.

Figure 1

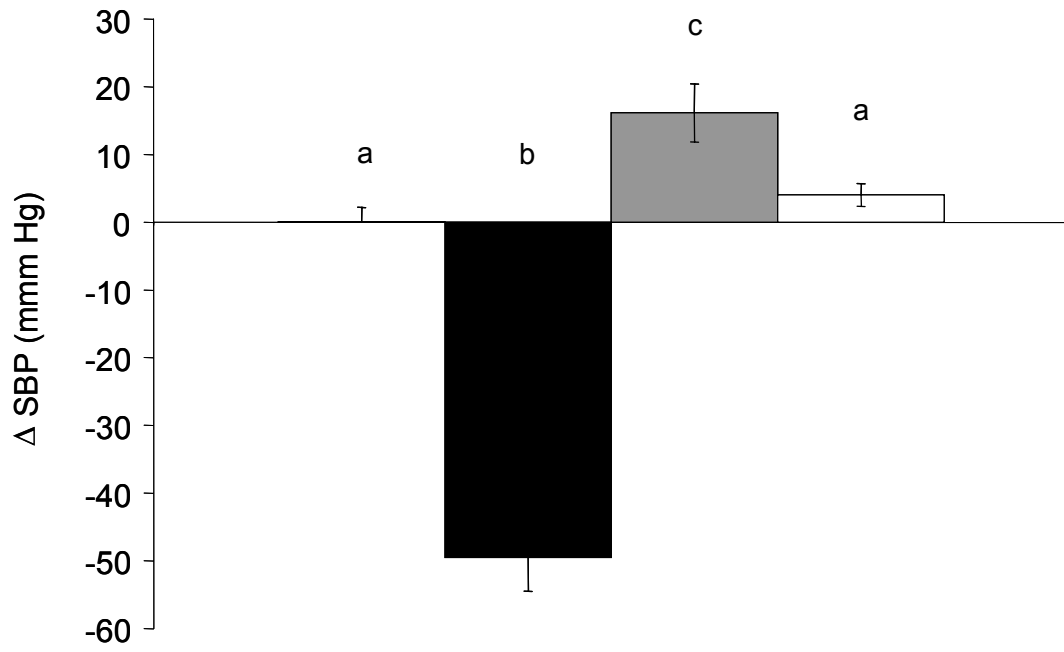
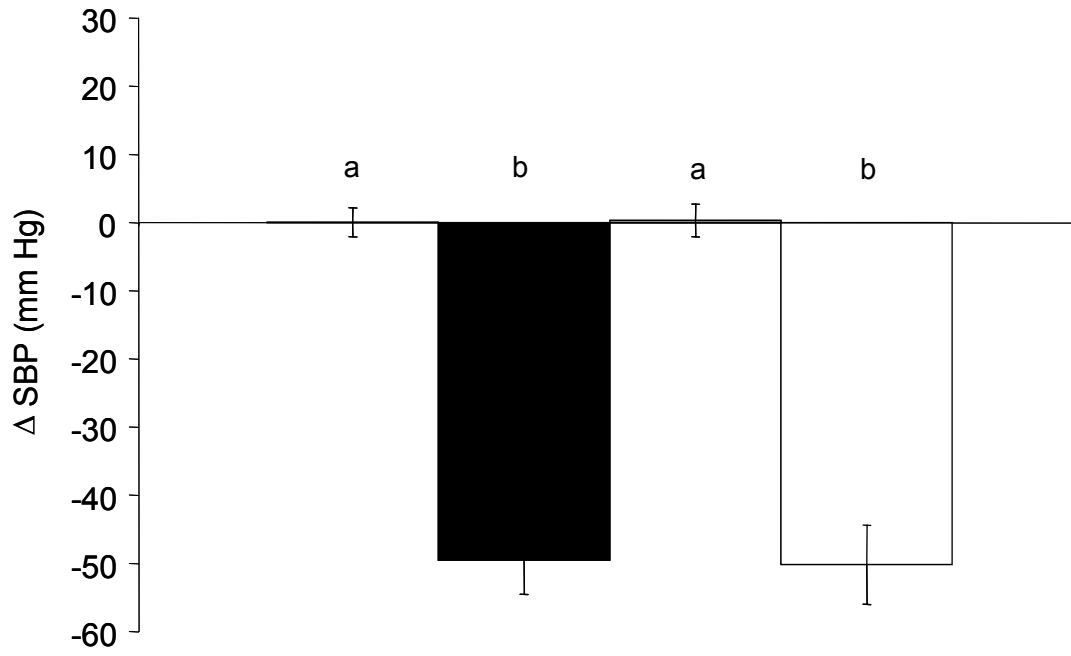


Figure 2





## **DISCUSIÓN**



En la presente Tesis Doctoral, hemos evaluado el posible efecto antihipertensivo de un cacao rico en polifenoles denominado CcoanOX (CCX). En esta Tesis Doctoral, también hemos estudiado los mecanismos que podrían justificar los efectos de CCX sobre la presión arterial. Es sobradamente conocido que los polifenoles presentan importantes efectos beneficiosos sobre la salud, la mayoría derivados de sus propiedades antioxidantes. Concretamente, estas propiedades antioxidantes hacen que los polifenoles sean compuestos capaces de disminuir la presión arterial, ya que pueden barrer radicales libres que destruyen el óxido nítrico (NO) y promueven la peroxidación lipídica (Casado et al., 2008; Nicolson, 2007). Sin embargo, otros mecanismos, o quizá otros compuestos distintos de los polifenoles, podrían justificar también la bioactividad de CCX.

Como ya hemos señalado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, el cacao es un alimento muy rico en polifenoles, principalmente catequina y epicatequina (Lee et al., 2003; Manach et al., 2004). Sin embargo, durante el procesado del cacao se destruyen muchos polifenoles (Tomás Barberán et al., 2007; Andrés Lacueva et al., 2008). CCX se ha elaborado después de una rigurosa selección del grano de cacao en origen, y en su elaboración se ha eliminado el proceso de fermentación y se ha añadido una etapa de escaldado para inactivar la polifenol oxidasa, principal enzima implicada en la oxidación de los polifenoles. Así, se consiguió un producto denominado CCX, rico en polifenoles. El grupo de Tomás-Barberán et al. llevó a cabo un estudio piloto previo con este compuesto (Tomás-Barberán et al., 2007). CCX se fabricó después a escala industrial y se ha caracterizado nuevamente después de su producción industrial para esta Tesis Doctoral.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral revelaron que CCX tiene una cantidad media de polifenoles de  $139,3 \pm 15,4$  mg/g. Esta cantidad puede considerarse muy alta, ya que otros derivados de cacao tienen cantidades mucho menores de polifenoles. Por ejemplo, un chocolate estándar puede tener aproximadamente 20 mg/g de polifenoles, y algunos derivados del

cacao solo tienen entre 5 y 8 mg/g de estos compuestos (Waterhouse et al., 1996; Vinson et al., 1999). CCX contiene además entre 3 y 6 veces más procianidinas que otros polvos de cacao (Gu et al., 2006; Miller et al., 2006).

Se ha visto que los flavonoides del cacao presentan una biodisponibilidad aceptable en humanos (Richell et al., 1999; Wang et al., 2000), pero de todos modos hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de los polifenoles es relativamente pobre. Los flavanoles con bajo peso molecular son, sin embargo, los flavonoides que presentan mayor biodisponibilidad (Scalbert & Williamson, 2000). En algunos estudios *in vitro* con células Caco-2 pudo comprobarse que los dímeros y trímeros de procianidinas eran capaces de atravesar la barrera del epitelio intestinal humano, y que por el contrario los polímeros no eran capaces de atravesarla (Scalbert et al., 2000). El perfil de polifenoles que contiene CCX veremos que es importante y que favorece las características cinéticas de este compuesto. Esto ya se vió en el estudio piloto realizado por Tomás-Barberán et al., en 2007, con este polvo de cacao. Estos investigadores vieron que este polvo de cacao tenía valores de epicatequina y procianidina B<sub>2</sub> que eran 8 veces más altos que los de otros polvos de cacao convencionales (Tomás Barberán et al., 2007). El polvo de cacao analizado tenía concentraciones de epicatequina que eran, en realidad, entre 11 y 300 veces más altas que las concentraciones de este polifenol presentes en diferentes chocolates negros comerciales (Cooper et al., 2007). El grupo de Tomás-Barberán et al. (2007) también pudo demostrar que este polvo de cacao, que después se ha producido a escala industrial y se ha denominado CCX, presentaba una alta biodisponibilidad en humanos. Otros investigadores también han conseguido identificar flavanoides con bajo peso molecular, concretamente dímeros de flavanoles, en el plasma humano, y estos compuestos se detectaron después del consumo de un cacao rico en polifenoles distinto al que se ha utilizado en esta Tesis Doctoral (Holt et al., 2002).

Centrándonos en las muestras de CCX obtenidas a escala industrial que hemos utilizado para esta Tesis Doctoral, hay que señalar que estas muestras también tenían valores mayores de flavanoles, especialmente (-)-epicatequina, que los valores de este flavanol presentes en otros productos de cacao (Cooper et al., 2008; Fernandez Larrea et al., 2006). Los resultados que se aportan en esta Tesis Doctoral indican que las muestras de CCX utilizadas tienen además un contenido muy alto de monómeros, dímeros y trímeros de flavanoles. Estos compuestos representan un 42% del total de procianidinas presentes en CCX. Concretamente nuestros resultados también señalan que el contenido de (-)-epicatequina en estas muestras es alto. El hecho de que CCX tenga un contenido elevado de este monómero parece importante, pues se ha demostrado que un incremento en el plasma de (-)-epicatequina supone también un incremento dosis dependiente de la capacidad antioxidante del plasma (Rein et al., 2000; Serafini et al., 2003). El incremento en los valores plasmáticos de (-)-epicatequina también ha podido asociarse con un descenso dosis dependiente de la peroxidación lipídica (Rein et al., 2000). De hecho, un estudio más reciente señaló que el efecto que presentaba un cacao rico en flavanoles sobre la función vascular humana estaba principalmente mediado por (-)-epicatequina (Schroeter et al., 2006). Flammer et al., en 2007 también observaron que los efectos beneficiosos de un chocolate negro sobre el sistema cardiovascular, se correlacionaban con una reducción significativa del estrés oxidativo en el plasma, y con un aumento en las concentraciones plasmáticas de algunos metabolitos de (-)-epicatequina (Flammer et al., 2007). Podemos por tanto afirmar que el alto contenido en monómeros de polifenoles que tiene CCX puede favorecer la biodisponibilidad de este producto, y hay base científica que nos permite pensar que la concentración alta de (-)-epicatequina puede ser importante para su bioactividad. Antes de llevar a cabo los estudios funcionales con CCX, pensábamos desde luego que este producto podía tener efectos importantes sobre el sistema cardiovascular, y concretamente pensábamos que podía tener algún efecto sobre la presión arterial cuando esta variable está elevada. En base a esta idea, elaboramos la hipótesis para esta Tesis Doctoral y nos planteamos unos objetivos que

implicaban la realización de un estudio experimental con CCX en ratas hipertensas.

Para demostrar las propiedades antihipertensivas de CCX hemos utilizado concretamente ratas espontáneamente hipertensas (SHR). También hemos estudiado en estos animales el efecto de los principales polifenoles de CCX. En el apartado 7 de la Introducción hemos comentado que las ratas SHR son en el momento actual el mejor modelo experimental de hipertensión para evaluar compuestos útiles en la hipertensión esencial humana (FitzGerald et al., 2004). Distintos investigadores coinciden en señalar que los principios básicos asociados al desarrollo de la hipertensión en ratas SHR y en humanos, son sorprendentemente muy similares (Zicha y Kunes, 1999). Creemos por lo tanto que si demostramos que CCX presenta efecto antihipertensivo en este modelo experimental, estarán suficientemente justificados los estudios posteriores con este compuesto sobre la presión arterial en humanos.

La medida de la presión arterial se puede realizar de varias formas. Por su precisión, reproducibilidad y rentabilidad, el esfigmomanómetro de mercurio es la forma más generalizada para la medida de la presión arterial en humanos. Esta técnica, que proporciona una medida indirecta de la presión arterial, se describió por Riva-Rocci y Korotkoff en 1910, y lleva más de 100 años utilizándose (Pickering et al., 2005).

El método del manguito en la cola o “tail cuff” que hemos utilizado en esta Tesis Doctoral para medir la presión arterial en las ratas SHR, tiene unos fundamentos muy similares a los de la medida de la presión arterial en humanos con un esfigmomanómetro. Esta forma de medir la presión arterial en las ratas está muy difundida y su fiabilidad está ampliamente avalada. Tiene además la ventaja de ser un procedimiento no invasivo que no resulta complicado, y su coste no es excesivo. La medida de la presión arterial con el esfigmomanómetro es indirecta, y la medida de la presión arterial con el “tail cuff” también lo es, pero desde hace tiempo se sabe que los registros de la

presión arterial obtenidos en las ratas con este equipo se correlacionan bien con los registros directos que se pueden obtener utilizando catéteres intrarteriales en estos animales (Buñag & Butterfield, 1982). Algunos investigadores, sin embargo, señalan que se pueden sobreestimar las medidas de presión arterial cuando se utiliza el “tail cuff” (Bazil et al., 1993). Distintos hechos pueden justificarlo. En la metodología de los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral se ha señalado que para obtener la medida de la presión arterial, la rata se somete a una temperatura de 38°C y se inmoviliza. La hipertermia es un potente estimulante del sistema nervioso simpático y aumenta la actividad de los nervios adrenérgicos que inervan diferentes lechos arteriales (Kenney et al., 1995). La inmovilización también facilita las respuestas simpáticas y produce un aumento de catecolaminas y cortisol en plasma (McCarty et al., 1978). Tendremos por lo tanto que asumir que los valores de presión arterial que hemos obtenido en esta Tesis Doctoral con el “tail cuff” pueden haber sido algo más altos que los valores que podríamos haber obtenido si hubiésemos llevado a cabo medidas directas de esta variable en los animales. En trabajos anteriores, distintos a los presentados en esta Tesis Doctoral, nuestro grupo utilizaba ratas superficialmente anestesiadas cuando tenían que medir la presión arterial en estos animales. Este procedimiento para medir la presión arterial en las ratas fue descrito por Dietz et al. en 1998 (Dietz et al., 1998). Puede utilizarse para evitar el estrés de los animales y facilitar así la medida, pero conlleva lógicamente el inconveniente de que el anestésico ocasiona siempre una ligera modificación de la presión arterial. Por eso, para esta Tesis Doctoral, hemos preferido llevar a cabo las medidas con el “tail cuff” en ratas conscientes. Sin embargo, es imprescindible señalar que para obtener buenas medidas estas ratas necesariamente tenían que estar previamente acostumbradas al procedimiento. La medida definitiva nunca se llevaba a cabo antes de haber transcurrido dos semanas desde que las ratas comenzaban a adiestrarse. Los estudios en los que se realizaban administraciones agudas de CCX se llevaban a cabo en ratas de 17-20 semanas de vida, pero los animales llegaban a nuestro estabulario con aproximadamente 15 semanas de vida, y durante las dos semanas anteriores a

los experimentos las ratas se acostumbraban diariamente al procedimiento utilizado para la medida. Los estudios de administración crónica comenzaban con ratas SHR recién destetadas, y en estos estudios los animales se acostumbraban también al procedimiento durante las primeras semanas de vida, de forma que solo consideramos fiables las medidas a partir de las 6 semanas. El acostumbramiento de los animales es, por lo tanto, fundamental para que la medida sea fiable, ya que las ratas SHR son muy nerviosas y las manipulaciones necesarias para llevar a cabo las medidas de la presión arterial pueden ocasionar estrés en estos animales y promover valores de presión arterial mayores de los usuales.

Ha quedado claro que las medidas de la presión arterial obtenidas en esta Tesis Doctoral con nuestro equipo de "tail cuff" son medidas fiables aunque pueden sobreestimar algo el valor de esta variable. Los primeros equipos utilizados únicamente proporcionaban medidas fiables de PAS, pero los equipos actuales para medir la presión arterial en la arteria caudal de la rata permiten obtener medidas fiables de ambas variables, PAS y PAD. Sin embargo, en algunos estudios de los ensayos realizados para esta Tesis Doctoral no se han representado las modificaciones que ocasionaban los compuestos sobre la PAD. Distintos motivos lo justifican. Desde luego, la obtención de las medidas de PAS es siempre más precisa, y cuando se aportan datos de PAD suele haber una variabilidad importante y los errores estándar de las medias que definen las medidas pueden ser grandes. Hay además que tener en consideración que hoy día se asume que cuando un compuesto es capaz de bajar la PAS su utilidad clínica va a ser buena, ya que está variable es más difícil de controlar que la PAD. Los valores altos de PAS se relacionan además en mayor medida que los valores altos de PAD con el riesgo de aparición de eventos cardiovasculares (Kaplan et al., 2004). Es decir, unos buenos resultados sobre la PAS son suficientes para poder afirmar, que las propiedades antihipertensivas de un compuesto son buenas.

Hemos justificado el modelo experimental de hipertensión utilizado en esta Tesis Doctoral, y hemos hecho algunos comentarios sobre la técnica

empleada en ella para medir la presión arterial. Pasamos a continuación a discutir los resultados concretos que hemos obtenido con CCX cuando este producto se administraba a las ratas SHR.

En la presente Tesis Doctoral, hemos podido demostrar que CCX presenta efecto antihipertensivo en las ratas SHR después de su administración aguda, por vía oral. La dosis de CCX que causó mayor efecto sobre la PAS fue la dosis de 300 mg/kg. Esta dosis producía una acusada disminución de la PAS en los animales. El efecto producido por 300 mg/kg de CCX era muy similar al efecto que producía en estos animales la administración oral de 50 mg/kg de captopril. Esto es importante, ya que este fármaco se utiliza muy frecuentemente como tratamiento antihipertensivo en los pacientes hipertensos y resulta muy eficaz en la práctica clínica. Las dosis mencionadas de ambos compuestos (300 mg/kg de CCX y 50 mg/kg de captopril), causaron una disminución de la PAS que fue máxima 4 horas después de sus respectivas administraciones. La eficacia de CCX para disminuir la PAD fue incluso mayor que la eficacia de captopril para disminuir esta variable. La dosis de 100 mg/kg de CCX fue la que ocasionó los mayores descensos de PAD. La disminución de esta variable fue máxima 4 horas después de la administración.

Los países desarrollados muestran actualmente mucho interés por las dietas enriquecidas en polifenoles, ya que estos compuestos claramente disminuyen la incidencia de enfermedades cardiovasculares. Los polifenoles son compuestos bioactivos que contribuyen a mantener los mecanismos de defensa antioxidantes del organismo, y estos mecanismos son fundamentales para mantener el tono vascular y para reducir la actividad plaquetaria y el riesgo de formación de coágulos (Rice-Evans, 1995). Las propiedades saludables, en particular las propiedades antihipertensivas que tiene CCX, podrían desde luego estar relacionadas con el contenido de polifenoles que tiene este cacao. Hay muchos estudios que han demostrado los efectos antihipertensivos de los polifenoles, y hay que recordar que CCX es un cacao

rico en polifenoles. Algunos de los resultados de esta Tesis Doctoral, que comentaremos a continuación, nos permiten pensar que los polifenoles presentes en este polvo de cacao son prioritariamente los responsables de su efecto antihipertensivo, pero no podemos olvidar que CCX, además de polifenoles, tiene otros compuestos con posible efecto a nivel cardiovascular, entre ellos teobromina. La teobromina es un alcaloide que se ha utilizado para tratar la hipertensión, ya que es capaz de relajar el músculo liso y dilatar la vasculatura. Sin embargo, no parece que la cantidad de teobromina presente en CCX pueda justificar su efecto antihipertensivo. Hay que tener en cuenta que la disminución de la presión arterial causada por teobromina es dosis dependiente (Yamamoto et al., 2008). Cuando se administraron 600 mg/kg de CCX, la cantidad de teobromina que se administró a los animales fue mucho mayor que la cantidad de teobromina administrada cuando se utilizaban dosis menores de CCX. Si hubiese sido la teobromina la principal responsable de la bajada de presión arterial ocasionada por CCX, también habríamos observado una disminución mayor de la presión arterial con la dosis de 600 mg/kg de CCX que con las dosis más bajas de este compuesto. Sin embargo, hay que comentar que, paradójicamente, cuando administrábamos 600 mg/kg de CCX observábamos un descenso de la presión arterial en las ratas SHR menor que cuando administrábamos dosis más bajas de este polvo de cacao. Esto podría explicarse sin embargo fácilmente si pensamos que son los polifenoles los responsables de los efectos antihipertensivos que presenta CCX, pues diferentes estudios han demostrado que una cantidad alta de polifenoles puede exhibir propiedades prooxidantes en vez de propiedades antioxidantes (Cotelle, 2001; Azam et al., 2004; Lahouel et al., 2006).

Todos estos razonamientos nos permiten afirmar que, al igual que sucede con otros polvos de cacao (Grassi et al., 2005), el efecto antihipertensivo de CCX está relacionado prioritariamente con la presencia de polifenoles en este producto. Los flavanoles del cacao son una mezcla compleja de monómeros de (-)-epicatequina y (+)-catequina con oligómeros de estos monómeros conocidos como procianidinas (Lazarus et al., 1999), pero ya

hemos señalado que las propiedades saludables que tiene el cacao parecen relacionadas fundamentalmente con su alto contenido en compuestos monoméricos y diméricos. Para esta Tesis Doctoral, se caracterizaron unas muestras de CCX cuyo efecto se estudió después en las ratas SHR. La composición de esas muestras se ha reflejado en una tabla que figura en la publicación I que presentamos. En esa tabla se constata que CCX tiene una concentración de  $19,36 \pm 0,03$  mg/g de (-)-epicatequina y de  $5,18 \pm 0,09$  mg/g de (+)-catequina. Estos son los dos monómeros mayoritarios en los granos de cacao sin procesar. CCX tiene desde luego cantidades mayores de epicatequina y catequina que otros polvos de cacao (Tomás-Barberán et al., 2007), y estos dos flavanoles podrían ser en buena medida responsables de los efectos antihipertensivos que CCX presenta en las ratas SHR. Por este motivo, quisimos estudiar también el posible efecto antihipertensivo de estos flavanoles en las ratas. Realizamos unos ensayos en las ratas SHR en los que se administraban distintas dosis de (-)-epicatequina y distintas dosis de (+)-catequina. Las concentraciones de (-)-epicatequina y (+)-catequina que se administraron a estos animales correspondían a las cantidades de estos monómeros presentes en las dosis de CCX que previamente habíamos ensayado. Comentaremos a continuación los resultados obtenidos con los flavanoles de CCX mencionados.

Pudimos demostrar que (-)-epicatequina y (+)-catequina presentaban efecto antihipertensivo en las ratas SHR, aunque el efecto de estos compuestos fue menos pronunciado que el efecto de CCX o Captopril. No hemos encontrado estudios experimentales previos en la literatura que describan el efecto antihipertensivo de (-)-epicatequina o (+)-catequina en animales. Hasta este momento, se han llevado a cabo mucho estudios que han demostrado los efectos antihipertensivos de otros polifenoles en animales (Mizutani et al., 2000; Rivera et al., 2009; Pérez-Vizcaíno et al., 2009), pero nuestro trabajo creemos que es el primer estudio experimental que demuestra los efectos antihipertensivos de (-)-epicatequina y (+)-catequina. Existen sin embargo algunos estudios en los que se ha descrito el efecto relajante vascular

de (-)epicatequina y (+)-catequina *in vitro* (Huang et al., 1998; 1999; Chen et al., 2002; Xu et al., 2007).

Los estudios llevados a cabo con (-)-epicatequina en esta Tesis Doctoral, han demostrado que este flavanol ocasiona un claro descenso de la presión arterial en las ratas SHR. La bioactividad de los monómeros polifenólicos depende de su absorción, de su metabolismo, y de los efectos que pueden presentar sus metabolitos. Los picos de concentración máxima de flavanoles en el plasma humano se han obtenido entre 2 y 3 horas después de las ingestas de estos compuestos (Serafini et al., 2003; Rein et al., 2003), pero 8 horas después de su administración, estos compuestos han podido detectarse todavía en el plasma humano (Richelle et al., 1999). Se ha señalado que la vida media de la (-)-epicatequina es relativamente corta en humanos (menor de 24 h), y se encontraron concentraciones plasmáticas próximas a 1  $\mu$ M de los metabolitos derivados de (-)-epicatequina dos horas después del consumo de un chocolate rico en flavonoides (Richell et al., 1999; Rein et al., 2000). El estudio de Rein et al. (2000) señaló que las concentraciones plasmáticas de los metabolitos derivados de (-)-epicatequina vuelven a los valores basales entre las 6 y las 8 horas después del consumo de este flavonoide de cacao (Rein et al., 2000). Sin embargo, el descenso máximo de la presión arterial en nuestros ensayos con (-)-epicatequina pudo constatarse relativamente tarde, entre las 6 y las 8 horas después de su administración. Es decir, 8 horas después de la administración de (-)-epicatequina, todavía podíamos apreciar que los efectos de este flavanol sobre la presión arterial de las ratas SHR eran importantes. La administración de (+)-catequina en las ratas ocasionó un efecto máximo sobre la presión arterial 4 horas después de su administración, y en este caso también pudimos constatar un efecto claro 8 horas después de su administración. En realidad, en nuestros ensayos, los efectos de (-)-epicatequina y (+)-catequina en las ratas tardaron en recuperarse, y 24 horas después de sus respectivas administraciones aún podían observarse disminuciones significativas de la presión arterial. Los descensos de la presión arterial podían apreciarse claramente incluso 48 horas

después de la administración de (-)-epicatequina. Este flavanol podría ser en buena medida responsable del efecto antihipertensivo de CCX pues, a pesar de lo señalado, su efecto máximo se constató solo un poco más tarde que el efecto máximo de CCX y hay algunos hechos que pueden justificar estas diferencias. En realidad, el efecto de (-)-epicatequina fue muy semejante en el periodo de tiempo comprendido entre las 4 y las 8 horas después de su administración y otros investigadores también han descrito que la biodisponibilidad de los polifenoles cuando se administran en estado puro y cuando se administran incluidos en algún alimento puede ser distinta (Donovan et al., 1999; Holt et al., 2002; Donovan et al., 2006; Cooper et al., 2008). El efecto máximo de (+)-catequina coincidió más en el tiempo con el efecto máximo de CCX, ya que ambos efectos máximos se aprecian 4 horas después de las respectivas administraciones. Indudablemente creemos que el efecto de (+)-catequina tiene también relevancia para justificar el efecto antihipertensivo de CCX.

Recientemente se ha descrito que en el grano de cacao procesado, y también en los productos derivados del cacao, además de (-)-epicatequina y (+)-catequina, existe el monómero atípico (-)-catequina. El monómero (-)-catequina se forma generalmente durante el procesado de los granos del cacao por una epimerización que convierte (-)-epicatequina en su epímero (-)-catequina. Las altas temperaturas a las que se somete el grano de cacao, y particularmente la alcalinización del polvo de cacao durante el procesado, son los principales factores que inducen esta reacción de epimerización (Konfik et al., 2007). Por eso, la (+)-catequina predomina en el grano de cacao y, sin embargo, en el chocolate predomina el epímero (-)-catequina (Gotti et al., 2006).

Ya hemos señalado en la Introducción de esta Tesis Doctoral, que para obtener CCX se utiliza un procedimiento patentado que evita someter el grano de cacao a procesos de fermentación. Se intenta así preservar el contenido original de polifenoles que hay en el grano. Sin embargo, no se puede

descartar que se produzcan algunas modificaciones de estos polifenoles durante la elaboración de CCX. No se puede, por ejemplo descartar, que durante el procesado del grano de cacao que se utiliza para la fabricación de CCX, pueda existir alguna conversión parcial de la (-)-epicatequina a su epímero (-)-catequina. Por este motivo, quisimos también estudiar en esta Tesis Doctoral el efecto de (-)-catequina en las ratas SHR.

Hay que señalar que la naturaleza quiral de los polifenoles puede condicionar su biodisponibilidad. Se ha postulado que la absorción de (+)-catequina, es 10 veces mayor que la de (-)-catequina. La catequina que existe en el cacao se absorbe peor que la catequina que existe en otros alimentos distintos del cacao y esto en parte puede justificarse porque en los granos de cacao existe una mezcla de (+)-catequina y (-)-catequina (Gotti et al., 2006). Existen todavía muchas incógnitas acerca de la biodisponibilidad de los polifenoles, pero en la presente Tesis Doctoral no encontramos en cualquier caso grandes diferencias entre los efectos de (+)-catequina y de (-)-catequina en las ratas SHR.

De los tres monómeros estudiados, (-)-epicatequina causó la máxima disminución de la presión arterial. Pero (+)-catequina y (-)-catequina fueron más potentes para disminuir la presión arterial en estos animales, ya que las dosis de (-)-epicatequina necesarias para disminuir esta variable fueron claramente mayores que las dosis efectivas de (+)-catequina y de (-)-catequina. Cabe resaltar sin embargo que si nos fijamos en las curvas dosis respuesta de los tres flavanoles, podemos ver que la disminución de la presión arterial en el tiempo que produce (-)-catequina es muy parecida a la evolución que tiene el efecto de (-)-epicatequina a lo largo del ensayo. Cabe la posibilidad de que, al igual que sucede durante la fermentación del grano de cacao, también en el organismo tenga lugar la conversión de (-)-epicatequina a (-)-catequina y que, por lo tanto, parte del efecto que tiene la (-)-epicatequina cuando se administra esté relacionado con esta conversión.

Es importante puntualizar que del mismo modo que no pudimos demostrar que el efecto antihipertensivo de CCX fuese un efecto dosis-dependiente, tampoco el efecto antihipertensivo de los flavanoles estudiados aumentaba siempre que aumentábamos la dosis administrada. En todos los casos, es decir, tanto cuando utilizábamos (-)-epicatequina como cuando utilizábamos (+)-catequina o (-)-catequina, la máxima disminución de la presión arterial se conseguía con una dosis menor que la máxima utilizada. De hecho, la dosis 6 mg/kg de (-)-epicatequina, la dosis 0,5 mg/kg de (+)-catequina y la dosis 0,5 mg/kg de (-)-catequina, fueron las dosis que produjeron el efecto máximo de estos polifenoles en las ratas, y la dosis mas alta de estos polifenoles produjo sin embargo un efecto menor. Las dosis de estos flavonoles que produjeron el efecto máximo en las ratas SHR, eran curiosamente las cantidades de estos polifenoles que recibían los animales cuando administrábamos 300 mg/kg de CCX, y cabe recordar que esta dosis de CCX fue la dosis de este cacao que produjo el efecto máximo en las ratas SHR. Tenemos por lo tanto que asumir que las concentraciones altas de los monómeros de polifenol estudiados pueden también producir efectos prooxidantes, y los resultados obtenidos con ellos cuando se modifica la dosis administrada, nos permiten pensar que estos compuestos podrían ser responsables del efecto antihipertensivo de CCX.

Podemos concluir que la administración aguda, por vía oral de CCX, produce un efecto antihipertensivo en las ratas SHR, y que los tres flavanoles ensayados en esta Tesis Doctoral, (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-catequina, ocasionan también una clara disminución de la presión arterial en estos animales cuando se administran por esta vía. El efecto antihipertensivo de CCX podría atribuirse principalmente a su alto contenido en monómeros de polifenol, pero parece arriesgado afirmar que solo colaboren al efecto estos flavanoles. No podemos descartar que otros polifenoles contribuyan de forma significativa al efecto antihipertensivo de CCX, ni tampoco que algunos otros derivados fenólicos puedan mostrar efectos sinérgicos con los polifenoles que nosotros hemos estudiado.

Es también importante señalar que ni la administración de CCX, ni la administración de los flavanoles ensayados, modificó la PAS de las ratas normotensas WKY. Por lo tanto, para que CCX muestre efectos sobre la presión arterial, y también para que los flavanoles bioactivos que lo componen presenten efectos sobre esta variable, se precisa que exista un estado de hipertensión. Es decir, el efecto de estos compuestos aparece únicamente cuando existe una alteración de la presión arterial y los valores de esta variable son superiores a los normales.

Es obvio que se precisarán estudios adicionales con este cacao antes de su utilización terapéutica, pero los resultados que hemos comentado hasta este momento permiten prever su eficacia y seguridad en la práctica clínica.

Hasta este momento hemos comentado el efecto que tiene la administración aguda de CCX en las ratas SHR, y también el efecto que tiene la administración aguda de los polifenoles presentes en este cacao en estos animales. Sin embargo, la hipertensión arterial es una patología crónica que requiere tratamiento continuado. Lo usual es que las medidas antihipertensivas se prolongen indefinidamente. Por lo tanto, una evaluación adecuada de la efectividad antihipertensiva de un compuesto, requiere llevar a cabo algún estudio en el que dicho compuesto se administre de forma crónica. En base a estas ideas, en esta Tesis Doctoral, nos pareció inevitable un estudio administrando CCX a las ratas SHR durante un largo periodo de tiempo. La posibilidad de administrar ingredientes funcionales, sin efectos adversos para el tratamiento de la hipertensión constituye una idea atractiva y, en último término, con esta Tesis Doctoral lo que queremos saber es si la administración continuada de CCX puede resultar útil en esta enfermedad. Es decir, si este cacao puede ayudar a controlar la presión arterial de los sujetos hipertensos.

Varios grupos de investigación (Smith y Huntchings, 1979; Sánchez *et al.*, 1986), y también el nuestro (López-Miranda *et al.*, 1998; Civantos *et al.*, 1999; Miguel *et al.*, 2006), han observado que antes de que se establezca la

presión arterial en las ratas SHR, existe un periodo inicial en la vida de estos animales en el que la presión aumenta progresivamente de forma muy marcada (usualmente hasta las 11-12 semanas de vida). Después, la presión arterial de las ratas SHR sigue aumentando, pero el aumento ya no es tan llamativo. En realidad, para Okamoto y Aoki (Okamoto y Aoki, 1963) la presión arterial de las ratas SHR no se estabiliza totalmente hasta que estos animales tienen aproximadamente 20 semanas de vida. Existen, de todos modos, algunas discrepancias entre los resultados de los distintos grupos de investigación cuando se caracterizan las fases del desarrollo de hipertensión en las ratas SHR. Pueden existir modificaciones temporales para estas fases, ya que para su caracterización, además de las medidas de presión arterial, pueden utilizarse otros criterios adicionales como medidas de flujo, medidas de las resistencias vasculares periféricas, medidas de la actividad simpática y la cuantificación de los receptores adrenérgicos.

Por todo ello, en esta Tesis Doctoral realizamos un estudio en el que administrábamos CCX a las ratas en el agua de bebida; es decir, en el biberón que utilizaban para la ingesta líquida. Este producto se disolvía en el agua del biberón y se administraba así a las ratas desde que se destetaban a las 3 semanas de vida hasta que tenían 20 semanas de vida. Para el estudio en cuestión, utilizábamos 3 grupos de ratas SHR a las que respectivamente administrábamos durante este periodo de tiempo tres dosis distintas de CCX (100, 200 y 400 mg/kg/día). Decidimos también incluir un grupo de ratas SHR en el estudio a las que administrábamos, durante ese mismo periodo de tiempo, un cacao estándar que tenía una concentración de polifenoles mucho menor que CCX. Este cacao estándar tenía concretamente un contenido de epicatequina 30 veces menor que CCX y un contenido total de polifenoles 5 veces menor que nuestro cacao (ver tabla 1 de la publicación II en la sección de Metodología y Resultados). En este estudio, se incluía también un grupo de ratas a las que administrábamos una dosis muy alta de captopril en el agua de bebida (control positivo) y, lógicamente, también había otro grupo de ratas que bebía como producto líquido únicamente agua (control negativo). El grupo

tratado con captopril era desde luego muy importante, porque una vez más, este grupo nos permitía comparar el efecto de nuestro cacao con el efecto de un fármaco plenamente aceptado para el tratamiento de la hipertensión arterial. No consideramos sin embargo necesario incluir en este estudio un grupo de ratas WKY, ya que la administración aguda de CCX no había ocasionado efecto antihipertensivo alguno en estos animales.

En el estudio que acabamos de describir pudimos observar que ambos, captopril y CCX, atenuaban el desarrollo de hipertensión en las ratas SHR. Los dos compuestos fueron también capaces de disminuir la presión arterial de las ratas SHR durante el periodo de la vida de estos animales en el que esta variable se estabiliza; es decir, durante el periodo comprendido entre las 12 y las 20 semanas de vida. Como era de esperar, los valores más bajos de PAS se observaron en el grupo de ratas tratadas con 100 mg/kg/día de captopril. Ferrone y Antonaccio, en 1979, comprobaron asimismo que esta dosis de captopril prevenía totalmente el desarrollo de hipertensión en ratas macho SHR cuando se administraba desde el destete a los animales (Ferrone & Antonaccio, 1979). En nuestro estudio, los descensos de la presión arterial producidos por CCX no eran desde luego tan acentuados como los que producía captopril, pero las disminuciones que este cacao producía fueron también consistentes y mantenidas a lo largo de todo el periodo de tratamiento. Por el contrario, en las ratas tratadas con el cacao estándar no se observaron descensos de la presión arterial. Este grupo de animales tuvo valores de presión arterial que en ocasiones eran incluso más altos que los de los animales del grupo control que bebían agua. Ya hemos señalado en esta Discusión que no creemos que la teobromina sea responsable del efecto antihipertensivo de CCX. Un hecho adicional que lo prueba es que el cacao estándar, que no mostró efectos sobre la presión arterial, tiene una cantidad de esta base xántica incluso mayor que CCX. Esto puede apreciarse en la tabla 1 de la publicación II de nuestros Resultados que revela la composición de estos dos cacaos.

Cuando analizábamos los efectos producidos por la administración crónica de CCX en las ratas, pudimos comprobar que las tres dosis utilizadas ocasionaban un efecto muy parecido. Sin embargo, el efecto parecía más constante y algo más pronunciado cuando se administraba la dosis menor de CCX. Sabemos que cuando se administran dosis agudas de este compuesto no se aprecia un efecto dosis dependiente, y que esto puede estar relacionado con los efectos prooxidantes que ocasionan los polifenoles cuando se utilizan en dosis altas (Lahouel et al., 2006). Estos efectos prooxidantes de los polifenoles podrían también justificar el ligero protagonismo de la dosis menor de CCX utilizada en el estudio en el que este compuesto se administraba de forma crónica.

La retirada de los tratamientos con captopril y con CCX, cuando las ratas tenían 20 semanas de vida, ocasionó una reversión de los efectos sobre la presión arterial. Esta reversión fue total en el caso del CCX y parcial en el caso del captopril. Podemos por tanto decir que CCX disminuye la presión arterial mientras se administra, y que su efecto desaparece cuando deja de administrarse. La desaparición del efecto constituye también una prueba de su bioactividad. El grupo de Sipola et al. trabajó con un producto fermentado que tenía efectos antihipertensivos en ratas SHR y también comprobó que el efecto de este compuesto desaparecía cuando dejaba de administrarse. (Sipola et al., 2001). Asimismo, nuestro grupo de investigación describió la recuperación de la presión arterial que mostraban los animales de esta cepa después de interrumpir un tratamiento antihipertensivo continuado con una leche fermentada (Miguel et al., 2005). También pudimos comprobar que cuando se interrumpía un tratamiento antihipertensivo continuado con un hidrolizado de huevo la presión arterial de las ratas SHR se recuperaba (Miguel et al., 2006). Por otra parte, los datos que aportan otros investigadores corroboran nuestros resultados cuando cesa el tratamiento con captopril, así Kost et al., en el año 2000, después de administrar este mismo fármaco durante 8 semanas a las ratas SHR, observó que 4 semanas después de la retirada del tratamiento, la reversión del efecto antihipertensivo del fármaco era únicamente parcial (Kost

et al., 2000). En nuestro estudio también la recuperación del efecto de captopril fue parcial al retirar el tratamiento, pero quizás podríamos haber conseguido una reversión total del efecto antihipertensivo de captopril si hubiéramos prolongado más el periodo en el que medíamos la presión arterial después de la retirada. Hay que tener en cuenta que el periodo para estudiar la reversión se prolongó únicamente hasta que las ratas tenían 24 semanas de vida, momento en el que ya se había revertido completamente el efecto antihipertensivo de CCX. También es verdad que la dosis que hemos administrado de captopril es muy alta, y la recuperación del efecto de una dosis menor podría haber sido más fácil.

En esta Tesis Doctoral quisimos estudiar también las modificaciones de la función endotelial que tenían las ratas SHR tratadas durante un periodo prolongado de tiempo con CCX. Para ello, extraíamos la aorta de estos animales cuando se sacrificaban, y realizábamos ensayos con acetilcolina en preparaciones de anillos de esta arteria que se montaban en baños de órganos tradicionales. Como bien sabemos, la acetilcolina produce una relajación vascular endotelio dependiente que está mediada por la liberación de NO. Pudimos comprobar, que la potencia de acetilcolina para relajar los anillos de aorta era mayor cuando los animales se habían tratado con CCX y, además, la potencia de acetilcolina era mayor cuando los animales habían recibido la dosis más alta de CCX que cuando habían recibido dosis menores. Este incremento de la potencia de acetilcolina no se observó en las arterias de las ratas a las que se les había retirado el tratamiento de CCX. Nuestros resultados indican que CCX mejora la función endotelial en las ratas SHR, y este beneficio sobre la función endotelial podría justificar, al menos en parte, el efecto antihipertensivo de CCX. Es posible que cuando se administra CCX, los polifenoles que tiene este cacao barran los radicales libres que degradan el NO, y por eso se requieran dosis menores de acetilcolina para relajar el músculo liso vascular. También es posible que CCX sea capaz de inducir la liberación de NO en el endotelio, y que las ratas tratadas con este cacao presenten una liberación basal mayor de este mediador. De hecho, hemos

comprobado que las arterias procedentes de las ratas tratadas con CCX, responden con contracciones menores a KCl y a la metoxamina que las ratas no tratadas (resultados no presentados en esta Tesis Doctoral). Sin embargo, muy probablemente otros mecanismos están también implicados en el efecto antihipertensivo de este compuesto, pues hay que señalar que la función endotelial también mejoró en las aortas de las ratas que se habían tratado con cacao estándar, pese a que este cacao no había modificado la presión arterial de los animales. Lo que resultó en realidad sorprendente fue que las aortas de las ratas sacrificadas después de interrumpir el tratamiento con el cacao estándar seguían respondiendo mejor a la acetilcolina que las aortas de los otros grupos. Es desde luego difícil justificar estos resultados, pero no podemos olvidar que el NO promueve un incremento de GMPc en el músculo liso vascular, y que este mensajero intracelular es responsable de la relajación de este tejido. La teobromina, que está presente en mayor cantidad en el cacao estándar que en el CCX (ver tabla 1 de la publicación II en la sección de Resultados), podría prolongar o aumentar los efectos del GMPc porque es capaz de inhibir las fosfodiesterasas que lo degradan.

Merece la pena comentar el efecto que tuvieron los distintos tratamientos sobre el peso corporal de las ratas SHR. El peso corporal de todas las ratas SHR aumentó progresivamente desde el momento del destete, siendo el incremento de peso más acentuado durante las 11 primeras semanas vida. Los pesos corporales fueron muy semejantes en todas las ratas tratadas con CCX y también en las tratadas con cacao estándar y en las que bebían agua. Es importante resaltar que CCX no modificó la pauta de crecimiento en las ratas SHR, pese a que las ratas tratadas con este producto disminuían algo la ingesta sólida. Estos hechos permiten afirmar que los requerimientos nutricionales de este cacao son adecuados, y esto es importante porque un alimento funcional, además de mostrar bioactividad, debe mantener su beneficio nutricional. Según señaló Di Nicolantonio en 2004, las ratas SHR muestran una tendencia muy acusada a ingerir soluciones dulces y saladas. (Di Nicolantonio, 2004). Las soluciones de CCX tienen un sabor amargo,

característico de los polifenoles, pero los animales no rechazaron en modo alguno estas soluciones, y la ingesta de las ratas tratadas con CCX incluso aumentó de forma significativa. Esto permite también preveer que CCX pueda incluirse con éxito en alimentos para el consumo humano.

En lo que respecta a los datos obtenidos con captopril, hay que señalar que las ratas tratadas con este fármaco tuvieron un peso algo menor que las ratas de los otros grupos. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores que también comprobaron que el bloqueo del sistema renina angiotensina retrasaba la ganancia de peso corporal en esta cepa de animales (Chow et al., 1997). Por otra parte, la ingesta líquida aumentó marcadamente en las ratas que bebían la solución de captopril, pero esto tampoco puede sorprendernos porque se ha demostrado que los inhibidores de la ECA inducen sed y aumentan la ingesta de agua y la cantidad de orina en las ratas. (Barney et al., 1980; Fregly & Rowland, 1991; Cadnapaphornchai et al., 2004).

Para mantener y promover la salud, es importante que se estimule el uso de productos naturales. En relación al estudio descrito, en el que administrábamos CCX de forma crónica a las ratas, cabe resaltar que este compuesto ocasionó una disminución suave, pero mantenida, de la presión arterial en los animales. Una disminución semejante de esta variable podría resultar ventajosa en los pacientes hipertensos, pues se sabe que los descensos repentinos y excesivos de la presión arterial, pueden aumentar el riesgo de aparición de otros problemas distintos a la propia hipertensión. De hecho, un descenso brusco de la presión arterial puede facilitar la producción de infartos de corazón, y puede disminuir la probabilidad de supervivencia en los pacientes hipertensos (Cruickshank et al., 1987; Furberg et al., 1995; Psaty et al., 1995). Distintos investigadores sugieren también que la variabilidad en los niveles de presión arterial es clínicamente relevante. El grado de fluctuación de esta variable puede contribuir a la aparición de daño orgánico, y puede aumentar el riesgo cardiovascular en pacientes hipertensos (Parati & Mancia, 2001; Pringle et al., 2003).

La hipertensión arterial esencial es una patología multifactorial que está condicionada por factores ambientales y sociales, así como por mecanismos endocrinos, genéticos y metabólicos muy diversos. En esta Tesis Doctoral, nos pareció que el estudio de los mecanismos implicados en el efecto antihipertensivo de CCX resultaba también muy conveniente, pues la legislación actual para la comercialización de los alimentos funcionales, además de exigir que se demuestren científicamente las propiedades beneficiosas de estos productos, también recomienda que se establezcan sus mecanismos acción (Reglamento (CE) N° 1924/2006). En la introducción de esta Tesis Doctoral hemos comentado las alteraciones que principalmente pueden condicionar un incremento de tono vascular y una elevación de la presión arterial. Sabemos que CCX es un compuesto rico en polifenoles, y en base a los resultados que hemos comentado hasta este momento, podemos pensar que los polifenoles son los principales responsables de su efecto antihipertensivo. Las propiedades antihipertensivas de los polifenoles están fundamentalmente relacionadas con su capacidad para reducir el estrés oxidativo (Duarte et al., 2001; Villar et al., 2002; Negshi et al., 2004; Peng et al., 2005) y favorecer la producción de NO (Emura et al., 2007; Yamamoto et al., 2008; Ichimura et al., 2006; Mukai & Sato, 2009). Algunos estudios también señalan que los polifenoles pueden inhibir la ECA (Wagner et al., 1992; Parker et al., 1999; Cyrino et al., 2002; Aviram et al., 2001; Actis-Goretta et al., 2003, 2006; Liu et al., 2003; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006). Por eso en esta Tesis Doctoral hemos intentado averiguar si los mecanismos anteriormente señalados pueden justificar el efecto antihipertensivo de CCX. Para ello nos pareció interesante medir las concentraciones plasmáticas de malonildiadehído (MDA) y de glutatión hepático reducido en las ratas SHR que se habían tratado durante un período de tiempo prolongado con CCX. Medimos también la actividad de la ECA en el plasma y en la aorta de estos animales, y la concentración plasmática de angiotensina II. Asimismo, consideramos importante la realización de algunos estudios con CCX en preparaciones de

anillos de la aorta de las ratas SHR, en los que estudiábamos el efecto relajante vascular de este compuesto en distintas condiciones.

En el organismo, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y de las lipoproteínas del plasma, transformándolos en ácidos grasos peroxidados. Estos ácidos grasos peroxidados sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA. Así pues, el MDA es un buen indicador de la peroxidación lipídica, y la cuantificación sérica de este producto metabólico resulta una medida bastante real del grado de oxidación que existe en el organismo. Los datos encontrados en la bibliografía señalan que los niveles séricos basales de MDA en humanos oscilan entre valores no detectables y valores iguales a 2 mM. Durante la etapa aguda de un infarto de miocardio, y también durante las 24 horas posteriores a un accidente cerebrovascular, estos valores pueden aumentar hasta 20 veces (Bermúdez Pirela et al., 2000). En esta Tesis Doctoral, hemos podido comprobar que los niveles plasmáticos de MDA disminuyen tras las administración crónica de CCX en las ratas SHR. Cuatro semanas después de retirar el tratamiento este marcador recuperaba los niveles basales que tenían las ratas sin tratar.

El glutatión es una pequeña molécula, compuesta por tres aminoácidos (ácido glutámico, glicina y cisteína), que funciona como un agente reductor no enzimático. Esta proteína está controlada homeostáticamente tanto fuera como dentro de la célula, de forma que se utiliza y regenera para mantener niveles adecuados disponibles en todo momento. Puede considerarse el principal antioxidante intracelular, y su déficit puede implicar la muerte de las células. Existe en dos formas: la activa o reducida, y la forma oxidada que es inactiva. La forma oxidada, o inactiva, raramente sobrepasa el 10% de la concentración total de glutatión, y la vulnerabilidad celular aumenta cuando los niveles de glutatión reducido representan menos del 90% de la concentración total de glutatión. La relación glutatión reducido/glutatión oxidado puede ser, en realidad, un indicador claro del estrés oxidativo, ya que el glutatión reducido es

capaz de eliminar especies reactivas de oxígeno y otros radicales libres. Como bien sabemos, las especies reactivas de oxígeno, que se generan en la mitocondria y que también provienen de distintos contaminantes ambientales, son altamente reactivas, y si no se neutralizan, dañan o destruyen en milisegundos distintos componentes celulares, tales como la membrana celular, los ácidos nucleicos y las proteínas. La producción de glutathion es sobre todo importante en el hígado. Allí, esta molécula se utiliza para conjugar compuestos tóxicos, permitiendo así que se excreten del organismo. Desde el hígado, el glutathion reducido puede exportarse a otras partes, siempre y cuando sus niveles sean los adecuados.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral revelaron que la administración continuada de CCX era capaz de aumentar los niveles hepáticos de glutathion reducido en las ratas SHR. Después de retirar el tratamiento con CCX, los niveles de glutathion reducido descendieron en los animales que habían recibido dosis de 100 mg/kg o 200 mg/kg de CCX, pero los animales que se habían tratado con 400 mg/kg de CCX mantuvieron valores altos de glutathion reducido 4 semanas después de retirar el tratamiento.

Las determinaciones de MDA y glutathion reducido en las ratas SHR nos permitieron afirmar que CCX puede proteger del estrés oxidativo que se asocia a la hipertensión.

Ríos et al., en 2009, ya señalaron que CCX tenía una alta capacidad antioxidante (Ríos et al., 2009). Esta capacidad antioxidante puede hacer que este compuesto resulte muy útil en la hipertensión. En esta patología se sabe que existe un aumento en la producción endotelial de anión superóxido y una disminución de la relajación endotelio dependiente (Furchgott et al., 1990; Kumar & Das, 1993). Las alteraciones de la función endotelial de las ratas SHR están también asociadas con la liberación de factores endoteliales vasoconstrictores, tales como endotelina y endoperóxidos (Vanhoutte et al., 2009). Se han descrito alteraciones de la función endotelial incluso en ratas

SHR prehipertensas (Jameson et al., 1993). En cualquier caso, hemos señalado en esta Discusión que los polifenoles de CCX podrían barrer los radicales libres que degradan el NO y promover un incremento de este medidor. CCX también podría ocasionar una liberación de NO o de otros factores endoteliales que relajan el músculo liso vascular por un estímulo endotelial directo. Para analizar esta última hipótesis llevamos a cabo distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* en esta Tesis Doctoral. En realidad, los dos factores relajantes vasculares más importantes que libera el endotelio son el NO y la PGI<sub>2</sub>. Por este motivo, nos planteamos algunos estudios con CCX en cuatro tipos de preparaciones de aortas de ratas SHR que se montaban en baños de órganos tradicionales: preparaciones con endotelio, preparaciones sin endotelio, preparaciones con endotelio que estaban preincubadas con L-NAME (inhibidor de la NOS, e inhibidor por consiguiente de la síntesis de NO) y preparaciones con endotelio que estaban preincubadas con indometacina (inhibidor de la COX, e inhibidor por consiguiente de la síntesis de PGI<sub>2</sub>). También se estudiaron los efectos de L-NAME o indometacina sobre la presión arterial de las ratas SHR, y la modificación del efecto antihipertensivo de CCX por estos compuestos. Para ello llevamos a cabo distintos ensayos. En unos administrábamos a las ratas SHR por vía oral mediante sonda intragástrica 300 mg/kg de CCX, dosis que ocasiona el efecto máximo de este compuesto. La presión arterial se medía cuatro horas después de la administración de CCX, momento en el que este compuesto produce los descensos máximos de esta variable. En otros ensayos, dos horas después de la administración de CCX, se administraban por vía intraperitoneal 30 mg/kg de L-NAME. Finalmente, en otros ensayos, también dos horas después de la administración de CCX, se administraban a las ratas 5 mg/kg de indometacina por esta misma vía.

Pudimos comprobar que CCX, era capaz de relajar las preparaciones de la aorta de las ratas SHR, y pudimos también comprobar que este compuesto no relajaba prácticamente las preparaciones de la aorta de estos animales que no tenían endotelio. Además, la relajación que ocasionaba CCX 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 datos, obtenidos *in vitro*, indicaban que el efecto de CCX era endotelio dependiente y que este compuesto era capaz de facilitar la liberación de NO. Los datos obtenidos *in vivo*, que comentaremos a continuación, también avalaron esta idea.

La administración de L-NAME ocasionaba un ligero incremento de la presión arterial en las ratas SHR. Este fármaco probablemente causa una disminución en los niveles de NO basal que justificaría estos resultados. Sin embargo, lo más importante, es que el efecto antihipertensivo que produjo CCX tras su administración aguda por vía oral, no se observaba cuando se había administrado el inhibidor de la NOS dos horas después del tratamiento con el polvo de cacao rico en polifenoles. La indometacina no modificó, sin embargo, la PAS de las ratas SHR, y este fármaco tampoco modificó el efecto producido por CCX. Podríamos por lo tanto descartar que la liberación endotelial de prostacilina pueda colaborar de forma importante al efecto de CCX, pero los datos obtenidos en los estudios *in vivo* nos permiten concluir que este compuesto promueve una liberación endotelial de NO. Sus efectos antihipertensivos están relacionados, al menos en las ratas SHR, con un estímulo de la liberación de este mediador y un posible beneficio en su biodisponibilidad. No podemos descartar, sin embargo, que otros mecanismos de acción puedan estar también implicados en el efecto antihipertensivo de CCX.

La ECA es una enzima multifactorial, que está localizada en diferentes tejidos, y que es capaz de regular varios sistemas importantes para el control de la presión arterial. Es responsable de la formación del péptido vasopresor angiotensina II y de la inactivación del péptido vasodilatador bradiquinina, y su actividad puede aumentar en patologías como la hipertensión, la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2. La inhibición de la ECA puede, por lo tanto, facilitar el control de la presión arterial en situaciones de hipertensión, y puede también

beneficiar otras patologías asociadas a esta enfermedad. De hecho, los inhibidores de la ECA son un tratamiento de primera elección en pacientes que padecen hipertensión. Algunos trabajos han demostrado que los polifenoles son capaces de inhibir la ECA *in vitro* (Wagner et al., 1992; Parker et al., 1999; Cyrino et al., 2002; Aviram et al., 2001; Actis-Goretta et al., 2003, 2006; Liu et al., 2003; Li et al., 2005; Ottaviani et al., 2006) Actis-Goretta et al., en 2003, señalaron que los flavan-3-oles y las procianidinas derivadas de (-)-epicatequina que se aislan del cacao, eran capaces de unirse a la ECA *in vitro*, resultando los hexámeros y los tetrámeros de procianidina más potentes que los monómeros para inhibir esta enzima (Actis-Goretta et al., 2003). Este mismo grupo también comprobó en cultivos de células endoteliales de vena umbilical humana, que los polifenoles inhibían la formación de angiotensina II, y que la estructura de las procianidinas condicionaba en buena medida la inhibición de la ECA. En estas células, los hexámeros de (-)-epicatequina también inhibían la ECA en mayor medida que los tetrámeros, dímeros y monómeros de (-)-epicatequina (Ottaviani et al., 2006). Otro estudio de este mismo grupo demostró que distintos alimentos ricos en flavanoles, entre ellos algunos vinos, chocolates y tés, eran capaces de inhibir *in vitro* la ECA de origen comercial. También eran capaces de inhibir la ECA de los homogeneizados de distintos tejidos de rata tales como riñones, pulmones y testículos. El vino tinto era más eficaz que el vino blanco, y el té verde era más eficaz que el té negro. Estos datos se relacionaron con el contenido de polifenoles y flavanoles de estos alimentos. De hecho, algunos flavonoides presentes en estos alimentos también inhibían la enzima. Se comprobó que las procianidinas inhibían la ECA, pero ni la (+)-catequina, ni la (-)-epicatequina, ni la quercetina, ni el resveratrol, ni otros monómeros de flavonoides eran capaces de inhibirla (Actis-Goretta et al., 2006).

Se ha demostrado que una variedad de tejidos, incluyendo los vasos sanguíneos, el corazón y los riñones, contienen todos los componentes esenciales del sistema renina angiotensina. Se sabe que en las ratas SHR la actividad de la ECA en el tejido vascular está aumentada durante la fase

crónica de la hipertensión (Takai et al., 2004). En esta Tesis Doctoral, se obtuvieron muestras de plasma y muestras de la aorta de las ratas SHR tratadas de forma crónica con CCX, y en ellas medimos la actividad de la ECA. La actividad de la ECA en la aorta de las ratas tratadas crónicamente con CCX fue muy parecida a la actividad de esta enzima en las ratas no tratadas. No obstante, es esta Tesis Doctoral, comprobamos que la actividad enzimática del plasma de las ratas SHR tratadas crónicamente con dosis altas de CCX (200 mg/kg/día y 400 mg/kg/día) era significativamente mayor que la actividad enzimática de las ratas no tratadas. Los niveles de angiotensina II en el plasma de las ratas tratadas crónicamente con dosis altas de CCX, eran asimismo mayores que los niveles plasmáticos de este péptido en las ratas no tratadas. Es verdad que CCX es rico sobre todo en monómeros de flavonoides y que son las procianidinas, y no estos monómeros, los que mayoritariamente inhiben la ECA. Pero nuestros resultados pueden justificarse además porque la disminución prolongada de la presión arterial conlleva siempre mecanismos compensadores que intentan elevar esta variable. De hecho, se ha descrito que la actividad de la ECA aumenta curiosamente en el plasma humano y en el plasma de ratas durante el tratamiento con inhibidores de la ECA (Wu & Ding, 2001; Fyhrquist et al., 1980; Boomsma et al., 1981). Algunos trabajos anteriores de nuestro grupo también demostraron que la actividad de la ECA aumentaba en el plasma de las ratas SHR después de un tratamiento crónico con captopril (Manso et al., 2007). Costerousse et al., en 1998, encontraron que durante el tratamiento con inhibidores de la ECA en ratas, aumentaban los niveles de esta enzima circulantes, y este aumento podía relacionarse con un aumento generalizado en la transcripción del gen de la ECA y un aumento de la síntesis de la ECA en las células somáticas. Todas estas modificaciones de la enzima pueden constituir una respuesta adaptativa cuando se inhibe la ECA, aunque esta respuesta parece ser independiente de la supresión de la formación de angiotensina II. Las consecuencias de la inducción de la ECA durante la inhibición de esta enzima se desconocen, pero no parece que reduzcan el efecto terapéutico de los fármacos que la inhiben (Costerousse et al., 1998). Es cierto además que otros mecanismos distintos de la inhibición de

la ECA podrían justificar el efecto terapéutico de los inhibidores de esta enzima (Takai et al., 2004).

Volviendo a los resultados obtenidos después de retirar el tratamiento con CCX, cabe mencionar que en los animales que habían dejado de ingerir este polvo de cacao, la actividad plasmática de la ECA volvió a los niveles basales que esta enzima tenía en las ratas sin tratar. Sin embargo, los niveles de angiotensina II fueron altos después de interrumpir el tratamiento con CCX. Así pues, el mecanismo de contraregulación que tiene lugar cuando se inhibe de forma prolongada la actividad de la ECA deja de manifestarse al cesar el bloqueo de la enzima, pero al desaparecer este bloqueo tiene lugar una síntesis masiva del péptido vasoconstrictor.

Después de analizar todos los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, podemos concluir que CCX tiene efectos antihipertensivos, y que su efecto sobre la presión arterial es endotelio dependiente y está mediado, al menos en parte, por la liberación de NO y por una reducción del estrés oxidativo. Otros mecanismos como son la inhibición de la ECA podrían también justificar en parte el efecto antihipertensivo de CCX. Los polifenoles presentes en este cacao, especialmente (-)-epicatequina y (+)-catequina, serían prioritariamente responsables de su efecto antihipertensivo. CCX podría utilizarse para controlar la hipertensión arterial, con la ventaja de poderse administrar por vía oral formando parte de algún alimento funcional. No hay que olvidar que CCX procede en realidad de un alimento con gran valor nutricional, que está ampliamente aceptado, y que se consume de forma habitual en la dieta.

La realización de otros estudios experimentales con CCX podría aportar información adicional sobre sus propiedades antihipertensivas, y somos también conscientes de que antes de utilizar CCX como un alimento funcional, habrá que llevar a cabo estudios clínicos que demuestren su eficacia en humanos. Estos ensayos deberán garantizar la seguridad del producto, y

deberán establecer las pautas de utilización de CCX como alimento funcional en sujetos prehipertensos y en pacientes con hipertensión establecida. La dosis de CCX que hemos administrado de forma crónica a las ratas podría servir como punto de partida para calcular las dosis que pueden tener efectos antihipertensivos en el hombre. Sin embargo, siempre hay que tener presente que los datos obtenidos en una especie no son extrapolables a otra especie. Queda claro, de todos modos, que CCX, y algunos de los polifenoles que este polvo de cacao contiene, podrían incluirse como ingredientes en algún alimento útil para el tratamiento y/o la prevención de la hipertensión arterial. Estos productos, o el alimento funcional correspondiente, podrían utilizarse solos, o podrían utilizarse asociados con otros tratamientos farmacológicos clásicos que se utilizan ya para el control de la hipertensión. Cabe prever que CCX resulte sobre todo útil en sujetos hipertensos en los que la presión arterial se controla únicamente con medidas dietéticas, pero también podría también mejorar el control de esta variable en hipertensos farmacológicamente mal controlados. Los resultados alcanzados en este estudio son prometedores, y abren muchas posibilidades para la investigación básica y clínica de este compuesto.

Creemos haber cumplido los objetivos inicialmente previstos en esta Tesis Doctoral. Con ellos hemos demostrado asimismo la hipótesis que planteamos en ella. Esperamos que este estudio permita establecer las bases de otros estudios experimentales con CCX y permita asimismo que este producto llegue a utilizarse como ingrediente funcional en alimentos que mejoren la hipertensión arterial y otras patologías cardiovasculares asociadas.



## **CONCLUSIONES**



CocoanOX (CCX) es un polvo de cacao, que se ha obtenido mediante un procedimiento que preserva de la degradación a los polifenoles, patentado por la empresa Natraceutical Group. En esta Tesis Doctoral, hemos caracterizado la composición de este polvo de cacao después de su fabricación a escala industrial, y hemos estudiado además sus efectos y sus mecanismos de acción en las ratas espontáneamente hipertensas. Con nuestro estudio hemos llegado a las conclusiones que expondremos a continuación, pero somos conscientes de que son necesarios estudios complementarios en la especie humana que corroboren los efectos obtenidos en nuestro modelo experimental.

1. CCX tiene una cantidad media de polifenoles aproximadamente 5 veces más alta que la de otros polvos de cacao, y el porcentaje de monómeros de flavanol y procianidinas de bajo peso molecular que contiene puede justificar su buena biodisponibilidad. Concretamente las concentraciones de epicatequina y catequina en este polvo de cacao son respectivamente 30 y 5 veces más altas, que las concentraciones de estos flavanoles en otros polvos de cacao.
2. CCX produce una clara disminución de la presión arterial sistólica (PAS) y de la presión arterial diastólica (PAD) cuando se administra de forma aguda por vía oral. En estas condiciones de administración, la eficacia de CCX para disminuir la PAS es comparable a la de captopril, y su eficacia para disminuir la PAD es incluso mayor que la de captopril.
3. La teobromina, que forma parte de la composición de CCX, no es responsable de su efecto antihipertensivo.
4. La (-)-epicatequina y la (+)-catequina muestran efecto antihipertensivo tras su administración aguda por vía oral. Estos flavanoles pueden ser en buena medida responsables de los efectos antihipertensivos de CCX, pero

la (-)-catequina es capaz de disminuir la presión arterial, y podría asimismo estar implicada en el efecto antihipertensivo de este cacao.

5. De los tres monómeros de flavanol estudiados, (-)-epicatequina es el más eficaz para disminuir la presión arterial, pero (+)-catequina y (-)-catequina son más potentes y disminuyen la presión arterial con dosis más bajas.
6. El incremento de las dosis de CCX no siempre conlleva un aumento de su efecto antihipertensivo, hecho que puede relacionarse con los efectos prooxidantes que presentan los polifenoles a dosis elevadas. Del mismo modo, un incremento en la dosis de los monómeros de flavanol estudiados tampoco conlleva siempre un aumento de su efecto antihipertensivo.
7. La administración continuada de CCX puede atenuar el desarrollo de hipertensión y ocasiona una disminución suave, pero mantenida, de la presión arterial cuando esta variable está alterada. Su efecto desaparece cuando se retira el tratamiento.
8. CCX y los polifenoles bioactivos que lo componen presentan únicamente efectos sobre la presión arterial cuando existe un estado de hipertensión y los valores de esta variable son superiores a los normales.
9. Los efectos antihipertensivos de CCX están relacionados con un estímulo de la liberación endotelial de óxido nítrico y una reducción del estrés oxidativo que puede promover un aumento en la biodisponibilidad de este mediador. Sin embargo otros mecanismos, como la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, podrían también justificar parte del efecto antihipertensivo de CCX.
10. CCX, además de mostrar bioactividad, tiene unas características nutricionales y organolépticas adecuadas para formar parte de un alimento funcional.

Finalmente queremos señalar que CCX podría resultar útil sobre todo en pacientes hipertensos no medicados en los que la presión arterial se controla únicamente con medidas dietéticas, pero también podría mejorar el control de esta variable en hipertensos farmacológicamente mal controlados. Por ello, nuestra conclusión final, es que CCX como ingrediente funcional podría utilizarse solo o asociado con algunos tratamientos farmacológicos clásicos para el control de la hipertensión arterial.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abu-Amsha R, Croft KD, Puddey IB, Proudfoot JM, Beilin LJ. Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Sci (Lond)* 1996;**91**:449-458.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J Agric Food Chem* 2006;**54**:229-234.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *FEBS Lett* 2003;**555**:597-600.
- Adamson GE, Lazarus SA, Mitchell AE, Prior RL, Cao G, Jacobs PH, Kremers BG, Hammerstone JF, Rucker RB, Ritter KA, Schmitz HH. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 1999;**47**:4184-4188.
- Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 1948;**153**:586-600.
- Aikens J, Dix TA. Hydrodioxyl (perhydroxyl), peroxy, and hydroxyl radical-initiated lipid peroxidation of large unilamellar vesicles (liposomes): comparative and mechanistic studies. *Arch Biochem Biophys* 1993;**305**:516-525.
- Alleva R, Tomasetti M, Battino M, Curatola G, Littarru GP, Folkers K. The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:9388-9391.
- Almeida RS, Ferrari MF, Fior-Chadi DR. Quantitative autoradiography of adrenergic, neuropeptide Y and angiotensin II receptors in the nucleus tractus solitarius and hypothalamus of rats with experimental hypertension. *Gen Pharmacol* 2000;**34**:343-348.
- Andres-Lacueva C, Monagas M, Khan M, Izquierdo-Pulido M, Urpi-Sarda M, Permanyer J, Lamuela-Raventós RM. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process. *J Agric Food Chem* 2008;**56**:3111-3117.
- Andriambelosen E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1997;**120**:1053-1058.
- Andriambelosen E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;**33**:248-254.
- Andújar MI, Recio MC, Giner RM, Muguerza B, Cienfuegos E, Laghi S, Ríos JL. Cocoa polyphenols inhibit COX-2 expression and STAT3 activation in a murine model of ulcerative colitis. *Meth Find Ex Clin Pharmacol* 2009;**30**:58.
- 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.

- Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 1984;**309**:163-165.
- 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.
- Auger C, Gérardin P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissédre PL, Rouanet JM. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J Agric Food Chem* 2004;**52**:5297-5302.
- Aviram M, Dornfeld L. Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*. 2001;**158**:195-198.
- Aviram M, Rosenblat M. Macrophage-mediated oxidation of extracellular low density lipoprotein requires an initial binding of the lipoprotein to its receptor. *J Lipid Res* 1994;**35**:385-398.
- Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol In Vitro* 2004;**18**:555-561.
- Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Nakamura T, Terao J. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res*. 2000;**33**:635-641.
- Bader M, Muse W, Ballou DP, Gassner C, Bardwell JC. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*. 1999;**98**:217-227.
- Badia E, Sacanella E, Fernandez-Sola J, Nicolas JM, Antunez E, Rotilio D, de Gaetano G et al.: Decreased tumor necrosis factor-induced adhesion of human monocytes to endothelial cells after moderate alcohol consumption. *Am J Clin Nutr* 2004;**80**:225–230.
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat Res*. 2003;**523-524**:87-97. Review.
- Banegas JR. Evaluation of stroke risk in patients with hypertension. *Med Clin (Barc)* 2005;**125**:254-256.
- Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int*. 1995;**26**:497-502.
- Barney CC, Katovich MJ, Fregly MJ. The effect of acute administration of an angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril (SQ 14,225), on experimentally induced thirst in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;**12**:53-57.
- Bates CJ, Walmsley CM, Prentice A, Finch S. Does vitamin C reduce blood pressure? Results of a large study of people aged 65 or older. *J Hypertens*. 1998;**16**:925-932.

- Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2009;**55**:1-23.
- Bazil MK, Krulan C, Webb RL. Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovas Pharmacol* 1993;**22**:897-905.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;**87**:1620-1624.
- Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol* 2002;**135**:910-916.
- Bensasson R, Land EJ, Maudinas B. Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. *Photochem Photobiol* 1976;**23**:189-193.
- Beret A, Anton R, Cazenave JP. The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Clin Biol Res* 1986;**213**:281-296.
- Beret A, Briançon-Scheid F, Stierlé A, Corre G, Anton R, Cazenave JP. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate. *Biochem Pharmacol* 1986;**35**:257-262.
- Bermúdez VJ, Bracho V, Bermúdez FA, Medina MT, Núñez M, Amell de Díaz A, Cano C. Malondialdehyde and Nitric Oxide Behaviour in Patient with Myocardial Infarction. *Rev Esp Cardiol* 2000;**53**:502-506.
- Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2000;**275**:30707-15.
- Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup> with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 1983;**258**:4759-4761.
- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar V, Barnes S, Zhou F, Parks DA. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;**25**:434-443.
- Bohr VA, Anson RM. DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging. *Mutat Res* 1995;**338**:25-34.
- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997;**89**:2429-2442.
- Bonomini M, Sirilli V, Di Pietro N, Pandolfi A. Reduced nitric oxide bioavailability in chronic renal failure: a new factor of progression? *G Ital Nefrol.* 2008;**25**:306-16.
- Bonvehí SJ, Coll FV. Protein quality assessment in cocoa husk. *Food Research International* 1999;**32**:201-208.

- Boomsma F, Debruyjn JHB, Derkx FHM, Schalekamp MADH. Opposite effects of captopril on angiotensin I-converting enzyme activity and concentration: relation between enzyme inhibition and long-term blood pressure response. *Clin Sci* 1981;**60**:491-498.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;**56**:317-33.
- Brée F, Hamon G, Tillement JP. Evidence for two binding sites on membrane-bound angiotensin-converting enzymes (ACE) for exogenous inhibitors except in testis. *Life Sci* 1992;**51**:787-794.
- Breusing N, Grune T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol Chem*. 2008;**389**:203-209.
- Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Arch Intern Med* 2006;**166**:411-7.
- Buñag RD, Butterfield J. Tail-cuff blood-pressure measurement without external preheating in awake rats. *Hypertension* 1982;**4**:898-903.
- Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* 2001;**103**:904-912
- Burt VL, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D, Whelton P, Brown C, Roccella EJ. Trends in the prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the adult US population. Data from the health examination surveys, 1960 to 1991. *Hypertension* 1996;**27**:1192.
- Cadnapaphornchai MA, Rogachev B, Summer SM, Chen YC, Gera L, Stewart JM. Evidence for bradykinin as a stimulator of thirst. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**86**:F875-F880.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 2003;**24**:471-8.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;**87**:840-4.
- Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension : part II: treatment. *Circulation* 2000;**101**:446-453.
- Casado A, Encarnación López-Fernández M, Concepción Casado M, de La Torre R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res* 2008;**33**:450-458.
- Cathcart MK, Folcik VA. Lipoxygenases and atherosclerosis: protection versus pathogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000;**28**:1726-1734.
- Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 2008;**31**:181-184.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993;**49**:481-493.
- Chen TY, Chi KH, Wang JS, Chien CL, Lin WW. Reactive oxygen species are involved in FasL-induced caspase-independent cell death and inflammatory responses. *Free Radic Biol Med* 2009;**46**:643-655.

- Chen ZY, Yao XQ, Chan FL, Lau CW, Huang Y. (-)-epicatechin induces and modulates endothelium-dependent relaxation in isolated rat mesenteric artery rings. *Acta Pharmacol Sin* 2002;**23**:1188-1192.
- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Hypertension* 2003;**42**:1206-1252.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*. 1998;**31**:643-648.
- Chow L, De Gasparo M, Levens M. Blockade of angiotensin converting enzyme but not of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors improves glucose tolerance. *European J Pharmacol* 1997;**319**:77-83.
- Cienfuegos-Jovellanos E, Ibarra A, Pasamar MA, Montañés J, Pons JV. 2006. Proceso para la obtención de polvo de cacao rico en polifenoles y de bajo contenido en materia grasa y polvo de cacao obtenido. ES200600462.
- Civantos B, López-Miranda V, Ortega A, Aleixandre MA. Alpha-adrenoceptor-mediated pressor responses in pithed rats fed diets with different calcium contents. *Eur J Pharmacol* 1999;**382**:91-101.
- Constant J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin Cardiol* 1997;**20**:420-424.
- Cooper KA, Campos-Giménez E, Jiménez Alvarez D Nagy K, Donovan JL, Williamson G. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *J Agric Food Chem* 2007;**55**:2841-2847.
- Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G. Cocoa and health: a decade of research. *Br J Nutr* 2008;**99**:1-11.
- Cordova AC, Jackson LS, Berke-Schlessel DW, Sumpio BE. The cardiovascular protective effect of red wine. *J Am Coll Surg* 2005;**200**:428-439.
- Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghé DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem* 2004;**11**:1345-1359.
- Costerousse O, Allegrini J, Clozel JP, Ménard J, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme inhibition but not angiotensin II suppression alters angiotensin I-converting enzyme gene expression in vessels and epithelia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;**284**:1180-1187.
- Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med* 1996;**20**:35-43.

- Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001;**1**: 569-590.
- Crescente M, Jessen G, Momi S, Höltje HD, Gresele P, Cerletti C, de Gaetano G. Interactions of gallic acid, resveratrol, quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Thromb Haemost* 2009;**102**:336-346.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J Agric Food Chem* 2002;**50**:618-621.
- Croteau DL, Bohr VA. Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997;**272**:25409-25412.
- Cruickshank J, Thorp JM, Zacharias FJ. Benefits and potential harm of lowering high blood pressure. *Lancet* 1987;**1**:581-584.
- Cuevas P, García-Calvo M, Carceller F, Reimers D, Zazo M, Cuevas B, Muñoz-Willery I, Martínez-Coso V, Lamas S, Giménez-Gallego G. Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:11996-2001.
- Cushman DW, Pluscec J, Williams NJ, Weaver ER, Sabo EF, Kocy O, Cheung HS, Ondetti MA. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Experientia* 1973;**29**:1032-1035.
- Cyrino LA, Cardoso RC, Hackl LP, Nicolau M. Effect of quercetin on plasma extravasation in rat CNS and dura mater by ACE and NEP inhibition. *Phytother Res* 2002;**16**:545-549.
- Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, Remesy C. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol* 2001;**335**:319-333.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 2007;**43**:348-61.
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 1995;**61**:1-31.
- Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 1987;**262**:9895-9901.
- Davies MJ, Slater TF. Studies on the photolytic breakdown of hydroperoxides and peroxidized fatty acids by using electron spin resonance spectroscopy. Spin trapping of alkoxy and peroxy radicals in organic solvents. *Biochem J* 1986;**240**:789-795.
- Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med* 2000;**29**:1234-1243.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998;**436**:71-75.
- Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br J Nutr* 2001;**1**:105-110.
- de Gaetano G, De Curtis A, di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, Rotondo S. Antithrombotic effect of polyphenols in experimental models: a mechanism of reduced vascular risk by moderate wine consumption. *Ann N Y Acad Sci* 2002;**957**:174-188.

- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wrigh JW, Unger T. Internacional Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:415-472.
- de Luis DA, Aller R. Role of tea flavonoids in cardiovascular protection. *An Med Interna* 2008;**25**:105-107.
- de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem* 2000;**48**:5331-5337.
- Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 1998;**31**:912-917.
- Deddish PA, Wang LX, Jackman HL, Michel B, Wang J, Skidgel RA, Erdös EG. Single-domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characterization and properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**279**:1582-1589.
- Del Bas JM, Fernández-Larrea J, Blay M, Ardèvol A, Salvadó MJ, Arola L, Bladé C. Grape seed procyanidins improve atherosclerotic risk index and induce liver CYP7A1 and SHP expression in healthy rats. *FASEB J* 2005;**19**:479-481.
- Dell'Agli M, Buscialà A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res* 2004;**63**:593-602.
- Dell'Agli M, Galli GV, Vrhovsek U, Mattivi F, Bosisio E. In vitro inhibition of human cGMP-specific phosphodiesterase-5 by polyphenols from red grapes. *J Agric Food Chem* 2005;**53**:1960-1965.
- Di Nicolantonio R. Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions?. *Annual hypothesis J Hyperten* 2004;**22**:1649-1654.
- Diebolt M, Bucher B, Andriantsitohaina R. Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression. *Hypertension* 2001;**38**:159-165.
- Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 2002;**40**:866-871.
- Dietz R, Schöming A, Haebara H, Mann JFE, Rascher W, Lüth JB, Grünherz N, Gross F. Studies on the pathogenesis of spontaneously hypertension of rats. *Circ Res* 1978;**43**:198-1196.
- Dillinger TL, Barriga P, Escárcega S, Jimenez M, Salazar Lowe D, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *J Nutr* 2000;**130**:2057S-2072S.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997;**81**:970-976.
- Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutr Metab (Lond)* 2006;**3**:2.

- Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998;**80**:S77-S112.
- Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 1998;**39**:89-105.
- Dohi Y, Ohashi M, Sugiyama M, Takase H, Sato K, Ueda R. Candesartan reduces oxidative stress and inflammation in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 2003;**26**:691-697.
- Donkó A, Péterfi Z, Sum A, Leto T, Geiszt M. Dual oxidases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;**360**:2301-2308.
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000;**87**:1-9.
- Donovan JL, Crespy V, Oliveira M, Cooper KA, Gibson BB, Williamson G. (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radic Res* 2006;**40**:1029-1034.
- Donovan JL, Kasim-Karakas S, German JB, Waterhouse AL. Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *Br J Nutr* 2002;**87**:31-37.
- Donovan JL, Luthria DL, Stremple P, Waterhouse AL. Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-O-methylated analogs. A comparison of sensitive methods. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;**726**:277-283.
- Dreosti IE. Bioactive ingredients: antioxidants and polyphenols in tea. *Nutr Rev* 1996;**54**:S51-S58.
- Dröge W, Schipper HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 2007;**6**:361-370.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002 **82**:47-95.
- Duarte J, Andriambelison 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, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001;**1**:117-24.
- Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Huang A, Frei B, Keaney JF Jr, Vita JA. Treatment of hypertension with ascorbic acid. *Lancet* 1999;**354**:2048-2049.
- Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, Gokce N, Swerdloff PL, Frei B, Vita JA. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;**104**:151-156.

- 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.
- Dufour C, Loonis M. Flavonoids and their oxidation products protect efficiently albumin-bound linoleic acid in a model of plasma oxidation. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1770**:958-965.
- Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM. The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 1998;**52**:733-736.
- Dzau V. The cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *J Hypertens* 2005;**23**:S9-S17
- Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. Pathophysiologic and therapeutic importance of tissue ACE: a consensus report. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;**16**:149-160.
- Elbaz M, Roul G, Alvès A, Andriantsitohaina R: Provinols, a polyphenolic extract of red wine inhibits in-stent neointimal growth in cholesterol-fed rabbit. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005;**98**:406.
- Elliott J. Alpha-adrenoceptors in equine digital veins: evidence for the presence of both alpha1 and alpha2-receptors mediating vasoconstriction. *J Vet Pharmacol Ther* 1997;**20**:308-317.
- Emura K, Yokomizo A, Toyoshi T, Moriwaki M. Effect of enzymatically modified isoquercitrin in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokio)* 2007;**1**:68-74.
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;**56**:545-553.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 1992;**13**:341-390.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;**11**:81-128.
- European Society of Hipertensión-European Society of Cardiology Guideliness Committee 3, ESH/ESC. *J Hypertens* 2003;**21**:1011-1053.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ; Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 2002;**360**:1347-1360.
- Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;**70**:81-96.
- Fan E, Zhang L, Jiang S, Bai Y. Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis. *J Med Food* 2008;**11**:610-614.

- Fernández-Larrea J, Pinent M, Badlé MC, Salvadó MJ, Blay M, Pujadas G, Ardevol A, Arola L. Alimentos ricos en procianidinas, alimentación funcional para prevenir la aparición de síndrome metabólico. *Rev Esp Obes* 2007; **5**:98-108.
- Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 1991; **32**:283-288.
- Ferrone RA, Antonaccio MJ. Prevention of the development of spontaneously hypertension in rats by captopril (SQ 14,225) *European Journal of Pharmacology* 1979; **60**:131-137.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**:247-254.
- Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita* 2007; **43**:375-381.
- FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* 2004; **134**:980S-988S.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993; **265**:H774-H778.
- Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen P, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; **26**:90-95.
- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 2007; **116**:2376-2382.
- Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992; **32**:22-27.
- Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* 1990; **16**:89-101.
- Fortuño A, Oliván S, Beloqui O, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens* 2004; **22**:2169-2175.
- Fregly MJ, Rowland NE. Bradykinin-induced dipsogenesis in captopril-treated rats. *Brain Res Bull* 1991; **26**:169-172.
- Fuhr U, Kummert AL. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions?. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**:365-373.
- Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; **12**:41-48.
- Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr* 1995; **61**:549-554.
- Furberg CD, Psaty BM, Meyer JV. Nifedipine; dose-related increase in patients with coronary heart disease. *Circulation* 1995; **62**:1326-1331.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; **288**:373-376.

- Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 1999;**19**:235-251.
- Fyhrquist F, Forslund T, Tikkanen I, Gronhagen-Riska C. Induction of angiotensin I-converting enzyme in rat lung with Captopril (SQ 14225). *Eur J Pharmacol* 1980;**67**:473-475.
- Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;**45**:1-23.
- Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelmann E, Dimmeler S, Heermeier K. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int* 1999;**55**:1450-1461.
- Garcia Del Rio C, Smellie WS, Morton JJ. des-Asp-angiotensin I: its identification in rat blood and confirmation as a substrate for converting enzyme. *Endocrinology* 1981;**108**:406-412.
- Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic effects of angiotensin II (3-8) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1993;**110**:159-162.
- Garrison EA, Santiago JA, Osei SY, Kadowitz PJ. Analysis of responses to angiotensin peptides in the hindquarters vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 1995;**268**:2418-2425.
- Gaynes RP, Szidon JP, Oparil S. In vivo and in vitro conversion of des-1-Asp angiotensin I to angiotensin III. *Biochem Pharmacol* 1978;**27**:2871-2877.
- Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJ, Johnson IT. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med* 1998;**25**:19-25.
- Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal* 2007;**19**:1807-1819.
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med* 2008;**44**:956-968.
- Gotti R, Furlanetto S, Pinzauti S, Cavrini V. Analysis of catechins in Theobroma cacao beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 2006;**1112**:345-352.
- Graciani A, Zuluaga-Zuluaga MC, Banegas JR, León-Muñoz LM, de la Cruz JJ, Rodríguez-Artalejo F. Cardiovascular mortality attributable to high blood pressure in Spanish population over 50. *Med Clin (Barc)* 2008;**131**:125-129.
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 2001;**41**:492-499.
- Granger JP, Alexander BT. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 2000;**168**:161-168.
- Grant JA, Scrutton MC. Novel alpha2-adrenoreceptors primarily responsible for inducing human platelet aggregation. *Nature* 1979;**277**:659-661.
- Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 2005;**81**:611-614.

- Greene EL, Paller MS. Xanthine oxidase produces O<sub>2</sub><sup>-</sup>. in posthypoxic injury of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 1992;**263**:F251-F255.
- Griendling K, Lassègue B, Alexander R. Angiotensin receptors and their therapeutic applications. *Annu Rev Pharmacol*.1996;36:281-306;
- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:2175-2183.
- Grubor-Lajsic G, Djordjević VB, Jovanovic-Galović A, Lecić N, Djordjević V, Spasić M. Selenium-dependent and selenium-non-dependent glutathione peroxidase in patients with Balkan endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998;**17**:321-324.
- Gu L, House SE, Wu X, Ou B, Prior R L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem* 2006;**54**:4057–4061.
- Guía Española de la hipertensión arterial. *Hipertensión* 2005;**22** Supl 2:3-8.
- Guiotto A, Ruzza P, Babizhayev MA, Calderan A. Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs. *Bioorg Med Chem* 2007;**15**:6158-6163.
- Gurbanov E, Shiliang X. The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;**30**:499-507.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984;**2**:1095.
- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990;**280**:1-8.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *Br J Pharmacol* 2004;**142**:231-255.
- Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* 2000;**33**:819-830.
- Hamet P. Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1995;**4**:1-7.
- Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Hydrogen peroxide and nitric oxide in plant defence: revealing potential targets for oxidative stress tolerance? *Biofactors* 2001;**15**:99-101.
- Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients? *Cleve Clin J Med* 2004;**71**:327-334.
- Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res* 2007;**75**:679-689.
- Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 2005;**46**:1276-1283.

- Henning SM, Aronson W, Niu Y, Conde F, Lee NH, Seeram NP, Lee RP, Lu J, Harris DM, Moro A, Hong J, Pak-Shan L, Barnard RJ, Ziaee HG, Csathy G, Go VL, Wang H, Heber D. Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *J Nutr* 2006;**136**:1839-1843.
- Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Lüscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 2006;**92**:119-120.
- Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;**279**:300-307.
- Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998;**16**:241-248.
- Hollenberg NK, Martinez G, McCullough M, Meinking T, Passan D, Preston M, Rivera A, Taplin D, Vicaria-Clement M. Aging, acculturation, salt intake, and hypertension in the Kuna of Panama. *Hypertension* 1997;**29**:171-176.
- Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1995;**62**:1276-1282.
- Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr* 2002;**76**:798-804.
- Huang Y, Chan NWK, Lau CW, Yao WQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)-epicatechin. *Biochim Biophys Acta*. 1999;**1427**:322-328.
- Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci* 1998;**63**:275-283.
- Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**:1577-1584.
- Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertens* 1993;**11**:1155-1159.
- Iams SG, Wexler BC. Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol. *J Lab Clin Med* 1979;**94**:608-616.
- Ichimura T, Yamanaka A, Ichiba T, Toyokawa T, Kamada Y, Tamamura T, Maruyama S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;**3**:718-721.
- Jameson M, Dai FX, Lüscher T, Skopec J, Diederich A, Diederich D. Endothelium-derived contracting factors in resistance arteries of young spontaneously hypertensive rats before development of overt hypertension. *Hypertension*. 1993;**21**:280-288.
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. Oxidative stress, inflammation, and diabetic vasculopathies: the role of alpha tocopherol therapy. *Free Radic Res* 2002;**36**:1331-1336.

- Jobin C, Bradham CA, Russo MP, Juma B, Narula AS, Brenner DA, Sartor RB. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* 1999;**163**:3474-3483.
- Kalin R, Righi A, Del Rosso A, Bagchi D, Generini S, Cerinic MM, Das DK. Activin, a grape seed-derived proanthocyanidin extract, reduces plasma levels of oxidative stress and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin) in systemic sclerosis. *Free Radic Res* 2002;**36**:819-825.
- Kaplan NM. What is the impact of systolic blood pressure lowering on preventing cardiovascular events?. *J Hum Hypertens* 2004;**18**:S1.
- Karsan A, Harlan JM. Modulation of endothelial cell apoptosis: mechanisms and pathophysiological roles. *J Atheroscler Thromb* 1996;**3**:75-80.
- Kealey, K. S.; Snyder, R. M.; Romanczyk, L. J.; Geyer, H. M.; Myers, M. E.; Withcare, E. J.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H. Cocoa components, edible products having enhanced polyphenol content, methods of making same and medical uses. 1998 Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 98/09533; Mars Inc., USA, 1998.
- Keaney JF Jr, Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis* 1995;**38**:129-54.
- Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *Am J Clin Nutr* 2005;**81**:298S-303S.
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension* 1999;**33**:1353-1358.
- Kim H, Keeney PG. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci* 1984;**49**:1090-1092.
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 1999;**58**:759-765.
- Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2004;**109**:2357-2362.
- Kobinger W, Pichler L. Investigation into different types of post- and presynaptic alpha-adrenoceptors at cardiovascular sites in rats. *Eur J Pharmacol.* 1980;**65**:393-402.
- Kofink M, Papagiannopoulos M, Galensa R. (-)-Catechin in cocoa and chocolate: occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules* 2007;**12**:1274-1288.
- Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Itakura H. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *Lancet* 1996;**348**:1514.
- Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 1997;**38**:151-63.

- Kost CKJr, Rominski BR, Herzer WA, Jackson EK, Tofovic SP. Persistent improvement of cardiovascular risk factors in spontaneously hypertensive rats following early short-term captopril treatment. *Clinical and Experimental Hypertension* 2000;**22**:127-143.
- Kozlov MV, Kushnireva EV, Urnysheva VV, Taran IuP, Shishkina LN. Influence of the characteristics of lipids on the regulation of biochemical processes in animal liver and blood. *Biofizika* 2007;**52**:693-698.
- Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;**200**:248-254.
- Kühnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;**24**:117-191.
- Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Radic Res Commun* 1993;**19**:59-66.
- Lahouel M, Amedah S, Zellagui A. et al. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Therapie* 2006;**61**:347-355.
- Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002;**40**:511-515.
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003;**111**:1201-1209.
- Landmesser U, Drexler H. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide. *J Hypertens Suppl* 2006;**24**:39-43.
- Lands et al., 1967 Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci* 1967;**6**:2241-2249.
- Langer SZ, Shepperson NB. Prejunctional modulation of noradrenaline release by alpha 2-adrenoceptors: physiological and pharmacological implications in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;**4**:S35-S40.
- Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 1974;**23**:1793-1800.
- Langer SZ. Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol Rev* 1980;**32**:337-362.
- Lazarus SA, Hammerstone JF, Schmitz HH. Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet* 1999;**354**:1825.
- Lee, K.W; Kim, Y.J.; Lee, H.J; Lee, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxidant capacity than teas and red wines. *J. Agric. Food Chem* 2003;**51**:7292-7295.
- Levine RL, Berlett BS, Moskowitz J, Mosoni L, Stadtman ER. Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* 1999;**107**:323-332.

- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002;**360**:1903-1913.
- Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2000;**45**:1035-1045.
- Lijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahara K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation* 2002;**105**:2404-2410.
- Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 2005;**97**:967-974.
- López-Miranda V, Civantos B, Blasco R, Fernández R, Aleixandre MA. Parathyroid hormone and calcitriol in the hypertension caused by dietary calcium deficiency in rats. *J Vasc Res* 1998;**35**:397-404.
- Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga CG. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**276**:945-951.
- Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**:583-588.
- Lugnier C, Schini VB. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1990;**39**:75-84.
- Lüscher TF, Richard V, Tschudi M, Yang ZH, Boulanger C. Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1990;**15**:519-527.
- Macchia B, Balsamo A, Breschi MC, Lapucci A, Lucacchini A, Macchia F, Manera C, Martinelli A, Martini C, Martinotti E, et al. Conformational effects on the activity of drugs. 13. A revision of previously proposed models for the activation of alpha- and beta-adrenergic receptors. *J Med Chem* 1992;**35**:1009-1018.
- Mackenzie GG, Carrasquedo F, Delfino JM, Keen CL, Fraga CG, Oteiza PI. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J* 2004;**18**:167-169.
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; **335**:765-774.
- Malinski T, Kapturczak M, Dayharsh J, Bohr D. Nitric oxide synthase activity in genetic hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;**194**:654-658.
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr* 2003;**57**:235-242.

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;**79**:727-747.
- Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Struijker Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De Caterina R, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Kjeldsen SE, Erdine S, Narkiewicz K, Kiowski W, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Cifkova R, Dominiczak A, Fagard R, Heagerty AM, Laurent S, Lindholm LH, Mancia G, Manolis A, Nilsson PM, Redon J, Schmieder RE, Struijker-Boudier HA, Viigimaa M, Filippatos G, Adamopoulos S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Kiowski W, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van Zwieten P, Viigimaa M, Waeber B, Williams B, Zamorano JL, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology. 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). *Eur Heart J* 2007;**28**:1462-1536.
- Mancia G. Optimal control of blood pressure in patients with diabetes reduces the incidence of macro and microvascular events. *J Hypertens* 2007;**25**:S7-S12.
- Marceau F, Larrivée JF, Saint-Jacques E, Bachvarov DR. The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;**75**:725-730.
- Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995;**30**:1-26.
- Marín-García J, Goldenthal MJ. The mitochondrial organelle and the heart. *Rev Esp Cardiol* 2002;**55**:1293-1310.
- Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, López-Sabater MC, de la Torre R, Farré M; SOLOS Investigators. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2004;**43**:140-147.
- Martin S, Andriantsitohaina R. Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2002;**51**:304-15.
- Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000;**59**:865-870.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutr Hosp* 2002;**17**:271-278.
- Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J Nutr* 2002;**132**:3663-3667.

- Matuschek MC, Hendriks WH, McGhie TK, Reynolds GW. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J Nutr Biochem* 2006;**17**:31-36.
- Mazza G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995;**35**:341-71.
- McCarty R, Kvetnansky R, Lke CR, Thoa NB, Kopin IJ. Sympatho-adrenal responses of spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats to acute and repeated immobilization. *Federation Proceedings* 1978;**37**:735.
- McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ. New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 2005;**90**:469-475
- McKenna E, Smith JS, Coll KE, Mazack EK, Mayer EJ, Antanavage J, Wiedmann RT, Johnson RG Jr. Dissociation of phospholamban regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>ATPase by quercetin. *J Biol Chem* 1996;**271**:24517-24525.
- McKim SE, Konno A, Gäbele E, Uesugi T, Froh M, Sies H, Thurman RG, Arteel GE. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 2002;**406**:40-46.
- Meissner C. Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process?. *Z Gerontol Geriatr* 2007;**40**:32533.
- Messerli FH, Williams B, Ritz E. Essential hypertension. *Lancet*. 2007 Aug 18;**370**(9587):591-603.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:673-751.
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2006;**78**:2960-2966.
- Miguel M, Manso MA, Aleixandre MA, López-Fandiño R. Angiotensin converting enzyme activity in plasma and tissues of spontaneously hypertensive rats after short- and long-term intake of an egg white hydrolysate. *Mol Nutr Food Res* 2007;**51**:555-563.
- Miguel M, Muguerra B, Sánchez E, Delgado MA, Recio I, Ramos M, Aleixandre, MA. Changes in arterial blood pressure caused in hypertensive rats by long-term intake of milk fermented by *Enterococcus faecalis* cect 5728. *British J Nutr* 2005;**93**:36-43.
- Miller AA, Drummond GR, Sobey CG. Reactive oxygen species in the cerebral circulation: are they all bad?. *Antioxid Redox Signal* 2006;**8**:1113-1120.
- Minami Y, Yokoyama K, Bando N, Kawai Y, Terao J. Occurrence of singlet oxygen oxygenation of oleic acid and linoleic acid in the skin of live mice. *Free Radic Res* 2008;**42**:197-204.
- Mizutani K, Ikeda K, Kawai I, Yamori Y. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2000;**46**:78-83.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;**43**:109-142.
- Moncada S, Vane JR. Prostacyclin and its clinical applications. *Ann Clin Res* 1984;**16**:241-252.
- Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;**27**:362-366.
- Moore KP, Darley-Usmar V, Morrow J, Roberts LJ 2nd. Formation of F2-isoprostanes during oxidation of human low-density lipoprotein and plasma by peroxynitrite. *Circ Res* 1995;**77**:335-341.
- Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C. Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors* 2000;**12**:169-174.
- Mousavi Y, Adlercreutz H. Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;**41**:615-619.
- Mukai Y, Sato S. Polyphenol-containing azuki bean (*Vigna angularis*) extract attenuates blood pressure elevation and modulates nitric oxide synthase and caveolin-1 expressions in rats with hypertension. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009.
- Mulvany MJ. Mechanical and other factors involved in vascular injury related to hypertension. *Blood Press Suppl* 1994;**1**:11-17.
- Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008;**40**:180-196.
- Nam KA, Kim S, Heo YH, Lee SK. Resveratrol analog, 3,5,2',4'-tetramethoxy-trans-stilbene, potentiates the inhibition of cell growth and induces apoptosis in human cancer cells. *Arch Pharm Res* 2001;**24**:441-445.
- 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.
- Ndiaye M, Chataigneau M, Lobysheva I, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenol-induced, endothelium-dependent NO-mediated relaxation is due to the redox-sensitive PI3-kinase/Akt-dependent phosphorylation of endothelial NO-synthase in the isolated porcine coronary artery. *FASEB J* 2005;**19**:455-457.
- Negishi H, Xu JW, Ikeda K. et al. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2004;**1**:38-42.
- Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr* 2003;**42**:29-42.
- Ni A, Chao L, Chao J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 1998;**273**:2784-2791.

- Nicolson GL. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem* 2007;**100**:1352-1369.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;**74**:418-425.
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reduced plasma concentrations of nitrogen oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 1997;**30**:405-408.
- Nose K. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull* 2000;**23**:897-903.
- Novo S, Lunetta M, Evola S, Novo G. Role of ARBs in the blood hypertension therapy and prevention of cardiovascular events. *Curr Drug Targets* 2009;**10**:20-25.
- Nyström T. The free-radical hypothesis of aging goes prokaryotic. *Cell Mol Life Sci* 2003;**60**:1333-1341.
- Ogawa R, Kishi R, Mihara K, Takahashi H, Takagi A, Matsumoto N, Masuhara K, Nakazawa K, Miyake F, Kobayashi S, Echizen H. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of a class IC antiarrhythmic, pilsicainide, in patients with cardiac arrhythmias. *J Clin Pharmacol* 2006;**46**:59-68.
- Ojeda D, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tortoriello J, Alvarez L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J Ethnopharmacol* 2010;**127**:7-10.
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;**27**:282-293.
- Olszanecki R, Gebaska A, Kozlovski VI, Gryglewski RJ. Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 2002;**53**:571-584.
- Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977;**196**:441-444.
- ONTARGET Investigators, Yusuf S, Teo KK, Pogue J et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008;**358**:1547-1559.
- Orallo F, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;**370**:452-463.
- Orallo F, Alvarez E, Camiña M, Leiro JM, Gómez E, Fernández P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 2002;**61**:294-302.
- Orallo F, Camiña M, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C. Implication of cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition in the vasorelaxant activity of the citrus-fruits flavonoid (+/-)-naringenin. *Planta Med* 2005;**71**:99-107.

- Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem* 2003;**14**:104-110.
- Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res* 2001;**34**:93-99.
- Osakabe N, Natsume M, Adachi T, Yamagishi M, Hirano R, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb* 2000;**7**:164-168.
- Osakabe N, Sanbongi C, Yamagishi M, Takizawa T, Osawa T. Effects of polyphenol substances derived from *Theobroma cacao* on gastric mucosal lesion induced by ethanol. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;**62**:1535-1538.
- Osakabe N, Yamagishi M, Natsume M, Yasuda A, Osawa T. Ingestion of proanthocyanidins derived from cacao inhibits diabetes-induced cataract formation in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;**229**:33-39.
- Osakabe N, Yamagishi M. Procyanidins in *Theobroma cacao* Reduce Plasma Cholesterol Levels in High Cholesterol-Fed Rats. *J Clin Biochem Nutr* 2009;**45**:131-136.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, Terao J, Kondo K. Catechins and their oligomers linked by C4 --> C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;**227**:51-56.
- Ottaviani JI, Actis-Goretta L, Villordo JJ, Fraga CG. Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie* 2006;**88**:359-365.
- Ottaviani JI, Carrasquedo F, Keen CL, Lazarus SA, Schmitz HH, Fraga CG. Influence of flavan-3-ols and procyanidins on UVC-mediated formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in isolated DNA. *Arch Biochem Biophys* 2002;**406**:203-208.
- Ou HC, Chou FP, Sheen HM, Lin TM, Yang CH, Huey-Herng Sheu W. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin Chim Acta* 2006;**364**:196-204.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007;**96**:2181-2196.
- Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991;**37**:166-180.
- Pacifici RE, Kono Y, Davies KJ. Hydrophobicity as the signal for selective degradation of hydroxyl radical-modified hemoglobin by the multicatalytic proteinase complex, proteasome. *J Biol Chem* 1993;**268**:15405-15411.
- Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radic Biol Med* 1999;**27**:704-724.

- Palmer RM, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**158**:348-352.
- Pan MH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Zhu NQ, Ho CT, Lin JK. Induction of apoptosis by the oolong tea polyphenol theasinensin A through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in human U937 cells. *J Agric Food Chem* 2000;**48**:6337-6346.
- Pannala AS, Rice-Evans CA, Halliwell B, Singh S. Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**232**:164-168.
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 1993;**87**:1468-1474.
- Parati G, Mancia G. Blood pressure variability as a risk factor. *Blood pressure monitoring* 2001;**6**:341-347.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008;**31**:170-180.
- Pasamar MA, Fritz J, Arcos FJ, Ramon D, Castilla Y, Cienfuegos-Jovellanos E. 2007. Method for obtaining polyphenol-rich cocoa powder with a low fat content and cocoa thus obtained. EP2036601A1.
- Pasamar MA, Fritz J, Arcos FJ, Ramon D, Castilla Y, Cienfuegos-Jovellanos E. 2007. Method for obtaining polyphenol-rich cocoa powder with a low fat content and cocoa thus obtained. WO2007/096449.
- Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK, Block ER. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol* 1998;**275**:1061-1068.
- Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Gosselin R, Schmitz HH, Keen CL. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res* 2002;**106**:191-197.
- Pelletier S, Kundrat S, Hasler CM. Effects of a functional foods nutrition education program with cardiac rehabilitation patients. *J Cardiopulm Rehabil* 2003;**23**:334-340.
- Peng N, Clark JT, Prasain J, Kim H, White CR, Wyss JM. Antihypertensive and cognitive effects of grape polyphenols in estrogen-depleted, female, spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;**3**:771-775.
- Pepine CJ. The effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial dysfunction: potential role in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1998;**82**:23-27.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res* 2006;**40**:1054-1065.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R, Santos-Buelga C, Osuna A. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. *Pharmacol Rep* 2009;**61**:67-75.
- Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid

- quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**302**:66-72.
- Pickering TG, Hall JE, Appel LJ, Falkner BE, Graves JW, Hill MN, Jones DH, Kurtz T, Sheps SG, Roccella EJ; Recommendations for blood pressure measurement in humans: an AHA scientific statement from the Council on High Blood Pressure Research Professional and Public Education Subcommittee. Council on High Blood Pressure Research Professional and Public Education Subcommittee, American Heart Association. *J Clin Hypertens* 2005;**7**:102-109.
- Pina MC, Silva AB, Muguerza B, Rodrigo D, Martínez A. Synergistic effect of high hydrostatic pressure and natural antimicrobials on inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a liquid whole egg and skim milk mixed beverage. *Foodborne Pathog Dis* 2009;**6**:649-656.
- Pina MC, Silva AB, Rodrigo D, Martínez A. Synergistic effect of pulsed electric fields and CocoonOX 12% in the inactivation kinetics of *Bacillus cereus* in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. *Int J Food Microbiol* 2009;**130**:196-204.
- Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett* 1999 **26**;447:287-291.
- Piskula MK. Factors affecting flavonoids absorption. *Biofactors* 2000;**12**:175-180.
- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;**292**:E1378-E1387.
- Pringle E, Philips C, Thijs L, Davidson C, Staessen JA, de Leeuw PW, Jaaskivi M, Nachev C, Parati G, O'Brien ET, Tuomilehto J, Webster J, Bulpitt CJ, Fagard RH. Systolic blood pressure variability as a risk factor for stroke and cardiovascular mortality in the elderly hypertensive population. *J Hypertens* 2003;**21**:2251-2257.
- Psaty BM, Hechbert SR, Koepsell TD, Siscovick DS, Lemaitre R, Smith NL, Wahl PW, Wagner EH, Furberg CD. The risk of myocardial infarction associated with antihypertensive drug therapy. *JAMA* 1995;**274**:620-625.
- Rader DJ. Inflammatory markers of coronary risk. *N Engl J Med* 2000;**343**:1179-1182.
- Ramon D, Martorell P, Forment J.V, Moulay L, Cienfuegos E, Muguerza B, Pasamar M, Laghi S, Vilanova O, Castilla Y, Llanos R, Montón F. The use of the worm *Caenorhabditis elegans* as a model to investigate functional ingredients. *In Vitro Cel. De. Biol Anim* 2008;**44**: S22-S23.
- 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.
- Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 2005;**109**:217-226.

- Raza H, John A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates oxidative stress in PC12 cell compartments. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;**207**:212-220.
- Re RN. Mechanisms of disease: local renin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2004;**1**:42-47.
- Rechner AR, Kroner C. Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb Res* 2005;**116**:327-334.
- Reglamento (CE) N° 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.
- Reid JL. Central alpha 2 receptors and the regulation of blood pressure in humans. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;**7**:S45-S50.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;**161**:488-503.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr* 2000;**130**:2109S-2114S.
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 2000;**72**:30-35.
- Rhodin JA. Microscopic anatomy of the pulmonary vascular bed in the cat lung. *Microvasc Res* 1978;**15**: 169-193.
- Riccioni G. Carotenoids and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2009;**11**:434-439.
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem* 2001;**8**:797-807.
- Rice-Evans C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochem Soc Symp* 1995;**61**:103-116.
- Rice-Evans CA, Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 1996;**24**:790-795.
- Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* 1999;**53**:22-26.
- Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation* 2004;**109**:6-19.
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997;**337**:356.
- Ridker PM. Intrinsic fibrinolytic capacity and systemic inflammation: novel risk factors for arterial thrombotic disease. *Haemostasis* 1997;**27**:2-11.
- Ríos JL, Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MA, Muguerra B, Ramón D. Antioxidant activity of three polyphenol-enriched cocoa products obtained on an industrial scale. *Planta Med* 2009;**75**:1064.

- Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M Long-term resveratrol administration reduced metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol* 2009;**77**:1053-1063.
- Romero M, Jiménez R, Sánchez M, López-Sepúlveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2009;**202**:58-67.
- Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;**340**:115-126.
- Roudebush P, Davenport DJ, Novotny BJ. The use of nutraceuticals in cancer therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004;**34**:249-269.
- Ruf JC. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp Clin Res* 1999;**25**:125-131.
- Sagrada A, Fargeas MJ, Bueno L. Involvement of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the postlaparotomy intestinal motor disturbances in the rat. *Gut* 1987;**28**:955-959.
- Saicic ZS, Pajovic SB, Korac B, Spasic MB, Martinovic JV, Petrovic VM. Glutathione-dependent antioxidant enzyme activities and glutathione content in the rat brain at different stages of oestrous cycle. *Physiol Res* 1998;**47**:61-67.
- Salonen RM, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Lakka HM, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE; Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention Study. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation* 2003;**107**:947-953.
- Sánchez A, Vidal MJ, Martínez Sierra R, Saiz J. Ontogeny of renal alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the spontaneously hypertensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986;**237**:972-979.
- Sanz-Rosa D, Oubiña MP, Cediél E, de Las Heras N, Vegazo O, Jiménez J, Lahera V, Cachafeiro V. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;**288**:111-115.
- Scalbert A, Déprez S, Mila I, Albrecht AM, Huneau JF, Rabot S. Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *Biofactors* 2000;**13**:115-120.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;**130**:2073S-2085S.
- Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kühn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem* 2001;**382**:1687-1696.
- Schiffirin EL. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med* 2002;**113**:409-418.

- Schmitz JM, Graham RM, Sagalowsky A, Pettinger WA. Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;**219**:400-406.
- Schramm DD, Wang JF, Holt RR, Ensunsa JL, Gonsalves JL, Lazarus SA, Schmitz HH, German JB, Keen CL. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2001;**73**:36-40.
- 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 U S A* 2006;**103**:1024-1029.
- Schroeter H, Holt RR, Orozco TJ, Schmitz HH, Keen CL. Nutrition: milk and absorption of dietary flavanols. *Nature* 2003;**426**:787-788.
- Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2008;**10**:1115-1126.
- Serafini M, Bugianesi R, Mainani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 2003;**424**:1013.
- Sesink AL, O'Leary KA, Hollman PC. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr* 2001;**131**:1938-1941.
- 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.
- Sexton JM, Britton SL, Beierwaltes WH, Fiksen-Olsen MJ, Romero JC. Formation of angiotensin III from [des-Asp<sup>1</sup>]angiotensin I in the mesenteric vasculature. *Am J Physiol* 1979;**237**:H218-H223.
- Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000;**319**:428-436.
- Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000;**32**:307-326.
- Shelnutt SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJ, Badger TM. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr* 2002;**76**:588-594.
- Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1991;**8**:211-218.
- Sies H, Schewe T, Heiss C, Kelm M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am J Clin Nutr* 2005;**81**:304S-312S.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;**215**:213-219.
- Simón A, Castro A, Kaski JC. Progress in the knowledge on endothelial dysfunction and its application in clinical practice. *Rev Esp Cardiol* 2001;**54**:211-217.
- Singh IN, Sullivan PG, Hall ED. Peroxynitrite-mediated oxidative damage to brain mitochondria: Protective effects of peroxynitrite scavengers. *J Neurosci Res* 2007;**85**:2216-2223.

- Singleton VL. Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv Food Res* 1981;**27**:149-242.
- Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen, ML. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol* 2001;**52**:745-754.
- Smith TL, Hutchings PM. Central hemodynamics in the development stage of spontaneous hypertension in the unanaesthetized rat. *Hypertension* 1979;**1**:508-517.
- Sohal RS, Arnold LA, Sohal BH. Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radic Biol Med* 1990;**9**:495-500.
- Somoza B, González MC, González JM, Abderrahim F, Arribas SM, Fernández-Alfonso MS. Modulatory role of the adventitia on noradrenaline and angiotensin II responses. Role of endothelium and AT2 receptors. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:478-486.
- Song L, Healy DP. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 1999;**33**:746-752.
- Srinivasan VS. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J Nutr* 2001;**131**:1349S-1350S.
- St Lezin E, Simonet L, Pravenec M, Kurtz TW. Hypertensive strains and normotensive 'control' strains. How closely are they related? *Hypertension* 1992;**19**:419-424.
- Stadtman ER. Role of oxidized amino acids in protein breakdown and stability. *Methods Enzymol* 1995;**258**:379-393.
- Starke K. Alpha-adrenoceptor subclassification. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1981;**88**:199-236.
- Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;**100**:1050-1055.
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;**272**:20963-20966.
- Strazzullo P, Puig JG. Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk?. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;**17**:409-414.
- Suzuki H, Sweil A, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 1995;**25**:1083-1089.
- Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, Kayanoki Y, Tatsumi H, Taniguchi N. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. *J Biochem* 1997;**122**:1260-1264.
- Swales JD. Economics and the treatment of hipertensión. *J Hypertens* 1995;**13**:1357-1361.

- Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, et al. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 1992;**40**:409-419.
- Szende B, Tyihák E, Király-Véghely Z. Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures. *Exp Mol Med* 2000;**32**:88-92.
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**44**:200-208.
- 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.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;**38**:S11-S14.
- Takai S, Jin D, Sakaguchi M, Miyazaki M. Significant target organs for hypertension and cardiac hypertrophy by angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Hypertens Res* 2004;**27**:213-219.
- Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Lamaison JL, Rémésy C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr* 2003;**133**:4178-4182.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Características farmacológicas de los ARA-II. ¿Son todos iguales?. *Rev Esp Cardiol* 2006;**6**:10-24.
- Tamargo J. Antagonistas de los receptores de la angiotensina II. *Med Clin (Barc)* 2000;**114**:6-12.
- Tanito M, Nakamura H, Kwon YW, Teratani A, Masutani H, Shioji K, Kishimoto C, Ohira A, Horie R, Yodoi J. Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal* 2004;**6**:89-97.
- Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;**42**:1075-1081.
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:4690-4694.
- Tedgui A, Mallat Z. Apoptosis, a major determinant of atherothrombosis. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2003;**96**:671-675.
- Terashvili M, Pratt PF, Gebremedhin D, Narayanan J, Harder DR. Reactive oxygen species cerebral autoregulation in health and disease. *Pediatr Clin North Am* 2006;**53**:1029-1037.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;**267**:1456-1462.
- Timmermans PB, van Zwieten PA. alpha 2 adrenoceptors: classification, localization, mechanisms, and targets for drugs. *J Med Chem* 1982;**25**:1389-1401

- Timmermans PB, van Zwieten PA. Mini-review. The postsynaptic alpha 2-adrenoreceptor. *J Auton Pharmacol* 1981;**1**:171-183.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993;**45**:205-251.
- Tinhofer I, Bernhard D, Senfter M, Anether G, Loeffler M, Kroemer G, Kofler R, Csordas A, Greil R. Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *FASEB J* 2001;**15**:1613-1615.
- Tom B, de Vries R, Saxena PR, Danser AH. Negative inotropic effect of bradykinin in porcine isolated atrial trabeculae: role of nitric oxide. *J Hypertens* 2001;**19**:1289-1293.
- Tomas-Barberan FA, Cienfuegos-Jovellanos E, Marín A, Muguerza B, Gil-Izquierdo A, Cerda B, Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Ibarra A, Pasamar MA, Ramón D, Espín JC. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J Agric Food Chem* 2007;**55**:3926-3935.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species and hypertension: a complex association. *Antioxid Redox Signal* 2008;**10**:1041-1044.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004;**122**:339-352.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:639-672.
- Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol* 2005;**90**:449-455.
- Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003;**1**:91-106.
- Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;**12**:165-174.
- Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:1121-1127.
- Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981;**48**:309-311.
- Tulunoglu O, Alacam A, Bastug M, Yavuzer S. Superoxide dismutase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in children. *J Clin Pediatr Dent* 1998;**22**:341-345.
- Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2002;**23**:177-183.

- Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry* 2002;**67**:281-292.
- Ulker S, McMaster D, McKeown PP, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc Res* 2003;**59**:488-500.
- Urata H, Nishimura H, Ganten D, Arakawa K. Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. *Blood Press Suppl* 1996;**2**:22-28.
- Ursini F, Tubaro F, Rong J, Sevanian A. Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. *Nutr Rev* 1999;**57**:241-249.
- Ursini F, Zamburlini A, Cazzolato G, Maiorino M, Bon GB, Sevanian A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 1998;**25**:250-252.
- Valet P, Saulnier-Blache JS. Metabolic and trophic role of catecholamines in the development of white adipose tissue. *Ann Endocrinol* 1999;**60**:167-174.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;**39**:44-84.
- van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WM. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agric Food Chem* 2001;**49**:3606-3613.
- van het Hof KH, Wiseman SA, Yang CS, Tijburg LB. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;**220**:203-209.
- Van Zwieten PA, Timmermans PB, Van Brummelen P. Role of alpha adrenoceptors in hypertension and in antihypertensive drug treatment. *Am J Med* 1984;**77**:17-25.
- van Zwieten PA. Interaction between alpha- and beta-adrenoceptor-mediated cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;**8**:S21-S8.
- Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 1995;**18**:87-98.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;**196**:193-222.
- Vieira O, Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Basile JP, Laranjinha J, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 1998;**123**:565-573.
- Villar IC, Jiménez R, Galisteo M, Garcia-Saura MF, Zarzuelo A, Duarte J. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Planta Med* 2002;**9**:847-850.
- Vinson JA, Proch J, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J Agric Food Chem* 1999;**47**:4821-4824.
- 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.

- Viridis A, Neves MF, Amiri F, Touyz RM, Schiffrin EL. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004;**22**:535-542.
- Wagner H, Elbl G. ACE-inhibitory procyanidins from *Lespedeza capitata*. *Planta Med* 1992;**58**:297.
- Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 2001;**74**:596-602.
- Wang JF, Schramm DD, Holt RR, Ensunsa JL, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J Nutr* 2000;**130**:2115S-2119S.
- Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 1998;**50**:335-356.
- Ward NC, Hodgson JM, Croft KD, Burke V, Beilin LJ, Puddey IB. The combination of vitamin C and grape-seed polyphenols increases blood pressure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens* 2005;**23**:427-434.
- Wassink AM, Olijhoek JK, Visseren FL. The metabolic syndrome: metabolic changes with vascular consequences. *Eur J Clin Invest*. 2007 Jan;**37**(1):8-17.
- Waterhouse AL, Shirley JR, Donovan JL. Antioxidants in chocolate. *Lancet* 1996;**348**:834.
- Weaver CM, Liebman M. Biomarkers of bone health appropriate for evaluating functional foods designed to reduce risk of osteoporosis. *Br J Nutr* 2002;**88**:S225-S232.
- Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochim Biophys Acta* 1990;**1036**:88-94.
- Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand* 2003;**179**:217-223.
- Williams MJ, Sutherland WH, Whelan AP, McCormick MP, de Jong SA. Acute effect of drinking red and white wines on circulating levels of inflammation-sensitive molecules in men with coronary artery disease. *Metabolism* 2004;**53**:318-323.
- Williams TA, Hooper NM, Barnes K, Kenny AJ, Turner AJ. Immunological studies on the endothelial and testicular forms of angiotensin converting enzyme. *Biochem Soc Trans* 1992;**20**:281S.
- Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med* 2008;**45**:549-561.
- Wiseman SA, Balentine DA, Frei B. Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997;**37**:705-718.
- Wolf G, Butzmann U, Wenzel UO. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology. *Nephron Physiol* 2003;**93**:3-13.
- Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:1430-1442.

- Woodman OL, Missen MA, Boujaoude M. Daidzein and 17 beta-estradiol enhance nitric oxide synthase activity associated with an increase in calmodulin and a decrease in caveolin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;**44**:155-163.
- Woodman OL, Vatner SF. Coronary vasoconstriction mediated by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in conscious dogs. *Am J Physiol* 1987;**253**:388-393.
- Wright GL, Rankin GO. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol* 1982;**243**:365-370.
- Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2001;**49**:501-506.
- Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002;**105**:387-392.
- Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 2001;**19**:741-748.
- Xu YC, Leung SWS, Yeung DKY, Hu LH, Chen GH, Che CM, Man RYK. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 2007;**68**:1179-1188.
- Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Nakamura H, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis in vitro, and in vivo mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett* 2002;**185**:123-130.
- Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, Okazaki K, Furukawa F, Imazawa T, Nishikawa A, Hirose M. Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Lett* 2003;**191**:49-57.
- Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008;**1**:95-98.
- Yang B, Arai K, Kusu F. Determination of catechins in human urine subsequent to tea ingestion by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* 2000;**283**:77-82.
- Yang HY, Yang SC, Chen JR, Tzeng YH, Han BC. Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2004;**92**:507-512.
- Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takeyama H, Itani T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001;**128**:27-33.

- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandström B, Dragsted LO. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 1999;**69**:87-94.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22(phox) gene in hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2005;**7**:1327-1336.
- Zenebe W, Pechánová O, Andriantsitohaina R. Red wine polyphenols induce vasorelaxation by increased nitric oxide bioactivity. *Physiol Res* 2003;**52**:425-432.
- Zhu QY, Schramm DD, Gross HB, Holt RR, Kim SH, Yamaguchi T, Kwik-Urbe CL, Keen CL. Influence of cocoa flavanols and procyanidins on free radical-induced human erythrocyte hemolysis. *Clin Dev Immunol* 2005;**12**:27-34.
- Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiol Rev* 1999;**79**:1227-1282.
- Zimniak P. Detoxification reactions: relevance to aging. *Ageing Res Rev* 2008;**7**:281-300.

