

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

Efectos vasculares de la quercetina y la catequina: interacciones y papel de los procesos de conjugación y desconjugación metabólica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Menéndez Soriano

Directores

Francisco Pérez Vizcaíno
Laura Moreno Gutiérrez

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTOS VASCULARES DE LA QUERCETINA Y LA
CATEQUINA: INTERACCIONES Y PAPEL DE LOS PROCESOS
DE CONJUGACIÓN Y DESCONJUGACIÓN METABÓLICA**

TESIS DOCTORAL

Carmen Menéndez Soriano

DIRECTORES

Prof. Francisco Pérez Vizcaíno

Dra. Laura Moreno Gutiérrez

Madrid, 2012

A mis padres, quienes siempre me han inculcado el amor por el conocimiento, a los que adoro y debo todo.

A mi padrino, *el tío Carlos*, su pasión por esta vida sigue siendo para mí, una gran motivación.

A mis hermanas que junto con toda mi familia y mis amigos del alma, son mi gran apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Resulta una tarea muy complicada, al menos para mí, escribir estos agradecimientos sin miedo a pasar etapas y personas por alto. Sin duda, han sido los cuatro años más intensos de mi vida, hasta ahora.

En primer lugar, agradezco a mi director el Profesor Pérez Vizcaíno, el confiar en mí, para realizar la tesis doctoral en su grupo. Aún recuerdo la primera vez que llamé a su puerta interesándome por su proyecto, y que aunque estaba muy ocupado para prestarme mucho tiempo, me convenció de que era un gran jefe cuando me mostró con mucho orgullo la foto de su grupo contándome que la mayoría de sus estudiantes estaban de estancia por Europa. Paco, te agradezco toda tu paciencia y comprensión durante estos años. Siempre ha sido y será para mí un privilegio que seas mi director de tesis.

A mi co-directora, la Dra. Moreno Gutiérrez. Como agradecer a Laura toda su entrega, ella que sí que ha tenido que aguantar mi mal carácter. Laura sabe que su vuelta de Londres fue un gran aliciente para continuar mi tesis y que fue un gran privilegio que me invitara a trabajar en sus nuevos proyectos. Muchas gracias Laura.

Al Profesor Cogolludo Torralba, que aunque no es oficialmente co-director de mi tesis, fue quien me enseñó y guió en mis primeros pasos de formación investigadora. Muchas gracias Ángel.

A todos mis compañeros durante estos años; al cuasi-doctor Moral Sanz, ¿qué decirle a Javito que tanto me ha cuidado, apoyado y sabiamente aconsejado en estos años? Muchas gracias Javi por ser el mejor compañero del mundo. Solo espero haber sabido estar a la altura. A la Dra. Frazziano, no sé si le he perdonado todavía que me abandonara. Muchas gracias Gio por tu apoyo en los comienzos y siempre, aunque era mucho mejor cuando íbamos de cañas. Estoy segura que algún día montaremos el B&B aunque sea con dos sedes. A la Lda. Lucia Escolano, muchas gracias Lucia por tu apoyo en los momentos difíciles, por las excursiones a Ikea, y por todo lo que me

enseñastes. Al Ldo. Enrique Moreno. Sí Quique, te tocó aguantar a la sevillana rancia, que le vamos a hacer, algo he mejorado, ¿no? Muchas gracias Quique por toda tu ayuda en estos años, y sobre todo por tu apoyo en la ardua tarea de terminar la tesis. A Bianca Barreira mi más sincero agradecimiento y toda mi admiración por su buen hacer. Si se pudiera conceder el título de licenciado por “scientiam causa” yo sin duda lo pediría para ella. Pero por encima de todo, muchas gracias Bianca por todo tu cariño y comprensión en estos años. A la Lda. Ángela Román, quien también me abandonó muy rápido, quedándome sin amiga de museos a la salida del labo y de la que aprendí mucho en su corta estancia en el laboratorio. Muchas gracias Ángela. Al Ldo. Daniel Morales a quien no he tenido la oportunidad de conocer mucho, pero que creo que es un gran ejemplo de que contra todo pronóstico sigue habiendo gente con muchas ganas de trabajar en la investigación, algo que muchos terminamos por perder y que algo tiene que significar. Mucha suerte Dani.

A los numerosos visitantes, especialmente a los compañeros que han traído aire fresco al labo y que siempre me han alegrado el día a día. Al Dr. Romero, Miguelito, creo que deberías estar orgulloso porque aunque me costó mucho seguir tus consejos, creo que estoy aprendiendo. A Robín Scheepers y Leoni Brinks por hacer mucho más divertidos los meses que estuvisteis por aquí. A Raquel muchas gracias por estar siempre pendiente de nuestro bienestar y alegrarnos el día a día.

Al Profesor Antonio Ayala, el Dr. Sandro Argüelles, la Dra. Carmen Hernández y la Dra. M^a Jose Delgado, del departamento de Bioquímica de la facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, en donde realicé mi beca de colaboración, y a los que quiero dar las gracias de todo corazón porque siempre me animaron y me apoyaron a seguir mis inquietudes.

Que nunca he sido una estudiante ejemplar, no es un secreto. De hecho, siempre he dicho que nunca hubiera terminado mi carrera en el plazo estipulado sino hubiera sido por los maravillosos compañeros que encontré en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Algo más he tenido que estudiar desde que separamos nuestras

carreras, pero nunca ha vuelto a ser tan divertido. Muchas gracias amigos, sois también participes de esto.

Al grupo del Profesor Juan Duarte, en especial a la Profesora Rosario Jiménez y a la cuasi-doctora Pilar Galindo, les agradezco la oportunidad de realizar esta tesis en colaboración. Pilar muchas gracias por los buenos momentos en Madrid, aún tenemos pendiente Granada.

Al grupo de Profesor Celestino Santos Buelga, en el especial a las Dras Montserrat Dueñas y Susana González Manzano, también participes esenciales de esta tesis. Muchas gracias por todo, por vuestra paciencia proveyendo los metabolitos, y por los buenos ratitos en el congreso de Sitges.

Al grupo de la Dra. Carmen Valenzuela, con quienes aunque no he tenido la oportunidad de trabajar muy de cerca, he tenido el placer de compartir muchas reuniones. Muchas gracias por esos buenos momentos.

Algo que agradezco especialmente al Profesor Pérez Vizcaíno, ha sido su generosidad al permitirme realizar dos estancias fuera de España, complaciendo así mi deseo de conocer más mundo, en las que he aprendido mucho a nivel científico y que han sido determinantes en mi crecimiento personal.

Professor Jaques Belik, thank you so much for allowing me to work in your laboratory at the wonderful Hospital for Sick Children. It was a great opportunity for me. Thank you very much also for your advice and for caring so much about my learning. I learnt so much. I also want to thank Jingyi Pan who helped me a lot in the lab's work and gave me the best advice during my PhD: Jingyi, now I am learning. Thanks to Fabiana, I am so glad to share with you my time in Sicks Kids. I will never forget our dinners in the spring rolls. Thank you very much to Anna for being my translator, she made my stay in the Sick Kids Hospital so easy! Finally, I would like to acknowledge to all workers in the animal room for their concern during my training and for make my job so easy.

No puedo dejar de agradecer a los becarios de comercio exterior en Toronto que hicieron que esos tres meses por Norteamérica fueran simplemente inolvidables. Ya sabéis que siempre me quedaré con las ganas de ser becario ICEX.

Professor Gary Williamson, thank you very much for giving me the opportunity to work in your group which allowed me to improve my knowledge in polyphenols. Thank you very much for your advice and for sharing your wisdom. It was also a great opportunity to work and live in the amazing University of Leeds. Thank you very much to all the students of the Laboratory of Gary. It was great to meet all of you and I am particularly grateful to Ebru Cetin who taught me all about Dionex. Thank you very much to all my housemates in the 51, Clarendon Rd. for such an amazing time.

Al Dpto. de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, mi departamento durante estos cuatro años. Muchas gracias tanto a la actual Directora del departamento la Profesora Isabel Colado así como al anterior, el Profesor Ignacio Lizasoain por aceptarme en este departamento. También quiero agradecer a todos los profesores del departamento el poner su conocimiento a mi disposición durante los cursos de doctorado. A todos los becarios y técnicos del departamento, los que siguen y los que ya se fueron, por todo lo compartido, especialmente por las risas durante la comida. A Maria Elena por su siempre tan amable y eficaz ayuda.

A la Universidad Complutense por aceptarme como estudiante de doctorado y poner a mi servicio todos sus recursos.

Al Ministerio de Innovación y Ciencia por la concesión de la beca de formación de personal investigador que me ha permitido realizar esta tesis doctoral, así como por las dos becas para realizar mis estancias de tres meses en la Universidad de Toronto y en la Universidad de Leeds.

A Lola e Isabel, mis compañeras de piso durante la mejor época de estabilidad residencial en Madrid. Ya sabéis que vuestros consejos han sido fundamentales durante

estos años (“...porque a todos nos ha pasado...”), pero sobre todo muchas gracias por quererme y cuidarme tanto, yo os quiero más.

No puedo dejar de dar las gracias a las dos promociones del Máster en relaciones internacionales de la escuela diplomática que coincidieron con mis dos primeros años de tesis. Siempre fue a modo de broma mi formación paralela en Madrid, y ya sabéis que nunca llevé bien que terminarais tan pronto, me dejasteis a la mitad. Muchas gracias a todos por todo lo compartido pero sobre todo a Nono, Cristóbal, Rocío y Cris por hacerme tan participes de esto.

A todos mis amigos reencontrados en Madrid, los erasmus, los cordobeses; a los conocidos en Madrid y por el mundo, los que siguen dispersos por el mundo y me hacen soñar y los que han vuelto a casa y me hacen madurar.

A todos, todos, muchísimas gracias por acompañarme siempre.

ÍNDICE

Abstract	15
Introducción.....	23
Los flavonoides.....	25
1. Clasificación, estructura química y distribución en frutas y verduras.....	26
1.1. Los flavonoles.....	27
1.2. Las flavonas	29
1.3. Los flavan-3-oles	30
1.4. Las flavanonas y las chalconas	32
1.5. Las antocianidinas / antocianinas	33
1.6. Las isoflavonas	35
2. Los flavonoides y las enfermedades cardiovasculares	36
2.1. Los flavonoles, el endotelio y el músculo liso vascular	38
2.2. Los flavonoles y las plaquetas	45
2.3. Los flavonoides y la hipertensión	45
2.4. Los flavonoides y la aterosclerosis	48
2.5. Los flavonoles, la resistencia a la insulina y la obesidad.....	50
2.5.1. La obesidad	51
2.5.2. Resistencia a la insulina	52
2.6. Los flavonoides y la cardiopatía isquémica.....	55
2.7. Los flavonoides y los accidentes cerebrovasculares.....	56

3. La farmacocinética de los flavonoides	60
3.1. Absorción.....	62
3.2. Metabolismo	64
3.3. Distribución	67
3.4. La desconjugación de los metabolitos.....	69
3.5. Excreción	70
4. Las propiedades biológicas de los metabolitos conjugados	71
Justificación y objetivos	75
Objectives	81
Results I:.....	85
Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidize, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability	
Lodi F., <i>et al.</i> <i>Planta med.</i> 2008;74:741-746.	
Results II:	95
Vascular deconjugation of quercetin glucuronide. The flavonoid paradox revealed?	
Menendez C., <i>et al.</i> <i>Mol Nutr Food Res.</i> 2011;55:1780-1790.	
Results III:	109
Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle.	
Menendez C., <i>et al.</i> <i>Br J Nutr.</i> 2011;105:1287-1293.	
Discusión general	119
Conclusiones	133
Conclusions	137
Bibliografía.....	141

ABSTRACT

Flavonoids are polyphenolic compounds widely distributed in the plant kingdom, mainly in dietary fruits, vegetables and derived products such as wine and chocolate, and quercetin is the most abundant and the best studied one. Flavonoids have been proposed to exert beneficial effects in the prevention of a large number of diseases, including cancer, cardiovascular disease, and neurodegenerative disorders. The flavonoid class includes several thousand compounds as found in nature, including several subclasses such as flavonols, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols and chalcones. They are regularly ingested in the diet as complex mixtures of different flavonoid compounds together with other active substances. Flavonols are present, usually as diverse glycosides, in considerable amounts in our normal diet. Although flavonols can be found virtually in all vegetables and fruits, the richest sources include onions, apples, cider, grapes, wine and tea. After oral ingestion, flavonoids are subject to chemical modification within the gastrointestinal tract by the enzymes of the host and microbiota and further metabolized after absorption in the intestinal wall, the liver and peripheral tissues.

In the introduction, the state of the art of cardiovascular effects of flavonoids is reviewed as well as their pharmacokinetics. Even when not all epidemiological studies reported an inverse association between dietary flavonoid consumption and mortality from cardiovascular diseases, a large body of evidence supports the hypothesis that flavonoids exert protective cardiovascular effects. Flavonols, and specially quercetin, in addition to its anti-oxidant effect, can modulate (mostly inhibit) the activity of an impressive number of enzymes. Thus, it can be predicted that a huge number of biochemical signalling pathways and, therefore, physiological and pathological processes, can be affected by this flavonol. It can potentially interact with many of the molecular targets known to be involved in the pathophysiology of ischemic heart disease and stroke. Thus, it may act by multiple mechanisms operating both in the long term prevention and in the acute phase of cardiovascular events. To summarize, there is solid evidence that, *in vitro*, quercetin and related flavonols exert: (1) endothelium - independent vasodilator effects, (2) protective effect on nitric oxide and endothelial function under conditions of oxidative stress, (3) platelet antiaggregant effects, (4) inhibition of LDL oxidation, (5) reduction of adhesion molecules and other

inflammatory markers and (6) prevention of neuronal oxidative and inflammatory damage. The *in vitro* effects regarding NO production in healthy vessels and glucose uptake in adipocytes are controversial. The metabolites of quercetin show partial protective effects on endothelial function and LDL oxidation. In animal models of disease, quercetin produces undisputed antihypertensive and antiatherogenic effects, prevents endothelial dysfunction and protects the myocardium from ischemic damage. However, it has no clear effects on serum lipid profile and on insulin resistance although at high doses it may also reduce obesity. Several human intervention trials with isolated flavonols demonstrate an antihypertensive effect while no data is available on endothelial function, insulin resistance or atherosclerosis. Some evidence also points to differential effects depending on the genetic background of the patients.

An interesting issue which has been the focus of attention in recent years is whether the observations made *in vitro* with quercetin and other flavonols have any relevance *in vivo*. The biological activity of flavonoids has been analyzed using commercially available aglycones (not glycosylated) compounds which are present at extremely low concentrations in plasma. Quercetin may be administered orally as an aglycone or in the form of glycosides (e.g. quercetin, rutin, quercetin-3-glucoside), which are the major forms found in food. Glycosides are hydrolyzed in the intestine but some (e.g. quercetin-3-glucoside) may be also absorbed as such using the glucose transporter SGLT1. Quercetin is rapidly conjugated with glucuronic acid and/or sulfate during first-pass metabolism in the intestine or liver and a portion of the metabolites is also methylated. Thus, the major metabolites of quercetin in human plasma are quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-sulfate and isorhamnetin-3-glucuronide (3'-methyl-quercetin-3-glucuronide). The limited information available about the *in vitro* effects of these metabolites is also reviewed in the introduction. In general, these metabolites are less active than the parent compounds and sometimes totally inactive. For instance, glucuronidated and sulfated metabolites lack a direct acute vasodilator effect in isolated arteries and they have only a partial effect in preventing acute endothelial dysfunction.

In results I (Lodi *et al.*, 2008), we describe that quercetin metabolites, in contrast to quercetin, do not undergo auto-oxidation, being more stable, do not produce free radicals and do not inhibit the biological activity of NO.

However, despite quercetin in plasma is found almost entirely as conjugated metabolites, several studies have found that the aglycones, together with variable amounts of conjugated metabolites, are present in considerable amounts in tissues. In addition, glucuronide conjugated metabolites of quercetin can be hydrolyzed by β -glucuronidase, releasing the parent aglycone structure. It has been found that quercetin glucuronides were hydrolyzed and suggested that the activity of quercetin glucuronides depends on their deconjugation. Based on these indirect evidences, it has been proposed that glucuronide conjugates of quercetin function not only as detoxified metabolites but hydrophilic bioactive agents to various ROS-generating systems and precursors of hydrophobic aglycone.

From this perspective, in results II (Menendez *et al.*, 2011a), we hypothesized that a) quercetin-3-glucuronide (Q3GA) can deconjugate in the vascular beds and exerts its effects *in vitro* via the release of quercetin and b) Q3GA exerts a blood pressure lowering effect. Our results confirm that 1) Q3GA can be deconjugated enzymatically in a perfused vascular bed releasing free quercetin which accumulates in the perfusing fluid and within the tissue. 2) Q3GA is more stable than free quercetin in the vascular bed, 3) Q3GA exerts inhibitory effects on vascular contraction *in vitro* when incubated for long time periods via the release of free quercetin and 4) Q3GA exerts a progressive and long lasting blood pressure lowering effect *in vivo*. Taken together, these results suggest that the circulating glucuronides in plasma behave as quercetin carriers and that the aglycone released in the target organs seems to be the final effector.

On the other hand, due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods and/or are consumed in the same meal. In fact, prototypical flavonoid rich foods contain a large number of different flavonoids in variable amounts. However, little is known about the interactions between them.

Endothelial, vascular smooth muscle cells and platelets are three main targets for the actions of flavonoids regarding cardiovascular disease. Quercetin and catechin have been reported to act synergistically in reducing platelet recruitment via the inhibition of protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation. Pharmacokinetic interactions have also been described.

In results III (Menendez *et al.*, 2011b), we have analysed the interactions between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on vascular function *in vitro*. We show that compared with quercetin, catechin produced weak vasodilator effects in conductance and resistance arteries, a weak ability to modulate oxidative stress-induced endothelial dysfunction and did not show pro-oxidant effects. We used the isobolographic analysis to determine the drug–drug interactions in the aorta, because is an easy and appropriate method for the study of drug–drug interactions when both drugs show activity. The isobologram revealed that the vasodilator effects of both flavonoids were additive. In mesenteric and pulmonary arteries, the isobologram could not be plotted because of the weak effect of catechin. However, our data also suggest a lack of interaction. Importantly, catechin did not influence the effects of quercetin on the other parameters analysed.

In summary, in this Doctoral Thesis we propose that the glucuronidated derivatives of quercetin, which lack several of the biological properties of the parent compound, act as carriers of quercetin and deliver the free aglycone *in situ* at the vascular level by deconjugation. This cycle of conjugation-deconjugation is essential for the blood pressure lowering effects of quercetin *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

Los flavonoides

Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con el que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Estos son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "la ruta biosintética de los flavonoides". La estructura base, es un esqueleto 2-fenilcromano C6-C3-C6 (Bruneton, 2001; Cody, 1988) que está formado por un anillo bencénico (A) unido a un anillo heterocíclico piránico (C) y un segundo anillo fenilo (anillo B) que se une en posición 2, dando lugar al grupo de los flavonoides propiamente dichos, o puede hacerlo en posición 3, dando lugar a los isoflavonoides (Figura1). Esta estructura básica puede sufrir muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, *a posteriori*, por lo que los flavonoides se convierten en una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser compuestos polifenólicos. Los flavonoides constituyen el grupo más importante de polifenoles presente en la dieta (Rice-Evans et al., 1998; Rice-Evans CA, 1998b).

El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Albert Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, capaz de regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida. Los flavonoides se consideraron inicialmente vitaminas, denominados vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2, porque algunos tenían propiedades similares a la vitamina C. El interés en estos compuestos decayó en la década de 1940 después de que se demostrara que, al contrario de los micronutrientes, no son esenciales para la salud humana (Joint-Comitte-nomenclature-ASBC-AIN, 1950). Sin embargo, mucho más tarde, en la década de 1990, ha tenido lugar una gran expansión en este campo, con la publicación de diversos estudios epidemiológicos que asociaban una menor incidencia del cáncer y las enfermedades cardiovasculares a una mayor ingesta de flavonoides (Hertog *et al.*, 1993; Keli *et al.*, 1996). Hoy en día se han publicado más de 50.000 estudios sobre los flavonoides y más de 10.000 sobre la quercetina, que representa el principal flavonol en la dieta (Hertog *et al.*, 1996). Se estima que este flavonoide

constituye aproximadamente el 75% de los flavonoles y flavonas de la dieta en Estados Unidos (Sampson *et al.*, 2002).

1. Clasificación, estructura química y distribución en frutas y verduras.

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y representan dos tercios de todos los polifenoles ingeridos en la dieta, mientras que los ácidos fenólicos constituyen el tercio restante (Scalbert *et al.*, 2000). Entre los flavonoides, la quercetina representa el principal flavonol en la dieta (Hertog *et al.*, 1996). Existe una creciente evidencia de que la absorción y biodisponibilidad y, por lo tanto, la actividad de los compuestos fenólicos y los flavonoides dependen, en gran medida, de su estructura química. Su clasificación química (Figura 1) y la aparición de la dieta se discute brevemente en la siguiente sección.

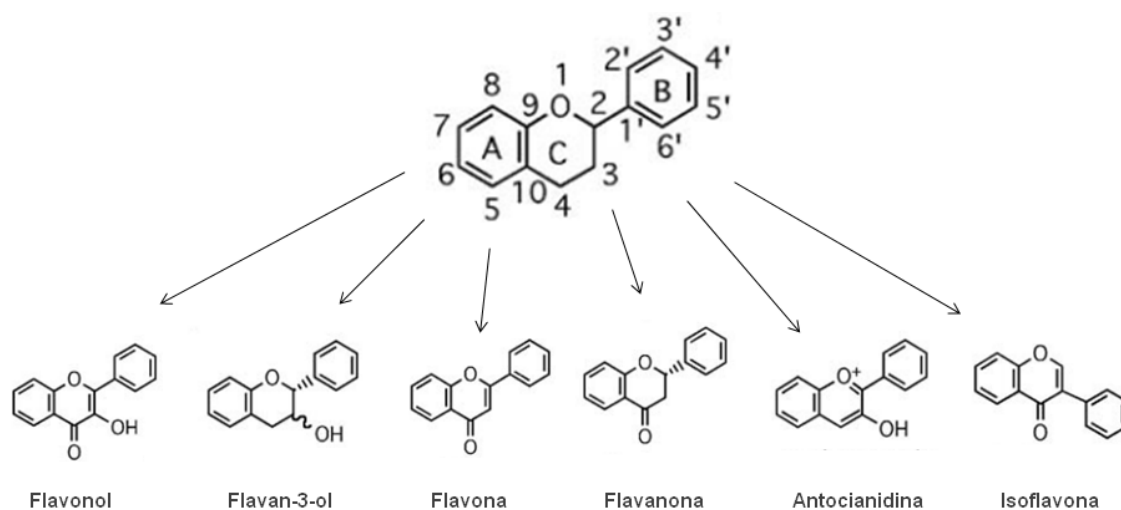


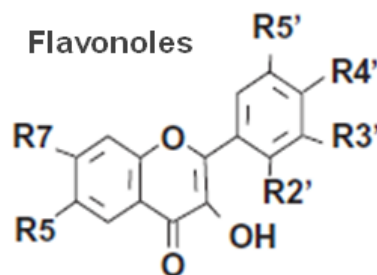
Figura 1. Estructura básica de los flavonoides y las diferentes subclases de flavonoides.

Hasta la fecha se han sido descritos más de 6000 flavonoides y este número no deja de aumentar (Chong *et al.*, 2010; Harborne *et al.*, 2000). Veitch *et al.* (2010) han descrito recientemente más de 700 nuevos flavonoides. Los flavonoides se clasifican en diferentes clases estructurales, dependiendo de las modificaciones del anillo central C y

se denominan; flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas. En algunos casos, el anillo heterociclo C compuesto por 6 carbonos se presenta de forma isomérica abierta o es remplazada por un anillo de 5 miembros como es el caso de las chalconas. El resto de grupos de flavonoides, que están cuantitativamente menos presentes en la dieta, son los dihidroflavonas, los flavan-3,4-dioles, las cumarinas y las auronas.

1.1. Los flavonoles

Los flavonoles son los flavonoides más ampliamente distribuidos en las plantas que forman parte de la dieta. Pueden variar en su color desde el blanco hasta el amarillo. Están representados principalmente por la quercetina, el kaempferol y la miricetina. La isorhamnetina, el derivado metilado de la quercetina, es también bastante común (Figura 2).



	R2'	R3'	R4'	R5'	R5	R7
3-OH-flavona	H	H	H	H	H	H
Quercetina	H	OH	OH	H	OH	OH
Kaempferol	H	H	OH	H	OH	OH
Miricetina	H	OH	OH	OH	OH	OH
Isorhamnetina	H	OCH ₃	OH	H	OH	OH
Tamarixetina	H	OH	OCH ₃	H	OH	OH
Morina	OH	H	OH	H	OH	OH
Fisetina	H	OH	OH	H	H	OH

Figura 2. Estructuras químicas de los flavonoles más comunes. Modificado de Perez-Vizcaino et al. (2010).

De todos los flavonoides encontrados en la dieta, la quercetina es el más ampliamente distribuido. Está presente en diversas frutas y verduras, pero en alta concentración (200-1000 $\mu\text{g g}^{-1}$) especialmente en las cebollas (*Alium cepa*), (Crozier A, 1997; Hertog *et al.*, 1992). En un reciente estudio publicado por (Sultana *et al.*, 2008), el nivel de los flavonoles fue determinado en 22 plantas (9 vegetales, 5 frutas, y plantas medicinales). Las concentraciones más altas se detectaron en la planta medicinal moringa (*Moringa oleifera*; 68 $\mu\text{g g}^{-1}$) seguida de la fresa (*Fragaria spp.*; 40 $\mu\text{g g}^{-1}$), la higuera sagrada (*Ficus religious*; 12 $\mu\text{g g}^{-1}$), las espinacas (*Spinaceae oleraceae*; 19 $\mu\text{g g}^{-1}$) y la coliflor (*Brassica oleraceae*) (18 $\mu\text{g g}^{-1}$).

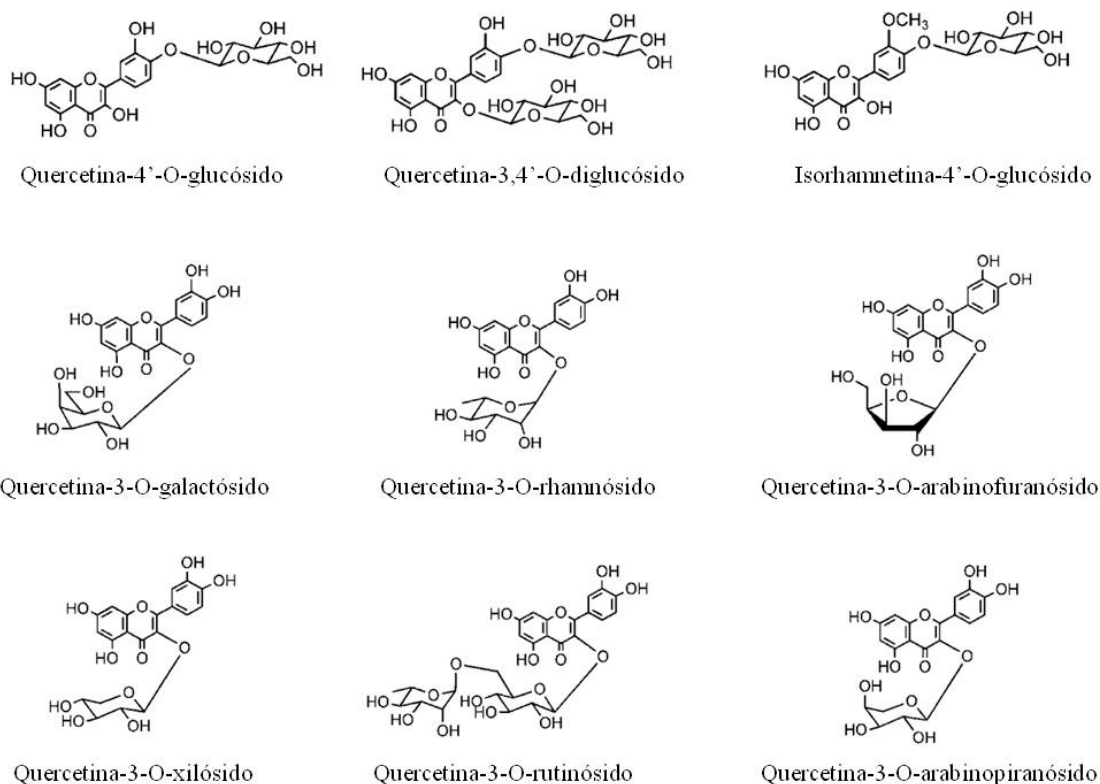


Figura 3. Estructuras químicas de los principales glicósidos de quercetina en frutas y verduras.

Los flavonoles se encuentran en las plantas casi siempre en forma de conjugados glicosilados (figura 3). Los principales flavonoles en la cebolla son quercetina-4'-O-glucósido y quercetina-3,4'-O-diglucósido y en menor cantidad, la isorramnetina-4'-O-glucósido (Mullen *et al.*, 2004). Un amplio rango de otros conjugados de quercetina

tales como quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-rhamnósido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-rutinósido, quercetina-3-O-arabinofuranósido y quercetina-3-O-arabinopiranósido se encuentran en la manzana (*Malus x domestica*) (Marks *et al.*, 2007). Por otra parte, la quercetina-3-O-rutinósido, es el principal flavonol en los tomates (*Lycopersicon esculentum*), los espárragos (*Asparagus officinalis*), los melocotones (*Prunus persica*), y las nectarinas (*Prunus persica* var. Nectarina) (Crozier *et al.*, 2006c; Makris *et al.*, 2001). En los mangos (*Mangifera indica*), también se han detectado, quercetina-3-O-glicósido, quercetina-3-O-galactósido, y quercetina-arabinósido (Schieber *et al.*, 2000). Otros flavonoles en la dieta incluyen kaempferol-3-O-rutinósido en kiwi (*Actinidia deliciosa*) y los conjugados de miricetina en bayas (Peterson *et al.*, 1998). En las judías verdes se pueden encontrar cantidades substanciales de quercetina-3-glucurónido.

Las uvas (*Vitis vinifera*), y los productos derivados de la uva como el vino, contienen un amplio rango de flavonoides tales como quercetina, miricetina, kaempferol, isoramnetina, quercetina-3-O-glicósido, quercetina-3-O-galactósido, kaempferol-3-O-glicósido y kaempferol-3-O-rutinósido (Makris *et al.*, 2001). Las infusiones de té (*Camellia sinenses*) también contienen un variado espectro de flavonoles en forma de mono-, di- tri-sacáridos (Del Rio *et al.*, 2004).

1.2. Las flavonas

Las flavonas tienen una estructura muy similar a los flavonoles y difieren sólo en la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C. La apigenina y la luteolina son las flavonas más comunes en la dieta. Éstas, a diferencia de los flavonoles, no se encuentran tan ampliamente distribuidas a concentraciones significativas en la dieta. Sólo se han encontrado en altas concentraciones en el apio (*Apium graveolens*), el perejil (*Petroselinum crispum*) y la alcachofa (*Cynara scolymus*) (Crozier *et al.*, 2006a). Por tanto, la ingesta de estos flavonoides a través de la dieta es menor que la de otros grupos. Las flavonas conjugadas, como los glucósidos de apigenina, la luteolina y el crisoeriol, se encuentran en el apio (Herrmann, 1976), mientras que la alcachofa contiene luteolina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-rutinósido, apigenina-7-O-rutinósido (Wang *et al.*, 2003). Cantidades sustanciales de luteolina-7-O-glucurónido, luteolina-7-

O-glucósido y luteolina-7-O-rutinósido se encuentran en dos variedades de la lechuga (*Lactuca sativa*), la lechuga hoja de roble roja y la lechuga Lollo Rosso (Llorach *et al.*, 2008). Las flavonas polimetoxiladas como la nobiletina, scutellareina, sinensetina y tangeretina se encuentran exclusivamente en los cítricos (Crozier *et al.*, 2006c); la diosmetina-7-O-glucurónido ha sido aislada de los frutos de una hierba china, *Luffa cylindrica*, mientras que el té rojo rooibos, preparado a partir de las infusiones de las hojas jóvenes y brotes del arbusto rojo africano *Aspalathus linearis*, contiene un número de compuestos que incluyen c-glucósidos de flavonas en la forma de isoorientina (luteolina-6-C-glucósido) y orientina (luteolina-8-C-glucósido) (Bramati *et al.*, 2003). Orientina y isoorientina también se encuentran en el limoncillo (*Cymbopogon citratus*) junto con otros dos C-glucósidos de flavonas, el chrisoeriol-6-C-glucósido y el 7-O-metil-luteolina-6-C-glucósido (Cheel *et al.*, 2005).

Estudios recientes han demostrado que cuando las flavonas se encuentran metoxiladas, tanto su estabilidad metabólica como el transporte a través de la membrana intestinal y hepática aumenta de forma dramática, lo que mejora la biodisponibilidad oral. Además, las metoxiflavonas también muestran un aumento de las propiedades de quimioprevención del cáncer en comparación con la flavonas más comunes no metiladas (Walle, 2007).

1.3. Los flavan-3-oles

Las características estructurales principales de los flavan-3-oles son la ausencia de un doble enlace en posición 2,3, lo que da lugar a la aparición de un carbono asimétrico y la presencia de hidroxilo en el carbono 3 (Iwashina, 2000). Los flavan-3-oles representan la mayoría de los flavonoides que se consumen en la región de América, y muy probablemente en la dieta occidental, y son considerados como ingredientes funcionales en diversas bebidas, alimentos integrales y procesados, hierbas medicinales y suplementos. Su presencia en los alimentos afecta a diferentes parámetros de calidad tales como la astringencia, amargura, acidez, dulzor, viscosidad salival, aroma, y color (Aron PM, 2007). Los flavan-3-oles representan la subclase de flavonoides estructuralmente más compleja e incluye desde los monómeros simples (+)-catequina y

su isómero (-)-epicatequina (figura 4) a las proantocianidinas oligoméricas, que son también conocidos como taninos condensados (Crozier *et al.*, 2006b). El tipo más abundante de las proantocianidinas en las plantas son las procianidinas, las cuales están compuestas exclusivamente por subunidades (epi) afzelequina y (epi) galocatequina que se llaman propelargonidinas y prodelfinidinas, respectivamente (Balentine *et al.*, 1997).

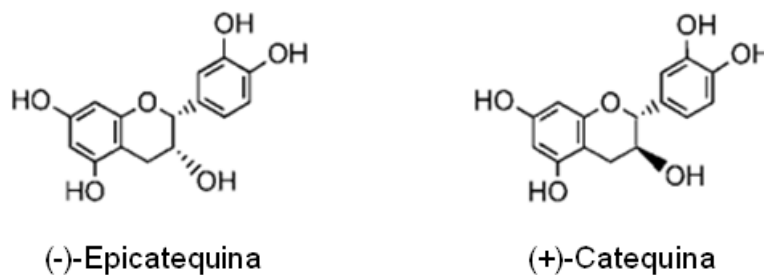


Figura 4. Estructuras químicas de los principales flavanoles de la dieta.

Los flavan-3-oles se encuentran abundantemente en frutas como el albaricoque (*Prunus armeniaca*), las guindas (*Prunus cerasus*), las uvas y moras (*Rubus spp.*) (Hong *et al.* 2004). La cebada, aparentemente, es el único cereal común con un importante contenido de proantocianidinas (0,6-1,3 g kg⁻¹) (Santos-Buelga *et al.*, 2000). La (+)-catequina y la proantocianidina prodelfinidina B₃, son los principales flavan-3-oles monoméricos y diméricos, respectivamente que se encuentran en la cebada y la malta, donde la prodelfinidina B₃ es el principal contribuyente a la actividad atrapadora de radicales libres (Dvorakova *et al.*, 2007). Las proantocianidinas también se han detectado en los frutos secos. De hecho, las avellanas (*Corylus avellana*) y las nueces de pecan (*Carya illinoensis*) son particularmente ricas en proantocianidinas (5 g Kg⁻¹), mientras que las almendras (*Prunus dulcis*) y los pistachos (*Pistachio vera*) contienen 1,8-2,4 mg kg⁻¹, las nueces (*Juglans spp.*) 0,67 g Kg⁻¹, los cacahuetes tostados (*Arachis hypogaea*) 0,16 g Kg⁻¹, y los anacardos (*Anacardium occidentale*) 0,09 g Kg⁻¹ (Crozier *et al.*, 2006c). El chocolate negro derivado de las semillas tostadas de cacao (*Theobroma cacao*) es también una fuente rica de procianidinas (Gu *et al.*, 2004). Los flavan-3-oles y la proantocianidina B₂, los dímeros B₅ y los trímeros C₁ se encuentran en los granos de cacao fresco. Los flavan-3-oles se han detectado también en la menta (*Mentha*

rotundifolia), la albahaca (*Ocimum basilicum*), el romero (*Rosemarinus officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*) y el eneldo (*Anethum graveolens*) (Shan *et al.*, 2005).

Los flavan-3-oles pueden someterse a esterificación con ácido gálico para formar galatos de catequina, y las reacciones de hidroxilación dan lugar a las galocatequinas. Las galocatequinas como (-)-epigalocatequina, (-)-galato de epigalocatequina y el galato de (-)-epicatequina son abundantes en las infusiones de té verde (Stewart *et al.*, 2005). Durante la fermentación para producir el té negro, estos compuestos se polimerizan, dando lugar a las flavinas del té, de alto peso molecular y llamadas terubiginas (Crozier *et al.*, 2006c). Otras bebidas como el vino tinto y la cerveza también son ricas en flavan-3-oles. Los vinos tintos contienen procianidinas oligoméricas y prodelfinidinas, procedentes principalmente de las semillas de las uvas rojas (Auger *et al.*, 2004). En la cerveza se han detectado flavan-3-oles tales como (+)-catequina y (-)-epicatequina y los dímeros prodelfinidina B₃ y procianidina B₃ (Crozier *et al.*, 2006c).

1.4. Las flavanonas y las chalconas

Las flavanonas están representadas principalmente por la naringenina, la hesperetina y el eriodictiol, aunque también existen un número de compuestos menores, como la sakuranetina y la isosakuranetina. Dos son las características estructurales que poseen las flavanonas, la ausencia de un doble enlace 2, 3 y la presencia de un centro quiral en el carbono-2 (Iwashina, 2000). En la mayoría de las flavanonas, el anillo C está unido al anillo B por el carbono 2 en configuración La estructura de las flavanonas les confiere una alta reactividad, siendo la hidroxilación, la glicosilación y la O-metilación los tipos de reacciones más comunes en este grupo.

Las flavanonas se encuentran exclusivamente en los cítricos en sus formas glucosídicas. El zumo de pomelo (*Citrus paradisi*) contiene hasta 377 mg L⁻¹ de naringina (naringenina-7-O-neohesperidósido) mientras que el zumo de naranja contiene entre 16 y 84 mg L⁻¹ de narirutina (naringenina-7-O-rutinósido) (Clifford, 2000; Manach *et al.*, 2004; Tomás-Barberán *et al.*, 2000). La piel de los cítricos es con diferencia la parte más rica en contenido en flavanonas. Cantidades significativas de eriodictiol-7-O-

rutinósido se encuentran en el limón (*Citrus limon*) y en la lima (*Citrus aurantifolia*) (Peterson *et al.*, 1998). Los rutinósidos de flavanonas son insípidos mientras que los neohesperidósidos conjugados, como la hesperetina-7-O-neohesperidósido (neohesperidina) de la naranja amarga (*Citrus aurantiurn*) y naringenina-7-O-neohesperidósido (naringina) del pomelo pelado (*Citrus paradisi*), tienen un sabor intensamente amargo. La naringenina también se encuentra en los tomates. Los tomates frescos, especialmente la piel, también contienen naringenina chalcona, que se convierte en naringenina durante la fabricación de la salsa de tomate (Krause *et al.*, 1992). La hesperetina-7-O-rutinósido también se ha encontrado en el kiwi, mientras que la hesperetina-7-O-neohesperidósido se ha encontrado en los plátanos (*Musa cavendishii*) (Dégenève, 2004; Kanazawa *et al.*, 2000).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el té rojo de rooibos, del cual se han descrito un gran número de propiedades medicinales (Joubert *et al.*, 1996; McKay *et al.*, 2007), contiene las flavonas C-glucosiladas, orientina e isoorientina. Además contiene una serie de C-glucósidos atípicos de dihidrochalcona, siendo los principales componentes el 2',3',4',6'-pentahydroxy-dihidrochalcona-3-C-glucósido (aspatina) y el 2',4,4',6'-tetrahydroxi-dihidrochalcona-3-C-glucósido (notofagina). Durante la fermentación, la aspatina se oxida convirtiéndose en las flavanonas C-glucósido eriodictiol-6-C-glucósido y eriodictiol-8-C-glucósido (Krafczyk *et al.*, 2008).

1.5. Las antocianidinas / antocianinas

Las antocianinas son pigmentos de las plantas solubles en agua y son particularmente evidentes en las frutas y tejidos de las flores en los que son responsables de una amplia gama de rojos, azules y púrpuras. Se producen principalmente como glucósidos de sus respectivas antocianidinas que contienen un cromóforo, por lo general el azúcar está unido a la posición 3 en el anillo C o la posición 5 en el anillo A (Prior *et al.*, 2006). Estos compuestos están involucrados en la protección de las plantas contra el exceso de luz y también tienen un papel importante en la atracción de insectos polinizadores. Se han descrito en la naturaleza cerca de 17 antocianidinas pero sólo la 6-cianidina, la delfinidina, la petunidina, la peonidina, la pelargonidina y la malvidina están

distribuidas en la dieta de forma importante. La variación de las antocianinas se debe a: (i) el número y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo en el esqueleto básico de las antocianidinas (ii) la identidad, el número y las posiciones en las que se unen los azúcares, y (iii) tanto el grado como el agente de acilación del azúcar (Prior *et al.*, 2006). A diferencia de otros subgrupos de los flavonoides con el mismo esqueleto C6-C3-C6, las antocianinas tienen una carga positiva en su estructura a un pH neutro. La antocianina más común en la fruta es la cianidina-3-glucósido (Kong *et al.*, 2003). Sin embargo, los glucósidos de malvidina son las antocianinas responsables del color rojo característico de la uva y sus productos derivados (Mazza *et al.*, 1993). Otras antocianinas presentes en las uvas son la petunidina-3-O-glucósido, malvidina 3-O-(6'-O-p-coumaroyl) glucósido, malvidina-3-O-(6'-O-acetil) glucósido, delphinidina-3-O - glucósido y malvidina-3,5-O-diglucósido (Burns *et al.*, 2001; 2002).

El zumo de uva morada, preparado a base de uvas Concord, una especie autóctona de América (*Vitis labrusca*), y que tienen una piel más gruesa que las de *Vitis vinifera*, es una rica fuente de más de 20 antocianinas. Los componentes principales son 3-O-glucósidos y 3,5-O-diglucósidos de cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina y, delphinidina-3-O-(6'-O-acetil)-glucósido, delphinidina-3-O-(6'-O-p-coumaroyl)-5-O-diglucósido, y delphinidina-3-O-(6'-O-p-coumaroyl) glucósido (Mullen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003).

Las antocianinas se encuentran abundantemente en las bayas, donde proporcionan a las frutas sus características gamas de colores. Los arándanos (*Vaccinium macrocarpon*), la mora y el saúco (*Sambucus nigra*) contienen derivados de un solo tipo de las antocianinas (la cianidina), mientras que en el arándano (*Vaccinium corymbosum*) y en la grosella negra (*Ribes nigrum*) podemos encontrar una amplia gama de antocianinas. Las antocianinas, como cianidina-3-O-rutinósido, cianidina-3-O-glucósido y peonidina-3-O-rutinósido también se han encontrado en las cerezas dulces (*Prunus avium*) y las guindas (*Prunus cerasus*) (Wu *et al.*, 2004). Las ciruelas (*Prunus domestica*) y los melocotones son también una fuente rica de cianidina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-rutinósido (Crozier *et al.*, 2006c).

Las cebollas rojas contienen hasta 250 mg Kg^{-1} de antocianinas (Clifford, 2000), siendo los componentes principales la cianidina-3-O-(6'-malonyl)glucósido y cianidina-3-O-(6'-malonil) laminaribiosido (Donner *et al.*, 1997). La cianidina-3-O-(6'-malonil) glucósido es también un componente de la lechuga de hoja roja Lollo Rosso (Ferrerres *et al.*, 1997), mientras que los 3-O-glucósidos y 3,5-O-diglucósidos de cianidina y delfinidina se han encontrado también en el zumo de granada (*Punica granatum*) (Gil *et al.*, 2000).

1.6. Las isoflavonas

A diferencia de la mayoría de los otros flavonoides, las isoflavonas se caracterizan por tener el anillo B unido al carbono C₃ en lugar de al C₂. Además su distribución en el reino vegetal es muy limitada y, de hecho, solo se encuentra en cantidades importantes entre las leguminosas (Dixon *et al.*, 1999; Graham, 1991). Las isoflavonas son conocidas por su actividad estrogénica debido a su capacidad para unirse a los receptores de estrógenos y han recibido mucha atención debido a su posible papel en la prevención del cáncer de mama y la osteoporosis (Barnes, 2003).

En todo el mundo, la soja (*Glycine max*) es casi la única fuente dietética de isoflavonas. Las isoflavonas más comunes, como la genisteína, daidzeína y gliciteína, también se producen, aunque en niveles bajos, en el frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y los guisantes (*Pisum sativum*). En las plantas, las isoflavonas se encuentran predominantemente como β_3 -glucósidos (genistina, daidzina, glicitina), o como acetil- β -glucósidos y malonil- β -glucósidos, siendo por lo tanto compuestos polares y solubles en agua (Coward *et al.*, 1998). Las isoflavonas también son objeto de diversas modificaciones, como la metilación, hidroxilación o polimerización, y estas modificaciones llevan a isoflavonoides simples, tales como isoflavanonas, isoflavonas y isoflavanoles, así como estructuras más complejas como los rotenoides, pterocarpanos y coumestanos (Dewick, 1993). Las isoflavonas como daidzeína-7-O-(6'-O-malonil) glucósido y daidzeína-7-O-(6'-O-acetil) glucósido se encuentran en altas concentraciones en soja (Barnes, 2003). La formononetina y la biocanina A, presentes como 6'-O-malonil-7-O-glucósidos, 7-O-glucósidos y agliconas, son las isoflavonas

más abundantes en el trébol rojo (*Trifolium pretense*), que es uno de los principales ingredientes utilizados para extraer las isoflavonas utilizadas en los suplementos dietéticos (Delmonte *et al.*, 2006). La *Pueraria lobata* (nombre común “kudzu”), una vid perenne, autóctona de Japón y China pero que también crece en el sureste de Estados Unidos, es otra fuente comercial de isoflavonas para los suplementos dietéticos. La puerarina, daidzina (daidzeína-7-C-glucósido), y la daidzeína (daidzeína-7-O-glucósido) son las principales isoflavonas en el kudzu (Delmonte *et al.*, 2006).

2. Los flavonoides y las enfermedades cardiovasculares

Desde la década de 1990, tal y como se ha mencionado al principio de esta introducción, tuvo lugar una gran expansión en el estudio de la actividad biológica de los flavonoides y se llevaron a cabo una serie de estudios epidemiológicos tratando de correlacionar la alta ingesta de compuestos fenólicos y de flavonoides en la dieta a través del consumo de frutas y verduras, con un menor riesgo de enfermedades degenerativas. La mayoría de estos estudios (Hertog *et al.*, 1993; Hertog *et al.*, 1997; Keli *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2007; Sesso *et al.*, 2003), aunque no todos (Geleijnse *et al.*, 2002; Knekt *et al.*, 1996; Ness *et al.*, 1997), observaron una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y las enfermedades cardiovasculares. Los resultados de un reciente meta análisis sobre los flavonoides, alimentos ricos en flavonoides y el riesgo vascular (Hooper *et al.*, 2008) muestran que no existen pruebas concluyentes sobre la eficacia de los flavonoides en la dieta, aunque los polifenoles del cacao, las isoflavonas de la soja y las catequinas del té mostraron algunos efectos positivos.

Aunque no todos los estudios epidemiológicos muestran una asociación inversa entre el consumo de flavonoides y la mortalidad por enfermedad cardiovascular, un gran número de evidencias científica apoyan la hipótesis de que los flavonoides tienen un importante efecto protector de las enfermedades cardiovasculares.

Los flavonoles son comercializados como suplementos dietéticos, ya sea como compuestos puros (por ejemplo, la quercetina) o como mezclas o extractos de

flavonoides, a menudo en dosis que exceden en gran medida la ingesta alimentaria. Algunos flavonoides, como la hesperidina, se utilizan también como medicamentos venotónicos para el tratamiento de varias enfermedades venosas (Lyseng-Williamson *et al.*, 2003).

Además de su tradicionalmente reconocido efecto antioxidante, los flavonoides son capaces de modular la actividad (en su mayoría mediante inhibición) de un gran número de enzimas implicadas en el control de diferentes procesos fisiológicos, incluyendo el control del tono vascular y la proliferación celular. Por lo tanto, se puede predecir que un gran número de vías de señalización bioquímica y, por tanto, de procesos fisiológicos y patológicos pueden ser modulados por este flavonol. De hecho, es sorprendente que la quercetina sea todavía ampliamente considerada sólo como un antioxidante y, aún más sorprendente, que a menudo sea utilizada como una herramienta farmacológica para inhibir de forma específica una enzima en concreto. La quercetina puede interactuar potencialmente con muchas de las dianas moleculares implicadas en la fisiopatología de la cardiopatía isquémica y el derrame cerebral. Por lo tanto, la quercetina puede actuar por varios mecanismos que operan tanto en la prevención a largo plazo como en la fase aguda de los eventos cardiovasculares. Estas múltiples interacciones pueden explicar los efectos protectores de las enfermedades cardiovasculares aunque, ocasionalmente, también podrían dar lugar a efectos perjudiciales.

En este apartado, revisaremos las evidencias científicas en continuo crecimiento que apoyan la hipótesis sobre el papel beneficioso de los flavonoides en las enfermedades cardiovasculares y las posibles dianas moleculares implicadas. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo utilizando el flavonol quercetina. Los datos disponibles indican que los efectos biológicos del kaempferol, la isoramnetina y la tamarixetina son cualitativamente similares. La miricetina comparte con el resto de estos flavonoles algunas de sus acciones, pero puede producir además efectos diferentes y, en ocasiones, opuestos. Por último, se han desarrollado un gran número de estudios interesantes utilizando alimentos, plantas medicinales o extractos de flavonoides, en los cuales sus acciones beneficiosas pueden ser también atribuidas a los flavonoles, pero en los que no

se puede descartar la participación de otras sustancias u otras subclases de flavonoides y, por lo tanto, no los revisaremos aquí.

2.1. Los flavonoles, el endotelio y el músculo liso vascular

El endotelio vascular ejerce un control preciso de la homeostasis cardiovascular. En las enfermedades cardiovasculares el equilibrio existente entre los factores vasodilatadores y los vasoconstrictores, entre los factores trombóticos y hemorrágicos y entre los factores de proliferación y antiproliferativos, se encuentra desplazado hacia los vasoconstrictores, los protrombóticos y los proliferativos. Este desequilibrio conduce a la hipertensión, la aterosclerosis, la agregación plaquetaria y la cardiopatía isquémica. En otras palabras, la disfunción endotelial se caracteriza por un deterioro de la vasodilatación dependiente del endotelio, por una reducción de la actividad del óxido nítrico (NO) y por un estado protrombótico y proinflamatorio de las células endoteliales. La disfunción endotelial es un marcador precoz e independiente de mal pronóstico en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares (Schachinger *et al.*, 2000; Widlansky *et al.*, 2003). De hecho, la disfunción endotelial se observa de forma consistente en la hipertensión, en la aterosclerosis, en la enfermedad coronaria, en la diabetes, en la sepsis, en la obesidad así como en los procesos del envejecimiento. Los efectos de la quercetina y el resto de los flavonoides en la modulación de la función endotelial y su disfunción han sido ampliamente revisados (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006b). La quercetina ejerce efectos vasodilatadores agudos directos en las arterias aisladas (Duarte *et al.*, 1993a; 1993b; Fitzpatrick *et al.*, 1993). En los vasos sanos, estos efectos son independientes del endotelio y se producen de manera similar, aunque con diferente potencia, en arterias pre contraídas por diferentes estímulos. Curiosamente, la quercetina y sus metabolitos metilados son más potentes en las arterias coronarias (Ibarra *et al.*, 2002) y en las arterias de resistencia que en los vasos de conductancia (Perez-Vizcaino *et al.*, 2002), además, son más potentes en las arterias de los animales hipertensos (Ibarra *et al.*, 2003) que en las de los normotensos. Por otra parte, se ha observado que varios flavonoides aislados, como la delphinidina, una antocianina (Andriambelason *et al.*, 1998) y la crisina, una flavona (Duarte *et al.*, 2001a) estimulan una relajación dependiente del endotelio y del NO. Se ha observado también que estos

efectos están relacionados con un efecto pro-oxidante, ya que pueden ser inhibidos por la superóxido dismutasa y la catalasa y por el consiguiente aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico endotelial (Andriambeloson *et al.*, 1998). Algunos grupos también han descrito que los efectos de la quercetina son parcialmente dependientes del endotelio y relacionados con la liberación del factor de relajación del endotelio (Ajay *et al.*, 2003; Khoo *et al.*, 2010). También se ha propuesto la participación de un mecanismo pro-oxidante de liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Khoo *et al.*, 2010). Nuestro grupo ha observado que la quercetina produce un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en arterias coronarias de rata, que puede ser inhibida por la catalasa (Cogolludo *et al.*, 2007). La producción de ERO puede ser consecuencia de la autooxidación de la quercetina en el medio de incubación o de un proceso específico a nivel intracelular. Sin embargo, en nuestro grupo nunca se ha observado que la quercetina ejerciera una relajación dependiente de endotelio en ninguno de los diferentes vasos estudiados; esto es consistente con los datos publicados recientemente por otros grupos (Suri *et al.*, 2010). A diferencia de la quercetina y de otros flavonoles, la miricetina puede inducir una respuesta contráctil dependiente del endotelio a través de un aumento de los metabolitos derivados de la ciclooxigenasa (Jimenez *et al.*, 1999).

Las acciones de la quercetina sobre el NO son muy complejas y están muy influenciadas por las condiciones de estrés oxidativo. En un sistema en ausencia de células, la quercetina es susceptible de ser oxidada, generando O_2^- , que reacciona rápidamente e inactiva el NO (Lopez-Lopez *et al.*, 2004). Por el contrario, en células endoteliales, y en ausencia de estrés oxidativo, la quercetina es capaz de aumentar el NO, medido con un electrodo amperométrico, (Taubert *et al.*, 2002) y el Ca^{2+} citosólico, medido con fura2 a través de un mecanismo pro-oxidante (Khoo *et al.*, 2010). Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela ya que la quercetina posee tanto propiedades redox como fluorescentes que podrían interferir con los resultados (Nifli *et al.*, 2007). En cambio, cuando la producción de NO fue medida mediante espectroscopia de resonancia paramagnética, la quercetina no produjo un aumento del nivel de NO en las células endoteliales (Stoclet *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha observado también un efecto inhibitorio de la quercetina sobre la actividad de la NO sintasa endotelial (eNOS) en

células endoteliales bovinas (Jackson *et al.*, 2006). Por lo tanto, en ausencia de estrés oxidativo se ha observado tanto un aumento como una disminución de NO.

Por el contrario, en situaciones de estrés oxidativo (en presencia de altas concentraciones de O_2^-), la quercetina parece proteger al NO de su inactivación mediante diferentes mecanismos. En primer lugar, en ausencia de células, cuando el O_2^- está aumentado bien de forma enzimática o química, la quercetina actúa como un barredor de O_2^- y, por lo tanto, protege al NO (Lopez-Lopez *et al.*, 2004). En segundo lugar, en modelos celulares, la quercetina, no sólo actúa como barredor de O_2^- sino que también inhibe sus fuentes enzimáticas, como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (Busse *et al.*, 1984; Tauber *et al.*, 1984). En tercer lugar, y debido a sus propiedades antioxidantes, los flavonoides puede evitar potencialmente la oxidación de la tetrahidrobiopteridina (BH_4) y el desacoplamiento de la eNOS (Romero *et al.*, 2009). Por último, la quercetina puede inhibir las vías de señalización que aumentan los niveles de expresión de la subunidad reguladora de la NADPH oxidasa $p47^{phox}$. Por lo tanto, la quercetina puede prevenir el deterioro de NO inducido por la angiotensina II (Sanchez *et al.*, 2007) y la endotelina-1 (Romero *et al.*, 2009). El efecto preventivo de la quercetina sobre la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 parece estar relacionado con la regulación a la baja de $p47^{phox}$ a través de la inhibición de la proteína cinasa C (PKC) (Romero *et al.*, 2009). Además, la administración de quercetina *in vitro* permite revertir el deterioro de la función endotelial en las arterias de animales genéticamente hipertensos (ratas espontáneamente hipertensas o SHR) (Ibarra *et al.*, 2003) así como en modelos de diabetes tipo I (Ajay *et al.*, 2006).

En las células del músculo liso vascular (CMLV), el NO ejerce su efecto vasodilatador mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble y el posterior aumento de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). A su vez, el cGMP es metabolizado por las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDEs) y, por lo tanto, la actividad del NO y la relajación dependiente del endotelio son dependientes en gran medida de la actividad de las PDEs. Por lo tanto, los inhibidores de PDE puede prevenir la disfunción endotelial en algunas circunstancias (Vlachopoulos *et al.*, 2004). Se ha observado también que varios flavonoides pueden inhibir varias isoformas de PDEs (Picq *et al.*, 1989). Por lo

tanto, la inhibición de las PDEs podría ser otro mecanismo potencial que explicara la prevención de la disfunción endotelial mediada por los flavonoides. Además, la quercetina mejora de forma selectiva la relajación dependiente de cGMP, mediante un mecanismo que no implica la inhibición de la PDE5 (Suri *et al.*, 2010). Curiosamente, la quercetina previene también la tolerancia a la nitroglicerina *in vitro* (Suri *et al.*, 2010), un efecto compartido por otros barredores de O_2^- (Munzel *et al.*, 1999).

Otro importante regulador de la función vascular, especialmente en arterias de resistencia, es el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). La naturaleza del EDHF no es bien conocida y, dependiendo del tipo de arteria, se ha propuesto tanto al ácido epxieicosatrienoico (EET), el potasio o el H_2O_2 como posibles responsables. Uno de los mecanismos propuestos para explicar la acción del EDHF es el acoplamiento eléctrico a través de uniones estrechas (“*gap-junctions*”) mioendoteliales, por las que la hiperpolarización de las células endoteliales se difundiría a las CMLV (Feletou *et al.*, 2009). Se ha observado recientemente que la charibdotoxina, inhibidor de canales de K^+ de conductancia intermedia (IKCA) y alta (BKCA), inhibe los efectos vasodilatadores de quercetina (Khoo *et al.*, 2010). En base a estos resultados, los autores concluyeron que la quercetina libera el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) cuya actividad depende de la activación de los canales de K^+ . Sin embargo, las siguientes consideraciones ponen en duda las conclusiones de estos autores. En primer lugar, la charibdotoxina por sí sola no puede inhibir, o sólo inhibe débilmente la respuestas dependientes de EDHF y, de hecho, debe utilizarse en combinación con apamina (inhibidor de canales de baja conductancia SK_{Ca}) para conseguir una correcta inhibición del EDHF (Corriu *et al.*, 1996). En segundo lugar, cuando las arterias son contraídas con concentraciones elevadas de KCl (70 mM), el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del potasio se igualan y, por lo tanto, la apertura o cierre de los canales de K^+ no afecta ni al flujo neto de K^+ a través de la membrana, ni al potencial de membrana (Quast *et al.*, 1989). De hecho, la utilización de concentraciones elevadas de KCl representa otra estrategia frecuentemente utilizada para inhibir las respuestas al EDHF. Sin embargo, parte de las respuestas vasodilatadoras independientes de endotelio pueden ser atribuidas a una activación directa de los canales BKCA de las células musculares lisas en las arterias (Cogolludo *et al.*, 2007).

La endotelina-1 (ET-1) es uno de los mediadores endoteliales que inducen vasoconstricción. El aumento en la expresión del ARNm del precursor de la ET-1, la prepro-endotelina, y de la ET-1 se ha asociado con la disfunción endotelial (Brunner *et al.*, 2006). La quercetina por su parte, es capaz de inhibir la liberación de ET-1 del endotelio de la vena umbilical humana y de las células endoteliales de aorta bovina (Khan *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 1999). *In vivo*, la quercetina también es capaz de reducir los niveles de ET-1 en la orina de los ratones ApoE (Loke *et al.*, 2010) y en humanos sanos (Loke *et al.*, 2008a).

La administración de una dosis alta de quercetina en la dieta condujo a una mayor actividad de la NOS en la pared de la aorta de ratas sanas y, por tanto, a un aumento de la relajación dependiente de endotelio, sin modificar la expresión de la eNOS (Benito *et al.*, 2002). En este sentido, los datos obtenidos por nuestro grupo también apoyan de forma ocasional un aumento débil pero significativo en la relajación dependiente de endotelio en ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY) tratadas con dosis bajas de quercetina (Duarte *et al.*, 2001b). En varones sanos, la quercetina aumenta los niveles plasmáticos de S-nitrosotioles, nitritos, y las concentraciones urinarias de nitrato, que de forma indirecta señalan un aumento de NO endotelial (Loke *et al.*, 2008a). Los animales hipertensos, así como los pacientes con hipertensión esencial, desarrollan una reducción de la vasodilatación dependiente de NO derivado del endotelio. En los diferentes modelos experimentales de hipertensión en ratas (SHR, DOCA-sal y ratas Goldblatt), la quercetina administrada de forma crónica previene el deterioro de la función vasodilatadora endotelial medida por la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina (Duarte *et al.*, 2001b; Galisteo *et al.*, 2004; Garcia-Saura *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2006). Estos efectos se producen en paralelo a un aumento de los NOx (nitritos + nitratos, los principales metabolitos de NO) en la orina. Todos estos modelos experimentales de hipertensión se han asociado a un aumento del estado oxidativo tanto a nivel plasmático como vascular y hepático, tal y como confirman los niveles de malondialdehído y de isoprostanos detectados en el plasma, en tejidos y en la orina procedentes de estos animales. Se ha demostrado que la quercetina disminuye de forma consistente los niveles de estos metabolitos (Duarte *et al.*, 2001b; Galisteo *et al.*, 2004;

García-Saura *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2006). En conjunto, estos resultados sugieren que la inactivación del NO mediante O_2^- juega un papel importante. Además, en ratas SHR que muestran una expresión elevada de la eNOS, acompañada de una paradójica reducción de su actividad, en comparación con sus controles WKY normotensas, la quercetina es capaz de normalizar ambos parámetros (Sanchez *et al.*, 2006). La quercetina es capaz de prevenir el aumento en los niveles de expresión de p47^{phox} inducidos por la angiotensina II y la endotelina-1 *in vitro* (Sanchez *et al.*, 2006). Por otra parte, la quercetina administrada de forma crónica, también es capaz de reducir algunos marcadores de disfunción endotelial en los ratones knockout para ApoE (Loke *et al.*, 2010) y en las ratas tratadas con una dieta con alto contenido en grasas y rica en sacarosa (Yamamoto *et al.*, 2006).

Por el contrario, la relajación a insulina dependiente del endotelio, que también está disminuida en las ratas SHR, no se mejoró tras el tratamiento crónico con quercetina (Romero *et al.*, 2010) a diferencia de la vasodilatación de acetilcolina dependiente del endotelio. El diferente efecto de quercetina sobre la relajación inducida por estas dos moléculas puede estar relacionado con las diferentes vías que la acetilcolina y la insulina utilizan para activar la eNOS. La acetilcolina es un agonista colinérgico clásico que activa la eNOS por un mecanismo dependiente de calcio. Sin embargo, la insulina es un vasodilatador independiente de calcio, cuyo efecto está mediado por un mecanismo dependiente de la fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3-K) y la fosforilación de la eNOS por la Akt (Montagnani *et al.*, 2001). De hecho, la fosforilación de Akt y de eNOS por la insulina se redujeron en anillos de aorta de ratas SHR y WKY tratadas con quercetina. Este efecto podría estar relacionado con un efecto inhibitorio directo de la quercetina sobre la PI3-K (Yoshizumi *et al.*, 2002).

Además, los cambios aparentes en la vasodilatación dependiente del endotelio podrían ser consecuencia del efecto opuesto de la liberación de prostanoïdes vasoconstrictores derivados del endotelio. La administración de quercetina de forma crónica, no modificó la vasoconstricción dependiente del endotelio en SHR (Duarte *et al.*, 2001b), pero la inhibió marcadamente en el modelo de hipertensión por administración crónica del inhibidor de la NOS L-NAME (Duarte *et al.*, 2002) y en el modelo de hipertensión por

estenosis unilateral de la arteria renal o modelo de ratas Goldblatt (Garcia-Saura *et al.*, 2005).

Las sirtuinas Sir2 y su análogo en mamíferos SIRT1 han sido implicados en el aumento de la esperanza de vida inducido por la restricción calórica (Cohen *et al.*, 2004) y, más recientemente, en la prevención del envejecimiento vascular (Ota *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la activación de SIRT1 promueve la vasodilatación dependiente del endotelio (Mattagajasingh *et al.*, 2007) y reduce la expresión del receptor de la angiotensina II (Miyazaki *et al.*, 2008). El descubrimiento del papel de las sirtuinas en el estrés oxidativo y la esperanza de vida nos abre un nuevo y fascinante campo de investigación en el área de los polifenoles, ya que varios polifenoles, incluyendo la quercetina, pueden activar las sirtuinas (Howitz *et al.*, 2003). De hecho, la quercetina aumenta la esperanza de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la del gusano *Caenorhabditis elegans* (Belinha *et al.*, 2007; Pietsch *et al.*, 2009). No obstante, algunos autores han puesto en duda que el efecto del resveratrol y posiblemente otros polifenoles sobre la esperanza de vida esté relacionado con las sirtuinas (Beher *et al.*, 2009; Burnett *et al.*, 2011). También cabe destacar que la quercetina inhibe la proliferación endotelial y la migración y la formación de vasos (Ahn *et al.*, 2009; Igura *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2006). Este efecto se asocia con una disminución de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y podría dar lugar a una disminución de la angiogénesis *in vivo* (Luo *et al.*, 2008). Por lo tanto, podría desempeñar un papel en los efectos quimiopreventivos de la quercetina contra los tumores sólidos. Varios estudios han demostrado que la quercetina y su glucurónido conjugado inhiben la proliferación y la hipertrofia, e inducen la apoptosis en los cultivos de células musculares lisas vasculares (Moon *et al.*, 2003; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006a; Yoshizumi *et al.*, 2002). Los efectos inhibitorios de la quercetina sobre la síntesis de ADN de las células vasculares del músculo liso estimuladas con el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) parecen estar relacionados con la reducción de la actividad ERK1/2, una quinasa que juega un papel importante en la proliferación y la diferenciación celular (Moon *et al.*, 2003). En células del músculo liso vascular estimuladas con angiotensina II y en células de músculo liso con fenotipo secretor (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006a), la quercetina inhibe la hipertrofia muscular a través de la inhibición de la vía JNK (Perez-

Vizcaino *et al.*, 2006a; Yoshizumi *et al.*, 2002). Estos efectos podrían ser también responsables de los efectos antihipertensivos y antiateroscleróticos de la quercetina.

2.2. Los flavonoles y las plaquetas

Los efectos antiagregantes plaquetarios de los flavonoles fueron descritos inicialmente por Beretz *et al.* (1982) y desde entonces se han propuesto varios mecanismos moleculares. Inicialmente se propuso que estos efectos se debían a sus efectos inhibitorios sobre las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos y, por lo tanto, a un aumento de AMP cíclico. Gryglewski *et al.* (1987) describieron que el efecto “*barredor*” de superóxido de los flavonoles en las plaquetas, el cual “podía resucitar la biosíntesis y la acción de la prostaciclina endotelial y del factor de relajación derivado del endotelio (EDRF)”, explicaba sus efectos antitrombóticos. Más tarde se descubrió que la quercetina inhibe la activación de NADPH oxidasa dependiente de PKC en las plaquetas (Pignatelli *et al.*, 2006). Hallazgos todavía más recientes, sugieren que los efectos antiagregantes se asocian al bloqueo de la actividad quinasa Fyn y a la fosforilación de la tirosina Syk y la fosfolipasa $G\gamma$ (Wright *et al.*, 2010). Sin embargo, los efectos antiagregantes *in vivo* de la quercetina han sido cuestionados por numerosos investigadores. En un estudio en humanos, en el que a través de la cebolla se ingería 114 mg de quercetina por día, no se observaron cambios en la agregación plaquetaria, ni en la producción de tromboxano B₂, el factor VII o en otras variables hemostáticas (Janssen *et al.*, 1998).

2.3. Los flavonoides y la hipertensión

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los factores de riesgo más importantes en la aparición de los accidentes cerebrovasculares, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, la insuficiencia renal y la arteriopatía periférica. El tratamiento con cualquiera de los regímenes antihipertensivos habituales reduce el riesgo total de eventos cardiovasculares mayores. Se ha observado que una mayor reducción en la presión arterial se acompaña de una mayor reducción del riesgo (Turnbull, 2003).

Bajo condiciones experimentales rigurosamente controladas, se ha observado que el consumo de frutas y verduras se asocia con una disminución de la presión arterial (Dauchet *et al.*, 2009). Sin embargo, los efectos de frutas y verduras en los niveles de lípidos en el plasma, en la diabetes, y en el peso corporal no son tan claros (Dauchet *et al.*, 2009).

El primer trabajo sobre los efectos antihipertensivos de la quercetina se llevó a cabo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), un modelo genético de hipertensión multifactorial (Duarte *et al.*, 1993b). Este estudio fue confirmado y ampliado por otros (Carlstrom *et al.*, 2007; Machha *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2006) y seguido por otros trabajos en otros modelos clásicos hipertensión en rata, como el de hipertensión inducida por la inhibición de la NO sintasa con L-NAME (Duarte *et al.*, 2002), en el modelo de hipertensión inducida por acetildeoxicorticosterona en rata (DOCA-sal) (Galisteo *et al.*, 2004), el modelo de hipertensión por estenosis unilateral de la arteria renal o modelo de ratas Goldblatt (Garcia-Saura *et al.*, 2005), en las ratas Dahl sensibles a la sal (Aoi *et al.*, 2004; Mackraj *et al.*, 2008) y en el modelo de hipertensión por coartación de la aorta (Jalili *et al.*, 2006). Además, la quercetina también redujo la presión arterial en modelos animales de resistencia a la insulina y de síndrome metabólico, como las ratas Zucker obesas (Rivera *et al.*, 2008b) y en las ratas alimentadas con un alto contenido de grasas y una dieta rica en sacarosa (Yamamoto *et al.*, 2006). Por lo tanto, la quercetina ha demostrado efectos antihipertensivos cuando se administra de forma crónica en los modelos más comunes de hipertensión en roedores. La dosis más frecuentemente empleada en estos estudios es de 10 mg kg⁻¹ por día, pero las dosis efectivas usadas van desde 2 a 300 mg kg⁻¹ por día. El efecto antihipertensivo es dosis dependiente y afecta a la presión sistólica, diastólica y la presión arterial media. Este efecto suele comenzar durante la primera semana de tratamiento y se mantiene durante todo el período de tratamiento. Curiosamente, la reducción de la presión arterial es eficaz hasta al menos 48 h después de la interrupción del tratamiento. Sorprendentemente, la quercetina ha demostrado ser eficaz en todos los modelos de hipertensión analizados, independientemente del origen de la hipertensión, del estado del sistema renina-angiotensina, del estrés oxidativo, del óxido nítrico, y de otros

factores. Sin embargo, la quercetina no ejerce efectos hipotensores, es decir, no tiene ningún efecto en los animales normotensos.

De acuerdo con la llamada "hipótesis de Barker", fuertemente apoyada por los estudios epidemiológicos en humanos y en animales, muchas de las enfermedades crónicas en adultos, como la diabetes tipo 2, la obesidad y la hipertensión pueden tener su origen en la vida fetal debido a cambios en la programación genética (Barker, 1998). En este sentido, los hijos adultos de las ratas o los ratones alimentados con una dieta alta en grasas durante el embarazo mostraron hiperglucemia, resistencia a la insulina, obesidad e hipertensión, a pesar de ser alimentados con una dieta estándar a lo largo de su vida postnatal (Buckley *et al.*, 2005). Recientemente, un estudio muy interesante (Liang *et al.*, 2009b) mostró que estos efectos se reducían si durante el embarazo la dieta de los animales contenía también un suplemento de quercetina. Estos resultados sugieren que la quercetina puede prevenir la programación epigenética durante la vida pre-natal.

Una presión arterial alta y sostenida es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de enfermedades cardíacas, vasculares y renales. La mayoría de los beneficios que muestra el tratamiento antihipertensivo en el daño inducido en órganos diana son debidos a la capacidad de estas estrategias terapéuticas para reducir la presión arterial, de forma totalmente independiente de la clase de fármaco empleada (Turnbull, 2003). Se ha demostrado que la quercetina produce una reducción de la hipertrofia ventricular izquierda en ratas SHR (Duarte *et al.*, 1993b), en ratas tratadas con desoxicorticosterona (DOCA-salt) (Galisteo *et al.*, 2004), las ratas hipertensas Goldblatt (Garcia-Saura *et al.*, 2005), y en las ratas hipertensas con constricción de aorta (Jalili *et al.*, 2006). Este flavonol también produjo efectos protectores tanto en la estructura como en la función renal en modelos animales de hipertensión como son las ratas deficientes en NO (Duarte *et al.*, 2002), las ratas DOCA-sal (Galisteo *et al.*, 2004), el modelo de hipertensión de rata Goldblatt (Garcia-Saura *et al.*, 2005) y las ratas Dahl sensibles a la sal (Aoi *et al.*, 2004; Mackraj *et al.*, 2008). En estos modelos también se ha descrito que la quercetina tenía un efecto protector sobre la función endotelial como hemos revisado anteriormente.

Recientemente se han publicado cinco ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego, y controlados con placebo, analizando los efectos de la quercetina en la presión arterial. En el primero de ellos, llevado a cabo en voluntarios sanos (Conquer *et al.*, 1998), el consumo de quercetina no modificó de forma significativa los factores de riesgo cardiovascular incluyendo la presión arterial. Esta ausencia de efecto en los humanos sanos no tiene por qué ser sorprendente ya que previamente se ha observado también una ausencia de efecto en los animales sanos. En el estudio de Edwards *et al.* (2007), los pacientes con hipertensión en fase 1 mostraron una reducción de la presión sistólica, de la presión diastólica y de la presión arterial media después del tratamiento con quercetina, sin embargo no se observó ningún efecto significativo en los pacientes prehipertensos. En el estudio de Egert *et al.* (2009), los pacientes con síndrome metabólico se clasificaron de acuerdo a sus fenotipos apoE. La quercetina indujo una disminución de la presión arterial sistólica en el grupo con fenotipo apoE₃, el más común en la población caucásica, mientras que no se observó ningún efecto significativo en los pacientes con el fenotipo apoE₄, menos frecuente pero que se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular. Además, la quercetina no tuvo ningún efecto sobre el perfil lipídico en los ApoE₃, e incluso ejerció un efecto perjudicial en el subgrupo de ApoE₄ con disminución del colesterol HDL en suero y un aumento en el ratio del colesterol HDL/LDL. En otro estudio reciente en fumadores prehipertensos, la quercetina también redujo la presión arterial sistólica (Knab *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). En un estudio que incluía un número elevado de individuos jóvenes y sanos (n= 1002) con valores bajos de presión arterial de partida (Knab *et al.*, 2011), la quercetina produjo una reducción modesta pero significativa de la presión arterial.

2.4. Los flavonoides y la aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por el engrosamiento de la pared arterial causada por la deposición de materiales grasos a lo largo de los años. Los síntomas se manifiestan de forma aguda en las últimas etapas de la enfermedad pero las alteraciones en el perfil lipídico constituyen un marcador precoz y crucial en el desarrollo de la aterosclerosis. El estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial están asociados a la patogénesis de la aterosclerosis. El consumo

de dosis bajas de quercetina redujo la progresión de la aterosclerosis en ratones knockout ApoE (Hayek *et al.*, 1997; Loke *et al.*, 2010). La quercetina fue más efectiva que otros flavonoides, como [la (-)-epicatequina (flavan-3-ol), la teaflavina (catequina dimérica)] y otros polifenoles [sesamina (lignan) o el ácido clorogénico (ácido fenólico)] (Loke *et al.*, 2010).

El efecto protector de los flavonoides contra la aterosclerosis podría estar mediado por la prevención de uno o varios de los procesos implicados en la progresión de la enfermedad, como el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial. Tal y como se ha comentado en el apartado anterior, la mayoría de los estudios han demostrado que la quercetina no tiene ningún efecto beneficioso sobre el perfil lipídico plasmático. El colesterol LDL o HDL en plasma no se encuentra modificado en los ratones knockout ApoE (Hayek *et al.*, 1997), ni en las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas o en sacarosa (Yamamoto *et al.*, 2006) ni en los seres humanos con sobrepeso y con un fenotipo ApoE₃ y puede incluso reducir la relación HDL/LDL en los portadores de fenotipo ApoE₄ (Egert *et al.*, 2009). Por el contrario, se ha demostrado una reducción en los niveles séricos de triglicéridos y colesterol en conejos alimentados con una dieta alta en colesterol (Kamada *et al.*, 2005). Aparte de los efectos sobre los lípidos plasmáticos, la quercetina inhibe los pasos cruciales en el desarrollo de la aterosclerosis como la susceptibilidad de LDL a la oxidación (Frankel *et al.*, 1993; Hayek *et al.*, 1997), la citotoxicidad inducida por LDL (Negre-Salvayre *et al.*, 1992) y la formación de estrías grasas en la aorta (Auger *et al.*, 2005). Curiosamente, los metabolitos de la quercetina se acumulan en las lesiones ateroscleróticas humanas, pero no en la aorta sana (Kawai *et al.*, 2008). En ratones ApoE^{-/-}, la quercetina también redujo significativamente los isoprostanos F₂ en la aorta, el superóxido y los leucotrienos B₄ vasculares, las concentraciones plasmáticas de P-selectina soluble y aumentó el NO y la hemooxigenasa-1 (Loke *et al.*, 2010).

Las moléculas de adhesión y las metaloproteinasas de la matriz son proteínas clave para varios de los procesos involucrados en la formación de placa aterosclerótica, como la infiltración de células inflamatorias. La quercetina fue capaz de reducir el aumento inducido por el TNF- α en las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1,

tanto a nivel de la proteína como del ARNm, en el endotelio humano y en las células del músculo liso vascular. El efecto inhibitorio sobre la expresión de ICAM-1 parece estar mediado a través de una inhibición de la vía JNK/AP-1 (Kobuchi *et al.*, 1999). Sin embargo, los metabolitos de la quercetina, la quercetina-3'-sulfato, quercetina-3-glucurónido y 3'-methylquercetina-3-glucurónido no mostraron apenas efecto (Tribolo *et al.*, 2008; Winterbone *et al.*, 2009). Además, la quercetina también puede preservar la actividad paraoxonasa sérica humana (PON1) (Aviram *et al.*, 1999) y aumentar su expresión (Gong *et al.*, 2009), un mecanismo adicional que permite proteger al colesterol LDL de la oxidación y desempeña un papel protector en la aterosclerosis. Sin embargo, los efectos de los flavonoles aislados en el desarrollo de la aterosclerosis en humanos no han sido estudiados.

Los mecanismos moleculares subyacentes mediante los que la quercetina puede inhibir la expresión de genes inflamatorios aún no han sido completamente aclarados. La quercetina y otros flavonoides inhiben la producción de TNF- α , así como la expresión de la NOS inducible (iNOS) y la producción de NO en macrófagos activados por lipopolisacáridos, un efecto que se ha asociado con la inhibición de la vía NF-kB, a través de la inhibición de la fosforilación de I κ B- α (Comalada *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descrito que las propiedades anti-inflamatorias de la quercetina y la isoramnetina en los macrófagos RAW264.7 se acompañan de un aumento en los niveles de la proteína hemooxigenasa 1, una diana del factor de transcripción Nrf2, conocido por ser un antagonista de la inflamación crónica (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2010a). Además, la quercetina y la isoramnetina pero no la quercetina-3-glucurónido, reducen los niveles de expresión del microARN proinflamatorio mir155.

2.5. Los flavonoles, la resistencia a la insulina y la obesidad

La resistencia a la insulina se define como una respuesta atenuada o inadecuada para una determinada cantidad de insulina y está asociada con una amplia variedad de patologías como la obesidad, la diabetes tipo 2, la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares, el síndrome del ovario poliquístico, el hígado graso no

alcohólico, el cáncer de mama y el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (Kim *et al.*, 2006a).

2.5.1 La obesidad

La obesidad surge de un desequilibrio entre el consumo energético y el gasto energético, que conduce al crecimiento patológico de los adipocitos, incluyendo la hipertrofia de los adipocitos y la generación de nuevos adipocitos a partir de sus células precursoras. La quercetina es capaz de reducir la adipogénesis y de disminuir la expresión de los factores y las enzimas relacionadas con la adipogénesis. Además, el tratamiento con quercetina de los adipocitos 3T3-L1 induce la apoptosis y disminuye la fosforilación de ERK y JNK (Ahn *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Las nuevas opciones de tratamiento y prevención para la obesidad y la diabetes tipo 2 podrían estar basadas en las estrategias para frenar o inhibir la absorción de grasas, la absorción del colesterol y el catabolismo intestinal de los carbohidratos complejos. Nuevas evidencias indican que el transportador de glucosa tipo 2 GLUT2 es una importante vía de la absorción de azúcar, y por lo tanto una diana atractiva para estos fármacos (Kellett *et al.*, 2005). Los flavonoles quercetina, miricetina, fisetina y su precursor isoquercetina-glucósido produce una inhibición no competitiva del transportador de glucosa y fructosa (GLUT2) expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Los otros dos principales transportadores de azúcar intestinal, GLUT5 y SGLT1, no se vieron afectados los flavonoides. La quercetina inhibió de forma similar el transporte de azúcares mediado por GLUT2, tanto en las células de la hipófisis, donde el transportador se encontraba sobreexpresado, así como en las células intestinales Caco-2E donde se expresa de forma natural (Kwon *et al.*, 2007). De esta manera se pueden obtener dos beneficios importantes: la reducción de la hiperglucemia postprandial en pacientes diabéticos y en pacientes con una leve intolerancia a la glucosa; y la reducción de la cantidad total de glucosa absorbida y, por tanto, una reducción de calorías y peso. Debido a que la quercetina podría actuar como un potente inhibidor de la absorción de azúcares, los flavonoides parecen ser unos prometedores nuevos agentes farmacológicos de la obesidad. Sin embargo, cuando la quercetina fue probada en roedores obesos y en seres humanos, no se observó una clara disminución del peso corporal. En ratas Zucker obesas con una administración oral diaria durante 10 semanas de 2 o 10 mg / kg de quercetina, solo la dosis más alta

produjo una reducción en el aumento del peso corporal (Rivera *et al.*, 2008b). Del mismo modo, en ratas con una dieta de alto contenido en grasas y sacarosa sólo se observó a dosis altas de quercetina (0,2% y 0,5% en la dieta) una reducción en el aumento del peso corporal (Yamamoto *et al.*, 2006). En un modelo en ratones de obesidad inducida por la dieta, una dieta suplementada con una dosis alta de quercetina (un 0,8% de la dieta) produjo aumentos transitorios del gasto de energía pero que no se detectaron más allá de 8 semanas (Stewart *et al.*, 2008). Asimismo, los sujetos con sobrepeso-obesidad que recibieron 150 mg/día de quercetina durante 6 semanas no tuvieron cambios significativos en parámetros del estado nutricional como son el peso corporal, la longitud del circunferencia de la cintura, la masa grasa o la masa libre de grasa (Egert *et al.*, 2009).

2.5.2. Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina surge a partir de una compleja interacción entre la sobrecarga de nutrientes, el exceso sistémico de ácidos grasos, la inflamación del tejido adiposo, el retículo endoplásmico y el estrés oxidativo (Hotamisligil, 2006) así como la hipoxia del tejido adiposo (Regazzetti *et al.*, 2009). La acción de la insulina es iniciada por su unión a los receptores de insulina, seguida de la autofosforilación y la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS) y una compleja cascada de quinasas y mediadores intracelulares (Sesti, 2006). Estos incluyen la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3-K), el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) y la proteína quinasa B/Akt, así como la isoforma atípica de la proteína quinasa C λ_1 (Stump *et al.*, 2006). La acumulación de los intermediarios lipídicos tales como los triglicéridos, el diacilglicerol y la ceramida, se sabe que activan las proteínas quinasas JNK-AP-1, IKK-NF- κ B y la PKC inhibiendo la acción de la insulina, lo que actúa como mecanismo de retroalimentación negativa (Yu *et al.*, 2002).

Como hemos mencionado anteriormente, un posible mecanismo por el que la quercetina podría ser beneficiosa en la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 es mediante la inhibición de los transportadores de glucosa intestinal. De hecho, la quercetina inhibe la alfa-glucosidasa (Li *et al.*, 2009), inhibiendo la absorción intestinal de los carbohidratos de forma más potente que la acarbosa, y reduciendo, por tanto, la hiperglucemia

postprandial. Se ha observado que tanto la quercetina como el resto de los flavonoles relacionados pueden tanto inhibir (Nomura *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2005) como aumentar (Fang *et al.*, 2008) la absorción de glucosa inducida por la insulina en los adipocitos. Estas acciones opuestas se pueden explicar por la capacidad de los flavonoles tanto de inhibir la actividad de las quinasas implicadas en la señalización de la insulina como de inhibir las quinasas involucradas en el desarrollo de resistencia a la insulina en varios tejidos (Dias *et al.*, 2005; Granado-Serrano *et al.*, 2010; Perez-Vizcaino *et al.*, 2006b). Además, el efecto inhibitorio de la quercetina y la miricetina sobre la captación de metilglucosa estimulada por la insulina de los adipocitos, se ha relacionado con un mecanismo de inhibición del transporte por los flavonoides a través de la acción directa sobre GLUT4, en lugar de por un mecanismo relacionado con la inhibición de proteína-quinasa y la inhibición de señalización de la insulina (Strobel *et al.*, 2005). Por otra parte, una mayor absorción de glucosa también puede estar relacionada con la interacción con los receptores PPAR. Aunque tanto el kaempferol como la quercetina son capaces de comportarse como agonistas parciales débiles de los PPAR γ , a diferencia de los agonistas tradicionales PPAR γ , no fueron capaces de inducir la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 (Fang *et al.*, 2008). De hecho, la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 fue inhibida tras la exposición de estos al kaempferol y a la quercetina en presencia del agonista de PPAR γ rosiglitazona. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK) también regula el transporte de la glucosa en el músculo esquelético (Bergeron *et al.*, 1999; Fryer *et al.*, 2002). La exposición a quercetina aumenta los niveles de AMPK fosforilada y de su sustrato, la acetil-CoA carboxilasa (ACC). La quercetina y otros flavonoides pueden activar la AMPK en hepatocitos humanos (células HepG2) a través de la activación del análogo de sirtuinas SIRT1 (Suchankova *et al.*, 2009). Por otra parte, en las células de músculo esquelético C2C12, la quercetina mejora la captación de la glucosa en ausencia de insulina, lo cual está relacionado con la activación de la AMPK (Eid *et al.*, 2010).

Los estudios *in vivo* sobre el efecto de los flavonoides en la resistencia a la insulina también muestran resultados contradictorios. En las ratas Zucker obesas, tratadas con una administración oral diaria de 2 o 10 mg/kg de quercetina durante 10 semanas, se observó una reducción de la dislipidemia, la resistencia a la insulina y la hipertensión

(Rivera *et al.*, 2008b). La quercetina redujo además la producción de TNF- α y la expresión de la iNOS por el tejido adiposo visceral y el aumento de la concentración plasmática de adiponectina (Rivera *et al.*, 2008b), así como marcadores circulantes de inflamación (interferon- α , la interleuquina-1 α , y la interleuquina-4) en el modelo de obesidad inducida por la dieta (Stewart *et al.*, 2008). Sin embargo, la quercetina no es capaz de mejorar la resistencia a la insulina ni en el modelo de obesidad inducida por la dieta ni en las ratas SHR, que no sólo son genéticamente hipertensas, sino que también muestran resistencia de insulina (Reaven *et al.*, 1991); (Romero *et al.*, 2010).

La generación de estrés oxidativo afecta a la secreción de insulina desde las células β pancreáticas (Bast *et al.*, 2002). Los flavonoides pueden preservar la función de las células β mediante una reducción del estrés oxidativo inducido por el daño tisular y por lo tanto, proteger contra la progresión de la resistencia a la insulina de la diabetes tipo 2. De hecho, la quercetina, el flavonol principal de la dieta, previene y protege del estrés oxidativo inducido por estreptozotocina y del daño en las células β del páncreas de rata (Coskun *et al.*, 2005) así como la disminución de la concentración de glucosa en sangre, tanto en ratas diabéticas inducidas por aloxano como por estreptozotocina (Coskun *et al.*, 2005; Kobori *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2009a; Nuraliev *et al.*, 1992), que son dos modelos de diabetes tipo 1.

En un estudio reciente, Liang *et al.* (2009a) mostraron que la suplementación con quercetina mitigaba de forma significativa la diabetes mellitus gestacional inducida por estrés oxidativo en la placenta, utilizando un modelo en ratones. A pesar del papel crucial de la resistencia a la insulina en el desarrollo de la aterosclerosis y el riesgo cardiovascular, no hay estudios en humanos que aborden el efecto de una dieta suplementada de forma crónica con flavonoles como una estrategia terapéutica para tratar la resistencia a la insulina. Hay dos estudios epidemiológicos que analizan la relación entre la ingesta de flavonoides y la diabetes tipo 2, que muestran resultados contradictorios. En el primer estudio (Knekt *et al.*, 2002) se observó que existía una tendencia entre una mayor ingesta de quercetina y de miricetina y una reducción en el riesgo de diabetes tipo 2, mientras que en un gran estudio realizado con mujeres estadounidenses que no presentaban enfermedades cardiovasculares, el alto consumo de

flavonoles y flavonas no se asociaba de forma significativa con una disminución en el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina (Song *et al.*, 2005).

2.6. Los flavonoides y la cardiopatía isquémica

La cardiopatía crónica y los síndromes coronarios agudos incluyen múltiples alteraciones en la reactividad vascular, la estructura vascular e interacciones entre la pared del vaso y los elementos presentes en la sangre. La hipertensión y la aterosclerosis son los principales factores de riesgo de infarto de miocardio y un gran número de evidencias indican que la reducción del colesterol LDL, la prevención de la aterosclerosis y el control de la presión arterial conducen a un descenso espectacular en el riesgo de enfermedad coronaria (Turnbull, 2003). Además, la disfunción endotelial es un marcador pronóstico del infarto de miocardio (Schachinger *et al.*, 2000; Widlansky *et al.*, 2003). Los flavonoles previniendo la hipertensión, la aterosclerosis y la disfunción endotelial, tal como hemos revisado anteriormente, pueden proteger a las arterias coronarias a largo plazo.

La mayoría de los eventos coronarios agudos se deben a la ruptura de la placa aterosclerótica, a la formación de trombos y a la posterior isquemia miocárdica. La quercetina reduce la expresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) (Huang *et al.*, 1999) y puede ayudar en la estabilización de la placa aterosclerótica (Motoyama *et al.*, 2009). El vasoespasmo coronario también puede contribuir a un daño agudo del flujo arterial. Los flavonoles por sus efectos antiagregantes plaquetarios y vasodilatadores, también revisados anteriormente, pueden proporcionar un beneficio adicional de protección en la fase aguda. Durante el evento isquémico y la eventual reperfusión post-isquémica existe un proceso inflamatorio agudo con la liberación de múltiples citoquinas y especies reactivas de oxígeno. La reperfusión post-isquemia que ocurre en las enfermedades coronarias, generalmente se asocia con una reducción de la producción de NO endógeno resultante de la disfunción endotelial y del daño tisular relacionado con la infiltración de neutrófilos. Los estudios experimentales en modelos animales en los que la isquemia es inducida de forma aguda por ligadura de la arteria coronaria o por infusión de isoproterenol, han demostrado que la quercetina *in vivo* o *ex*

vivo reduce la disfunción contráctil del corazón, el tamaño de la zona infartada y los cambios en el patrón de expresión de las proteínas (incluyendo iNOS y NOX2) inducidas por la isquemia cardiaca (Annapurna *et al.*, 2009; Brookes *et al.*, 2002; Punithavathi *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2009). La mayoría de los trabajos asocian el efecto protector sobre el corazón a los efectos antioxidantes de la quercetina. La capacidad de los flavonoides para proteger al NO, juega probablemente un papel crucial en la prevención del daño isquémico.

En el estudio epidemiológico (Hertog *et al.*, 1993), la ingesta de flavonoides (analizados en tertiles) se asoció inversamente con la mortalidad por enfermedad coronaria [riesgo relativo 0,42 (IC 95% 0.20-0.88)] después del ajuste por los factores de riesgo conocido y por otros componentes de la dieta. También se observó una relación inversa con la incidencia de infarto de miocardio aunque en este caso no alcanzó significación estadística. En un meta-análisis posterior en el que se analizaron varios estudios de cohorte prospectivos, se concluyó que los individuos que se encontraban en el tercio superior de la ingesta de dieta de flavonoides se asocian con un menor riesgo de la mortalidad por enfermedad coronaria en comparación con aquellos situados en el tercio inferior [0,80 (95% CI 0.69-0.93)] (Huxley *et al.*, 2003).

2.7. Los flavonoides y los accidentes cerebrovasculares

La primera causa de ictus es una interrupción del flujo sanguíneo cerebral que ocurre durante la obstrucción vascular por un tromboembolismo o una trombosis local. Los procesos fisiopatológicos del ictus son complejos y dependen de la gravedad, la duración y la localización de la lesión isquémica en el cerebro. Los principales factores de riesgo que conducen a la aparición del accidente cerebrovascular son la hipertensión, la aterosclerosis, LDL-colesterol, la diabetes y la fibrilación auricular. Los flavonoides han sido propuestos como agentes eficaces, tanto en la prevención como en el tratamiento en la fase aguda del ictus (Simonyi *et al.*, 2005). Como se describió anteriormente, los flavonoles previenen la disfunción endotelial, la aterosclerosis, la hipertensión y la trombosis, es decir, previenen todos los mecanismos potenciales causantes del ictus. Los flavonoles pueden actuar en diferentes fases del ictus (Figura

5). En la fase aguda, los flavonoles mejoran el flujo sanguíneo cerebral, previniendo la agregación plaquetaria y la trombosis, reduciendo la excitotoxicidad e inhibiendo el estrés oxidativo. En la fase intermedia, los flavonoles reducen la inflamación y protegen la integridad del endotelio. En la última fase, los flavonoles intervienen en la isquemia inducida por los mecanismos de muerte celular como la apoptosis y la necrosis. La quercetina y el kaempferol inhiben, *in vitro*, la excitotoxicidad. De hecho, ambos compuestos reducen significativamente la muerte neuronal causada por el kainato y el N-metil-D-aspartato (Silva *et al.*, 2008). La neuroprotección observada se correlacionó con la prevención en la desregulación del calcio y con el mantenimiento del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial. Estos flavonoides reducen la peroxidación lipídica mitocondrial y la pérdida del potencial eléctrico transmembrana mitocondrial causada por el estrés oxidativo inducido por ADP y hierro. Por lo tanto, la acción neuroprotectora inducida por la quercetina y el kaempferol es atribuida principalmente a sus efectos antioxidantes (Silva *et al.*, 2008). Además, la quercetina abolió el aumento en los los receptores IP3 inducido por la hipoxia en las células granulares del cerebelo de rata y reguló el calcio intracelular (Jurkovicova *et al.*, 2007). La quercetina también protege eficazmente las neuronas del cerebelo y las neuronas dopaminérgicas mesoencefálicas de la muerte inducida por el estrés oxidativo (Echeverry *et al.*, 2010; Mercer *et al.*, 2005).

In vivo, utilizando el modelo de oclusión de cuatro vasos en ratas, la quercetina mostró tener propiedades “*barredor*” del superóxido liberado durante la reperfusión después de la isquemia cerebral (Shutenko *et al.*, 1999). En otro estudio, la reducción global de isquemia inducida por el daño neuronal se atribuye a la inhibición de la actividad de MMP-9 (Cho *et al.*, 2006). Sin embargo, en un modelo de daño neuronal oxidativo *in vivo* mediante la infusión unilateral de 6-hidroxidopamina (Zbarsky *et al.*, 2005), ni la quercetina, ni la fisetina tuvieron ningún efecto sobre la pérdida de células positivas a tirosina hidroxilasa en la sustancia negra. La falta de efecto de la quercetina en algunos modelos *in vivo* a pesar de los efectos neuroprotectores encontrados *in vitro* sobre el daño inducido por diferentes estímulos es probablemente debido a las dificultades para cruzar la barrera hematoencefálica y penetrar en el cerebro. Además, los metabolitos de la quercetina parecen ser menos neuroprotectores y penetran en la barrera

hematoencefálica con menos eficiencia que las formas aglicona. Sin embargo, el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica puede ocurrir bajo condiciones inflamatorias como ocurre en el ictus donde, por tanto, la penetración de quercetina en el cerebro estaría facilitada. Cuando se administraron los flavonoides conjugados con lecitina para facilitar el paso de la barrera hematoencefálica, el tratamiento de la isquemia focal permanente con esta preparación lecitina/quercetina redujo el volumen de la lesión (Dajas *et al.*, 2003). El efecto protector en la lesión isquémica fue demostrado gracias a un aumento significativo en el número de las células en el cuerpo estriado y la corteza, junto con una reversión parcial de los déficits motores. Por otra parte, los niveles de glutatión reducido (GSH) en el cuerpo estriado y la corteza ipsilateral disminuyen después de la isquemia, y la preparación liposomal de quercetina revertió estos efectos 24 horas después de la oclusión arterial cerebral media permanente (Rivera *et al.*, 2008a).

La administración crónica de la quercetina tiene propiedades antiinflamatorias en el cerebro. De hecho, en los ratones tratados con lipopolisacárido (LPS), la quercetina inhibe la expresión de las enzimas proinflamatorias COX2 e iNOS, revirtiendo el déficit de memoria inducido por el LPS (Patil *et al.*, 2003). La acción antiinflamatoria de la quercetina podría ser atribuible a su capacidad para modificar las balsas lipídicas (microdominios especializados de la membrana celular) y sus efectos antioxidantes. Estos diferentes mecanismos pueden actuar de forma sinérgica inhibiendo la expresión de iNOS y la producción de NO (Kao *et al.*, 2010). Sharma *et al.* (2007) demostraron que los flavonoides confieren protección contra el daño neuronal inducido por IL-1 β a través de los siguientes mecanismos: (i) aumentando el potencial de activación de los astrocitos para la detoxificación de los radicales libres a través de la superóxido dismutasa-1 y la tioredoxina, (ii) la reducción de la expresión de citoquinas (IL-6) y quimiocinas (IL-8, IP-10, MCP-1 y RANTES) proinflamatorias, y (iii) la modulación de la expresión de los mediadores asociados con una mayor actividad fisiológica de los astrocitos en respuesta a una lesión.

Hay varios estudios epidemiológicos sobre el análisis de la relación entre la ingesta de flavonoides y el ictus. El estudio Zutphen encontró una asociación inversa entre el ictus

y el aumento del consumo de flavonoides dietéticos (principalmente quercetina) después del ajuste para otros factores de riesgo, incluyendo la ingesta de vitaminas (Keli *et al.*, 1996). Estudios posteriores (Knekt *et al.*, 2000; Yochum *et al.*, 1999) conducidos en Finlandia y EE.UU., respectivamente, mostraron que el riesgo relativo de ictus era similar entre los sujetos con un consumo alto o bajo de flavonoles. Por lo tanto, los autores concluyeron que el consumo de quercetina no está asociado a una menor incidencia de ictus. Sin embargo, muy recientemente, un meta-análisis de seis estudios prospectivos de cohorte (Hollman *et al.*, 2010) demostró que una alta ingesta de flavonoles en comparación con una baja ingesta se asociaba inversamente con el ictus fatal y no fatal con un riesgo relativo de 0,80 (IC 95%: 0,65 a 0,98). Incluso habiendo indicios de sesgo en los resultados mostrados, se concluyó que los flavonoles podrían reducir el riesgo de ictus.

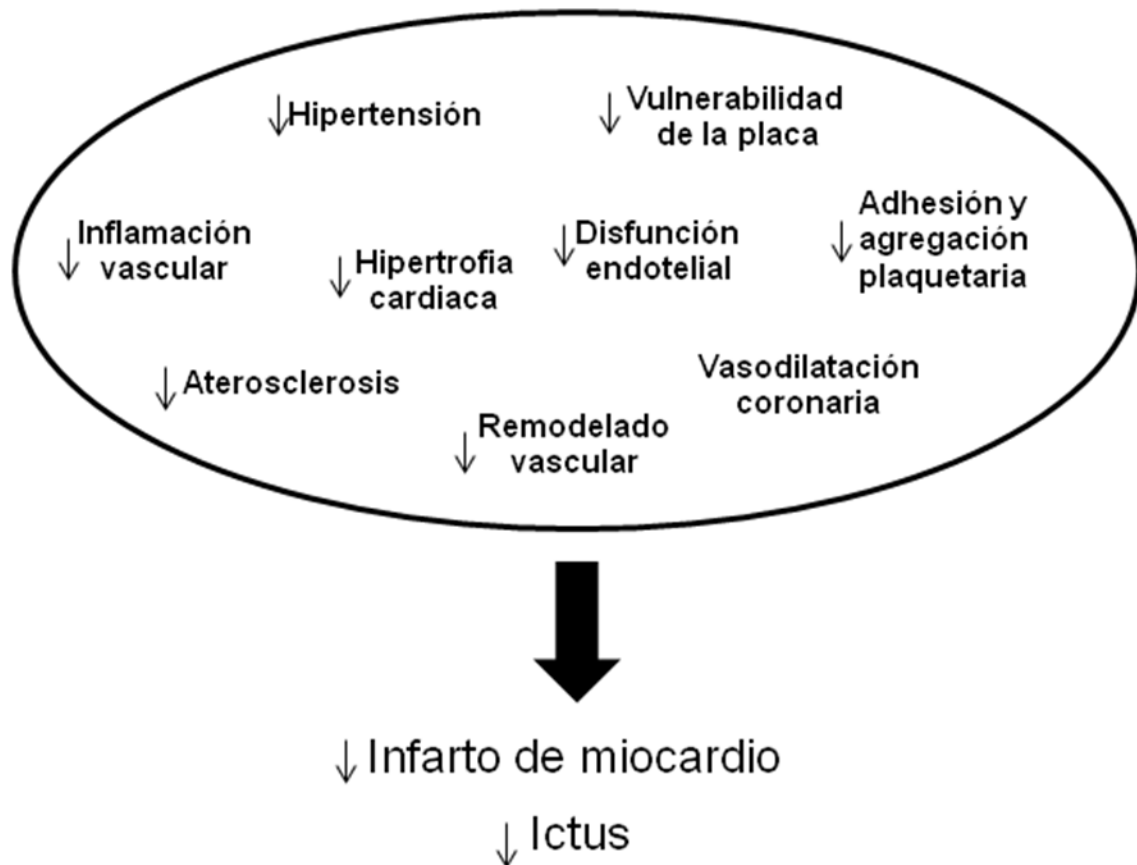


Figura 5. Esquema sobre los mecanismos potenciales por los cuales la quercetina podría disminuir el riesgo de infarto de miocardio e ictus. Modificado de Perez-Vizcaino *et al.* (2010).

3. La farmacocinética de los flavonoides

El conocimiento de la farmacocinética de los flavonoides es esencial para la interpretación de su actividad biológica *in vivo* a partir de los resultados obtenidos *in vitro*. En las últimas décadas, se ha producido un gran avance en este campo (Figura 6), pero aún hoy, el metabolismo y la distribución de los flavonoides y las consecuencias en su actividad biológica siguen siendo objeto de discusión científica.

Si nos remontamos al descubrimiento de estos compuestos en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Albert Szent- Györgyi, el primer estudio sobre la farmacocinética de estos compuestos se llevó a cabo por el U.S. Council on Foods and Nutrition, para esclarecer las dudas acerca de su denominación como “vitamina P”. Este informe concluyó que los flavonoides eran probablemente destruidos en el tracto gastrointestinal, lo que llevó a reforzar el escepticismo existente sobre la “vitamina P” (Clark *et al.*, 1950). Durante la década de los 50 y 60, el conocimiento de la absorción y metabolismo de los flavonoides aumentó gracias principalmente al trabajo de Booth, Das y Griffiths, que publicaron un extenso número de artículos explorando las vías metabólicas de varios flavonoides en animales. Varias revisiones describen estos hallazgos (Griffiths *et al.*, 1978; Hackett, 1986; Kuhnau, 1976). Sin embargo, la mayoría de estos estudios utilizaban dosis demasiado elevadas, seguramente debido a que las técnicas analíticas usadas entonces para la identificación de los metabolitos eran poco sensibles. Los primeros estudios farmacocinéticos en humanos (Gugler *et al.*, 1975), demostraron que la absorción oral de la quercetina era mínima y que no se alcanzaban concentraciones significativas en el plasma o en la orina, siendo indetectables para las técnicas analíticas disponibles en aquel momento. Los autores concluyeron, por tanto, que la administración oral de los flavonoides carecía de cualquier interés. Los estudios posteriores confirmaron que la absorción era solo parcial y que las concentraciones de quercetina como aglicona eran indetectables en el plasma (Day *et al.*, 2001).

En los últimos años varias revisiones han analizado la farmacocinética de los flavonoides en mamíferos (Hollman *et al.*, 1998; Manach *et al.*, 1995; Scalbert *et al.*,

2000; Williamson, 2004). Hoy en día sabemos que el organismo reconoce a los flavonoles como compuestos xenobióticos, sometiéndolos a reacciones metabólicas para crear compuestos no tóxicos mediante reacciones enzimáticas de fase II (Spencer *et al.*, 2004; Walle, 2004). Estas reacciones metabólicas así como la absorción de los flavonoles se llevan a cabo en el intestino delgado y el intestino grueso (Scalbert *et al.*, 2000), es decir, los flavonoles ingeridos en la dieta son transformados en sus metabolitos conjugados antes de entrar en el torrente sanguíneo.

Todos los flavonoides presentan unas vías comunes de absorción y metabolismo, desde las pobremente absorbidas antocianinas, hasta las mejor absorbidas isoflavonas. Las diferencias en la biodisponibilidad de los flavonoides dependen de la especificidad y actividad de los transportadores, la especificidad y actividad de las enzimas metabólicas, la estabilidad de los flavonoides, su estructura química y de si la molécula está conjugada o no (Williamson *et al.*, 2000).

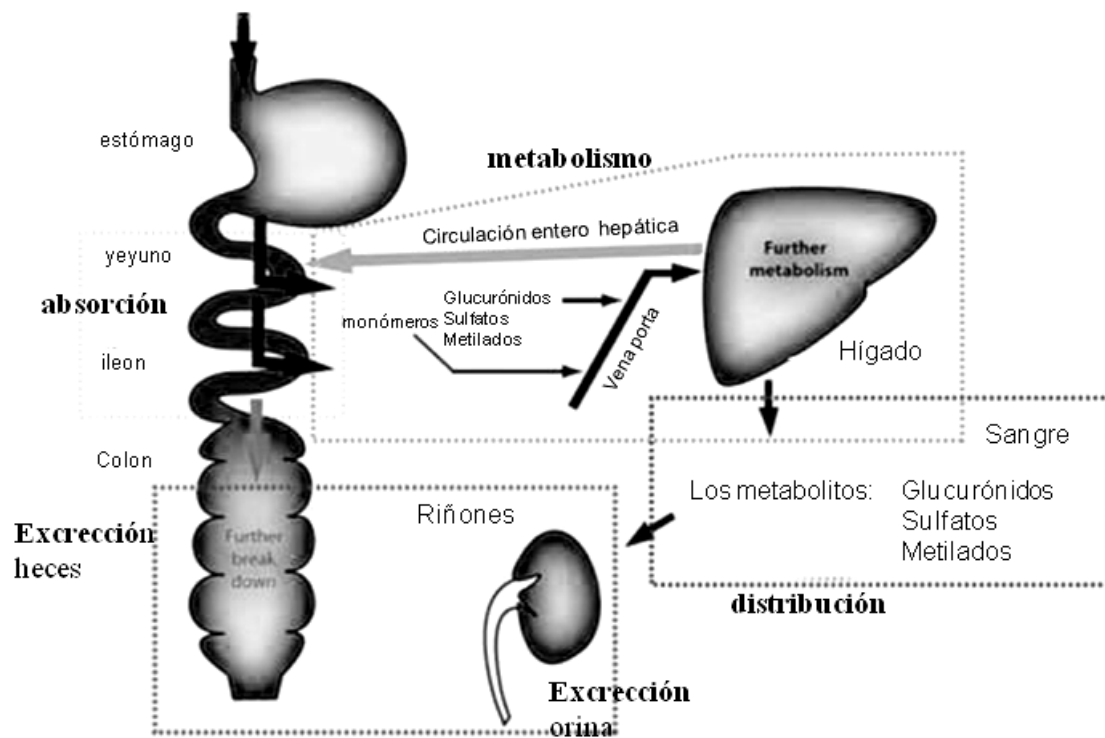


Figura 6. Esquema general de la farmacocinética de los flavonoides. Modificado de Heiss, C. *et al.* (2010).

Recientemente se han caracterizado las vías de absorción y metabolismo de algunos flavonoides como la quercetina, las isoflavonas y las catequinas, concluyendo que este proceso de conversión puede ser una herramienta efectiva para atenuar la toxicidad de estos compuestos, así como para la regulación de sus funciones fisiológicas, ya que algunos metabolitos poseen diferentes actividades biológicas (Williamson *et al.*, 2005a).

3.1 Absorción

Los flavonoides son compuestos relativamente estables, capaces de resistir las condiciones de procesado y cocinado de los alimentos así como las transformaciones que ocurren en el estómago e intestino delgado durante la digestión. Aunque se ha sugerido que la saliva humana es capaz de hidrolizar el enlace del azúcar de los glicósidos de quercetina, liberando la aglicona activa en unos minutos, gracias a la actividad hidrolítica de las colonias de bacterias y a las células epiteliales de la boca (Walle *et al.*, 2005), la hipótesis más aceptada es que los glicósidos llegan intactos al intestino después de la ingestión (Williamson *et al.*, 2005a). Mientras que la quercetina aglicona, consumida a veces a través de suplementos, es absorbida en el estómago de la rata hasta una cantidad limitada (Piskula, 2000), los glicósidos no presentan ningún límite (Crespy *et al.*, 2002). La capacidad limitada del estómago para absorber las agliconas se debe en parte a la relativamente pequeña superficie del estómago, comparada con la del intestino delgado (DeSesso *et al.*, 2001). Los flavanoles, tales como las catequinas y las proantocianidinas oligoméricas, se encuentran de forma natural en su forma aglicona. Las proantocianidinas son estables en el estómago humano *in vivo* (Rios *et al.*, 2002) (Piskula, 2000) aunque *in vitro* se descomponen después de varias horas a pH 2 en flavanoles monoméricos y en otros compuestos no identificados (Spencer *et al.*, 2000). Por tanto, la mayoría de las proantocianidinas y las catequinas que se ingieren, llegan intactas al intestino delgado.

Los flavonoides glicosilados deben ser deconjugados en el intestino delgado para ser absorbidos y posteriormente conjugados por las enzimas intestinales (Setchell *et al.*, 2001). Por tanto, el primer paso para la absorción de los flavonoides glicosilados es la deglicosilación por la lactasa florizina hidroxilasa (LPH) (Day *et al.*, 2000b), una enzima que se encuentra en las microvellosidades del intestino delgado y que es

responsable también de la hidrólisis de la lactosa. Esta enzima actúa fuera de las células epiteliales, de manera que las moléculas pueden ser deglicosiladas en la luz intestinal sin tener que atravesar la membrana del enterocito (Mantei *et al.*, 1988). El producto de la reacción de deglicosilación es una aglicona libre que puede difundir a través de las células epiteliales de forma pasiva o por difusión facilitada.

Un mecanismo de absorción alternativo es el mediado por el cotransportador intestinal de glucosa y acoplado al sodio (SGLT1) que transporta los flavonoides glicósidos de forma intacta dentro del enterocito (Olthof *et al.*, 2000), para ser deglicosilados mediante las β -glucosidasas citosólicas (Day *et al.*, 1998; 2003). Un buen sustrato de la β -glucosidasa citosólica, es la quercetina-4'-glucósido. La utilización de la preparación de intestino de rata invertido permitió demostrar que la vía mediada por SGLT1 y la β -glucosidasa citosólica representa el 20% de la quercetina absorbida, mientras que el 80% restante es absorbido gracias a la LPH (Day *et al.*, 2003). Sin embargo, para la quercetina-3-glucósido, que no es sustrato de la β -glucosidasa citosólica, la vía de la LPH es la responsable del 100% absorbido.

Los polifenoles que no se absorben en el intestino delgado, es decir, el resto de los glucósidos de quercetina (e.g., rutina, hiperósido) son solubilizados por las enterobacterias en el intestino grueso, liberando la aglicona. De hecho, se ha descrito que las bacterias anaeróbicas tales como *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides uniformis*, y *Bacteroides ovatus* tienen actividad β -glucosidasa (Bokkenheuse, 1987) y catalizan las reacciones de deconjugación de los polifenoles, así como su hidrólisis en compuestos más simples como los ácidos fenólicos (Baba *et al.*, 1983). Las enterobacterias pueden también catalizar la apertura del anillo liberando productos tales como el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido m-hidroxifenilacético o el ácido m-homovanílico (Terao, 1999). Estos productos pueden ser absorbidos en el organismo mediante el transportador de ácidos monocarboxílicos y/o por mecanismos de difusión (Konishi, 2005).

3.2 Metabolismo

La mayoría de la fracción de flavonoides absorbida a nivel intestinal penetra en los enterocitos (Figura 6) (Spencer *et al.*, 1999). El sitio principal de la conjugación inicial de los flavonoides es el intestino delgado (Andlauer *et al.*, 2000; Crespy *et al.*, 1999; Kuhnle *et al.*, 2000). Las enzimas catalizadoras de las reacciones de fase II son la uridina 5'- difosfato glucuronosil transferasa (UGT), la fenol-sulfotransferasa (PST), y la catecol-O-metiltransferasa (COMT) que se encuentran en las células epiteliales del intestino delgado (Figura 7) (Murota *et al.*, 2003). Las isoformas de la enzima uridina 5'-difosfato glucuronosil transferasa (UGT) que catalizan más probablemente la glucuronización en el intestino delgado humano son la UGT1A1 y la UGT1A8 (Boersma *et al.*, 2002) aunque la UGT1A9 puede también jugar un papel en el hígado (Oliveira *et al.*, 2000). Algunos metabolitos conjugados son susceptibles de ser transportados a la circulación sanguínea a través de la linfa (Murota *et al.*, 2005). Muchos de los metabolitos conjugados no entran al torrente sanguíneo, sino que vuelven al tracto intestinal debido a la acción de la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP-2) (Walle *et al.*, 2005).

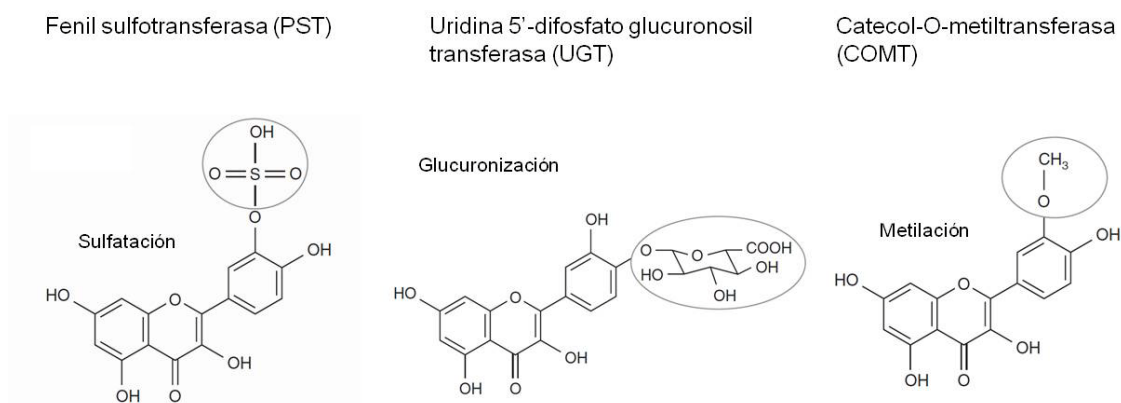


Figura 7. Enzimas responsables del metabolismo de la quercetina en las células epiteliales del intestino delgado humano y estructuras químicas de los principales metabolitos.

Los metabolitos conjugados que son transportados al hígado, son metabolizados por reacciones hepato-enzimáticas de fase II. Se ha observado que este segundo proceso

metabólico en el hígado produce una gran variedad de metabolitos conjugados a partir de los producidos en el intestino delgado y grueso con o sin previa reconjugación de estos (Day *et al.*, 1998; van de Woude *et al.*, 2004). Las reacciones de conjugación que se han descrito en el hígado son de hidrólisis, glucuronidación, O-metilación y sulfoconjugación (Crespy *et al.*, 1999; Manach *et al.*, 2005; O'Leary *et al.*, 2003). La quercetina accede fácilmente al interior de los hepatocitos mediante un mecanismo que no se conoce completamente. Algunos estudios indican que se trata de un sistema de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos de (OATP2) situado en la membrana basolateral de los hepatocitos (Cui *et al.*, 2001; König *et al.*, 2000). Este sistema permite una acumulación de la quercetina en el interior celular donde alcanza concentraciones diez veces superiores a las del medio extracelular (Boulton *et al.*, 1999). El metabolismo de la quercetina ha sido estudiado en un modelo de hepatocitos de origen humano (HepG2) (O'Leary *et al.*, 2004). En estas células, que representan un modelo de metabolismo hepático, tanto la quercetina-7-glucurónido como la quercetina-3-glucurónido se metabolizan (O'Leary *et al.*, 2003). En primer lugar, estos glucurónidos de quercetina pueden ser hidrolizados por la β -glucuronidasa (O'Leary *et al.*, 2003), liberando la aglicona que, a su vez, puede ser metilado en posición 3'- o 4'- por la catecol-O-metil-transferasa (COMT) y formar isoramnetina y tamarixetina, respectivamente (O'Leary *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 1994). En ratas, se ha detectado en el plasma la presencia de isoramnetina (3'-metilquercetina), tamarixetina (4'-metilquercetina) y kaempferol tras la administración de quercetina (Manach *et al.*, 1998; 1997; 1995). Además, la quercetina puede volver a unirse al ácido glucurónico o a grupos sulfato (O'Leary *et al.*, 2003). La isoramnetina también puede ser glucuronizada y sulfoconjugada (Day *et al.*, 2000a; O'Leary *et al.*, 2003). Después del consumo de quercetina, ingerida a través de la cebolla, los metabolitos que se encuentran en sangre son, quercetina-3-glucurónido, quercetina-3'-sulfato, y metilquercetina-3-glucurónido (Day *et al.*, 2001).

Las dosis de flavonoides empleadas también determinan el sitio primario del metabolismo. Por ejemplo, a dosis elevadas la quercetina se metaboliza principalmente en el hígado, mientras que dosis inferiores se metabolizan en la mucosa intestinal por lo que el hígado juega un papel secundario (Scalbert *et al.*, 2000). Cabe reseñar que la

concentración plasmática de los polifenoles cuando se administran en la dieta es muy inferior a cuando se administran aislados. Estas diferencias implican que, al igual que que ocurre con otros fármacos, pueden saturar el metabolismo y, como consecuencia, encontrarse en forma no conjugadas en el plasma (Scalbert *et al.*, 2000). Por otra parte, los flavonoides presentes en la dieta no alcanzan concentraciones tan elevadas para saturar el metabolismo y por tanto, las especies circulantes están mayoritariamente en su forma conjugada. Por ejemplo, después de administrar una dosis farmacológica de 2 g de catequina en el plasma se detecta la presencia de catequina en forma de aglicona en el plasma después de 30 minutos. Sin embargo, tras el consumo de pocos mg de catequina, como los presentes en el vino tinto, en el plasma se detecta catequina solamente en forma de conjugado (Bell *et al.*, 2000). Todos estos resultados sugieren que la recaptación de los flavonoides presentes en la dieta facilita la conjugación en el intestino delgado. Por el contrario, dosis farmacológicas saturan las enzimas conjugantes del intestino delgado y pasan en la forma no conjugada a la vena portal hepática (O'Leary *et al.*, 2004).

Los metabolitos glucurono- y sulfo-conjugados producidos a nivel hepático se eliminan por la bilis a través de un sistema de transporte dependiente de ATP situado en el dominio apical de las células hepáticas (MRP2) (Jedlitschky *et al.*, 1997; König *et al.*, 1999; O'Leary *et al.*, 2003). Estos glucurono- y sulfo-conjugados excretados por vía biliar entran así en un ciclo enterohepático, como se ha observado en estudios realizados en la preparación de hígado de ratas aislado y perfundido (Middleton *et al.*, 2000).

En cualquier caso, se ha descrito que la conjugación puede incluso servir para preservar a los flavonoides en los fluidos biológicos. La vida media de una aglicona como quercetina en un medio de cultivo es de 1 a 2 horas, sin embargo la vida media de quercetina conjugada en la sangre humana *in vivo* es de alrededor de 10 a 22 horas. Al igual que ocurre con otras sustancias (Monfardini *et al.*, 1998), la conjugación permite estabilizar la quercetina en la sangre y puede actuar como medio de liberación a los tejidos (Williamson, 2004).

Sin embargo, otros flavonoides como las epigalocatequinas (EGCG) y las antocianinas están presentes en el plasma en forma de aglicona (Ullmann *et al.*, 2003) o de glucósidos (Talavera *et al.*, 2004).

3.3 Distribución

La sangre proporciona flavonoides a todos los tejidos del organismo. Si estuvieran presentes en el plasma, las agliconas podrían entrar en los tejidos periféricos por difusión pasiva o facilitada. Los conjugados glucurónidos, sin embargo, probablemente tendrían que ser transportados a los tejidos periféricos, debido a que son relativamente hidrofílicos y difunden través de las membranas sólo muy lentamente. Esto puede no ser el caso de los conjugados de sulfato, ya que algunos podrían ser relativamente hidrofóbicos (Williamson, 2004). Respecto a la quercetina, como hemos revisado anteriormente, Day *et al.* (2001) detectaron en el plasma humano unos 20 metabolitos distintos, incluyendo quercetina 3-O- β -D-glucurónido (Q3GA), quercetina 3'-O- β -D-glucurónido (Q3'GA), quercetina 4'-O- β -D-glucurónido (Q4'GA), quercetina 3-O- β -sulfato (Q3'S), quercetina 3'-O-metil, 4'-O- β -D-glucurónido, y quercetina 3'-O-metil-3-O- β -D-glucurónido (isoramnetina-3-O- β -D-glucurónido, I3GA) y sin embargo no halló ningún resto de la aglicona. Estos metabolitos fueron también encontrados en la orina humana después de la ingesta de alimentos ricos en flavonoides (Hong *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2004).

La quercetina aglicona está estrechamente unida a la albúmina mediante enlaces no covalentes (Papadopoulou *et al.*, 2005). Se ha sugerido que los metabolitos de quercetina se encuentran unidos a la albúmina en la sangre (McAnlis *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la fuerza de la unión covalente en los metabolitos conjugados es mucho menor que la que une la quercetina aglicona con la albúmina (Dufour *et al.*, 2005). Esto implica que los metabolitos conjugados pueden ser fácilmente liberados de la fracción de albúmina adquiriendo la capacidad de unirse a los tejidos.

Después de una ingesta rica en flavonoides, se ha observado un incremento transitorio de los metabolitos de quercetina en plasma humano llegando a alcanzar valores de

concentración en el rango micromolar (Hollman *et al.*, 1995), concentración que disminuye gradualmente hasta llegar prácticamente a cero en menos de 8 h (Manach *et al.*, 1997). La ingestión continua de alimentos ricos en flavonoles justifica la presencia de niveles bajos de metabolitos de quercetina en plasma, aunque este nivel presenta una gran variabilidad interindividual (Moon *et al.*, 2000).

El hecho de que la quercetina y el resto de los flavonoles ingeridos a través de la dieta puedan llegar a ser acumulados en los diferentes tejidos del organismo es objeto de discusión en los últimos años. No está claro, si éstos se pueden acumular en el organismo humano, sin embargo en animales de experimentación se ha observado que la dieta rica en quercetina se distribuye en diferentes órganos (de Boer *et al.*, 2005). Estos investigadores observaron que en ratas y cerdos alimentados con una dieta que contenía; un 0.1% o un 1.0% de quercetina respectivamente, durante 11 semanas, la quercetina y sus metabolitos se encontraban ampliamente distribuidos en los tejidos de la rata. Las mayores concentraciones se encontraron en el pulmón y las menores fueron encontradas en el cerebro, tejido adiposo blanco y el bazo. Una distribución similar se observó en los cerdos en un estudio a corto plazo con una ingesta de 500 mg de quercetina por kg de peso. Sin embargo, Bieger *et al.* (2008) observaron que una suplementación a largo plazo no mostraba mayores cantidades de metabolitos en los órganos que una dosis única, y solo se observó una alta concentración plasmática en el hígado, en el intestino delgado y en el riñón. En el estudio en cerdos no se confirmó que hubiera una mayor acumulación en los pulmones. Se detectó una cantidad importante de aglicona, pero la mayor parte puede ser debida a una reacción de deconjugación durante el proceso de extracción.

Mullen *et al.* (2008) administraron mediante sonda nasogástrica, quercetina-4'-glucósido marcado con ¹⁴-C a ratas (4 mg por kg de peso corporal) y observaron muy poca radioactividad en todos los tejidos del organismo salvo en el tracto gastrointestinal. En base a estos hallazgos, los autores concluyeron que la mayor parte del flavonoide ingerido era convertido en ácidos fenólicos antes de la absorción en el organismo, y que su acumulación en los tejidos era, por tanto cuestionable. Estos resultados contradictorios indican que el grado de acumulación en los tejidos del organismo es

totalmente dependiente de la cantidad y de la vía de administración empleada. Un estudio sobre la biodisponibilidad de naringina (naringenina-7-O-neo-hesperidósido) en ratas sanas y ratas con tumores demostró que la concentración de los metabolitos conjugados en el plasma de las ratas portadoras de tumores fue significativamente menor que en ratas sanas (Silberberg *et al.*, 2006). Estas evidencias sugieren que las diferentes condiciones patológicas podrían influenciar también la biodisponibilidad de los flavonoides, y por tanto condicionar su acumulación en los tejidos.

Kawai *et al.* estudiaron la distribución de los glucurónidos fue estudiada usando un novedoso anticuerpo monoclonal con el que se identificó que Q3GA se acumulaba en las lesiones ateroscleróticas de la aorta dañada y no en aortas normales (2008b). Este descubrimiento parece indicar que los metabolitos de quercetina se translocan a las dianas vasculares selectivamente cuando los vasos están dañados y sugiere que los metabolitos conjugados podrían ejercer una actividad específica *per se* o por deconjugación en sus agliconas activas en condiciones de inflamación.

3.4 La desconjugación de los metabolitos.

Las evidencias acumuladas en los últimos años sugieren que los metabolitos conjugados podrían ser desconjugados mediante la β -glucuronidasa y que los flavonoles agliconas se pueden acumular en los tejidos (Bieger *et al.*, 2008). Algunas evidencias indirectas sugieren, asimismo, que la actividad de los glucurónidos de quercetina depende de su desconjugación (Lee-Hilz *et al.*, 2008).

Las β -glucuronidasas se encuentran tanto en la fracción lisosomal como en el retículo endoplásmico (Paigen, 1989). En las células del hígado, esta enzima metaboliza los glucurónidos de quercetina (O'Leary *et al.*, 2003). La actividad sulfatasa también está presente y actúa en sulfatos de esteroides y otras moléculas dentro de la célula (Coughtrie *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997; Purohit *et al.*, 1996) lo que produce agliconas intracelulares. La actividad β -glucuronidasa también puede estar presente en algunos fluidos extracelulares, tales como el humor acuoso (Weinreb *et al.*, 1991). La genisteína libre se encuentra en tejidos como el cerebro, hígado, ovario, mama, próstata, testículos, tiroides y el útero (Chang *et al.*, 2000). Algunas formas libres de metil-

quercetina, catequinas, y metil-catequina se pueden encontrar en el hígado, pero no en el plasma (Manach *et al.*, 1999).

Shimoi *et al.* (2001) demostraron por primera vez que el monoglucurónido de luteolina se convierte en aglicona libre durante la inflamación usando neutrófilos humanos estimulados con la mezcla de ionomicina/citocalasina B, así como en ratas tratadas con lipopolisacárido (LPS). Además detectaron que la actividad β -glucuronidasa en el suero humano de pacientes sometidos a hemodiálisis se encontraba incrementada de forma significativa comparada con voluntarios sanos. En este sentido, el grupo de Terao también ha observado que los macrófagos estimulados con LPS presentan un aumento de la actividad β -glucuronidasa y generan quercetina aglicona cuando las células son expuestas a Q3GA (Kawai *et al.*, 2008b). Parece, por tanto, que los conjugados glucurónidos de los flavonoides pueden liberar su aglicona mediante el aumento de la actividad β -glucuronidasa durante la inflamación.

3.5 Excreción

La tasa de excreción de los flavonoides en la orina depende drásticamente de los flavonoides objeto de examen, con una gran variabilidad que abarca desde la quercetina y la antocianina, cuya tasa es inferior al 1,5% las catequinas que presentan una tasa de excreción en torno al 5% las isoflavonas con una tasa entre 2 al 20% (Scalbert *et al.*, 2000). Además, los flavonoides se encuentran en la orina en forma conjugada. Por ejemplo, las catequinas presentes en la orina de rata son (+)-catequina-5-O- β -glucurónido y epicatequina-5-O- β -glucurónido (Harada *et al.*, 1999).

Los metabolitos tienen semividas de eliminación de aproximadamente 17-25 h (Hollman, 1997a; Hollman *et al.*, 1998; Hollman *et al.*, 1996) gracias al establecimiento del ciclo enterohepático (O'Leary *et al.*, 2003). La prolongada permanencia en plasma de los metabolitos permite que su consumo repetido tenga un efecto acumulativo sobre las concentraciones plasmáticas (Hollman, 1997a; Hollman *et al.*, 1998; Hollman *et al.*, 1996). En voluntarios sanos a los que se administraba un suplemento de flavonoides, mayoritariamente quercetina (2g/día) durante 28 días, las concentraciones plasmáticas

de flavonoides se elevaron hasta 1,5 μM (Conquer *et al.*, 1998). Estas concentraciones son similares a las concentraciones farmacológicamente activas, capaces de inhibir distintos sistemas enzimáticos.

En general, la excreción renal no es una vía importante para la excreción de los flavonoides intactos (Choudhury *et al.*, 1999) y el contenido de la orina de los flavonoides no se puede utilizar como un marcador biológico de la biodisponibilidad o la ingesta alimentaria.

4. Las propiedades biológicas de los metabolitos conjugados

A pesar de que el análisis de los efectos biológicos de los flavonoides, y en particular de la quercetina, ha sido objeto de numerosas investigaciones, la información acerca de la actividad de los metabolitos conjugados presentes en el plasma es más escasa. Sin embargo, en los últimos años el interés por estos metabolitos ha ido creciendo tras las dudas planteadas sobre la posible relevancia de los estudios *in vitro* anteriores que utilizaban las formas agliconas, que no están presentes en el plasma (Kay, 2010; Kroon *et al.*, 2004; Middleton *et al.*, 2000).

Se ha comprobado que, al igual que las formas agliconas, algunos metabolitos de la quercetina también poseen actividad antioxidante (Moon *et al.*, 2001; Morand *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999). Más concretamente, se ha observado que el metabolito mayoritario de la quercetina en plasma, la quercetina-3-glucurónido (Q3G) actúa como “*barredor*” de radicales libres y es capaz de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a altas concentraciones (Moon *et al.*, 2001). Al igual que la quercetina, los glucurónidos de la quercetina no sólo actúan como “*barredores*” de radicales libres sino que son capaces de inhibir sus fuentes enzimáticas como la XO y la LOX. De hecho, Day *et al.*, (2000a) analizaron la actividad de diversos glucurónidos de la quercetina en relación con su capacidad de inhibir la XO y la LOX. Los glucurónidos de la quercetina inhibieron la XO en un modelo bovino según el siguiente orden de sustitución 4'-> 3'-> 7- > 3-. Así mismo, todos los glucurónidos de los flavonoides

analizados inhibieron la LOX. Además, la Q3GA, a la concentración de 10 μ M, inhibe la peroxidación inducida por H₂O₂ en fibroblastos de ratón (3T3) (Shirai *et al.*, 2002) y la peroxidación lipídica inducida por la LOX en vesículas unilamelares de fosfatidilcolina (Shirai *et al.*, 2001). También se ha demostrado que la Q3GA, (10 μ M) y la quercetina-3'-sulfato (Q3'S), producían un efecto inhibitorio sobre la generación no-enzimática de O₂⁻ (Cano *et al.*, 2002).

También se ha observado que los metabolitos poseen otras actividades biológicas específicas aparte de la antioxidante *in vitro* (Day *et al.*, 2000a; de Pascual-Teresa *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2008b; Kim *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2004; O'Leary *et al.*, 2004; Shiba *et al.*, 2008; Yoshizumi *et al.*, 2002). Por ejemplo, la Q3GA (1 μ M) previno la hipertrofia de las CMLV inducida por Ang II a través de la inhibición de JNK y AP-1, pero no tuvo efecto sobre la ERK 1/2, la p38, las MAPK (Yoshizumi *et al.*, 2002). Tanto la Q3GA como la isoramnetina-3-glucurónido (I3GA) a concentraciones muy bajas (0.1 y 1 μ M) disminuyen la expresión de la COX-2 en linfocitos humanos *ex vivo* pero no *in vivo* (de Pascual-Teresa *et al.*, 2004).

En otros casos, sin embargo, los metabolitos han resultado ser menos eficaces que la quercetina como, por ejemplo, en la inhibición de la adhesión de los monocitos a células endoteliales (Koga *et al.*, 2001). Así, los metabolitos de la quercetina, la Q3'S, la Q3GA y la I3GA no mostraron apenas efecto sobre el aumento inducido por el TNF- α en las moléculas de adhesión VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1, a nivel de la proteína como del ARNm, ni en el endotelio humano, ni en las células del músculo liso vascular (Tribolo *et al.*, 2008; Winterbone *et al.*, 2009). Boesch-Saadatmandi *et al.* (2011), observaron que en los macrófagos RAW264.7 estimulados con lipopolisacárido, aunque la quercetina e isoramnetina disminuían significativamente los niveles de mRNA y proteínas TNF- α , la Q3GA no tenía ningún efecto, sobre TNF- α ni sobre los niveles de expresión del resto de mediadores inflamatorios.

Sobre el papel de estos metabolitos en la disfunción endotelial, nuestro grupo ha mostrado que los metabolitos glucurónidos y sulfatos de la quercetina carecen de un efecto vasodilatador directo en la aorta de rata (Lodi *et al.*, 2009). En la arteria coronaria

porcina, la (Q3'S) inhibe la contracción inducida por la endotelina-1 y por el análogo de tromboxano A₂ U46619 de una manera independiente del endotelio, mientras que la Q3GA no tiene ningún efecto (Suri *et al.*, 2010). Nuestros datos revelan que la Q3'S tienen un efecto vasodilatador agudo en las arterias mesentéricas de resistencia de rata, pero una vez más con una potencia menor que la quercetina (observaciones no publicadas). Además, las evidencias disponibles sugieren que los metabolitos glucurónidos y sulfatos pueden evitar, aunque de forma menos efectiva que la quercetina, el deterioro en la biodisponibilidad de NO en condiciones de alto estrés oxidativo (Lodi *et al.*, 2009). La quercetina-3-glucurónido previno también la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 (Lodi *et al.*, 2009). Además, la quercetina y su metabolito sulfato, mejoran de forma selectiva la relajación dependiente de GMP cíclico, mediante un mecanismo que no implica la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (Suri *et al.*, 2010). Curiosamente, la quercetina y el metabolito sulfato previnieron también la tolerancia a la nitroglicerina *in vitro* (Suri *et al.*, 2010), un efecto compartido por otros “barredores” de O₂⁻ (Munzel *et al.*, 1999). Varios estudios han demostrado que la quercetina y su glucurónido conjugado inhiben la proliferación y la hipertrofia, e induce apoptosis en los cultivos de células musculares lisas vasculares (Moon *et al.*, 2003; Yoshizumi *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Varios estudios epidemiológicos prospectivos (Hertog *et al.*, 1993; Keli *et al.*, 1996; Huxley *et al.*, 2003) indican que existe una relación inversa entre el consumo de flavonoides en la dieta y la mortalidad por enfermedades cardiovasculares. Se han publicados también múltiples trabajos usando modelos animales que muestran que los flavonoides o las dietas ricas en flavonoides ejercen un efecto protector en las enfermedades cardiovasculares (Middleton *et al.*, 2000), justificando así los resultados de los estudios epidemiológicos. Por ejemplo, la quercetina reduce la presión sanguínea, el estrés oxidativo y el daño en órganos diana en modelos animales de hipertensión (Duarte *et al.*, 2001b; Sanchez *et al.*, 2006). La quercetina presenta también efectos antiaterogénicos, previene la disfunción endotelial (Duarte *et al.*, 2002; 2001b; Sanchez *et al.*, 2006), protege al miocardio del daño isquémico y, a dosis altas, también puede reducir la obesidad. Sin embargo, los efectos sobre el perfil lipídico y sobre la resistencia a la insulina son contradictorios. Los ensayos de intervención en humanos con flavonoles aislados demuestran un efecto antihipertensivo (Edwards *et al.*, 2007), pero no se dispone de datos sobre la función endotelial, la resistencia a la insulina o la aterosclerosis. En estos estudios se han utilizado tanto los flavonoides glicosilados, es decir, en la forma en la que se encuentran mayoritariamente en la dieta, como los flavonoides en forma de aglicona.

Para analizar los posibles mecanismos de acción, se han realizado múltiples estudios *in vitro* usando también los flavonoides en forma de agliconas. Estos estudios han demostrado que la quercetina presenta un efecto vasodilatador en arterias sistémicas y coronarias (Duarte *et al.*, 1993a; Fitzpatrick *et al.*, 1993; Gryglewski *et al.*, 1987; Perez-Vizcaino *et al.*, 2002) así como antiagregante (Gryglewski *et al.*, 1987) y restaura la función endotelial en aortas de ratas espontáneamente hipertensas mediante el aumento en la biodisponibilidad de NO. Este efecto protector sobre el NO, que está relacionado con su efecto antioxidante (Lopez-Lopez *et al.*, 2004), se piensa que es uno de los mecanismos fundamentales mediante el cual los flavonoides ejercen su efecto protector en las enfermedades cardiovasculares (Perez-Vizcaino *et al.*, 2006b). Otros mecanismos propuestos han sido la inhibición de la oxidación del LDL y la reducción de las moléculas de adhesión y de otros marcadores inflamatorios.

Sin embargo, los numerosos estudios farmacocinéticos realizados en los últimos años, indican que las concentraciones plasmáticas de quercetina aglicona y de otros flavonoides relacionados son muy bajas, ya que estos se conjugan rápidamente con ácido glucurónico y/o sulfato en el intestino e hígado produciendo diversos metabolitos, entre los que destacan la quercetina-3-glucurónido (Q3GA), la quercetina-3'-sulfato (Q3'S) y la isoramnetina-3-glucurónido (I3GA) (Day *et al.*, 2001; Manach *et al.*, 1998; Mullen *et al.*, 2006; Scalbert *et al.*, 2000).

Esto ha dado lugar a que una gran cantidad de datos científicos obtenidos durante décadas utilizando las agliconas en estudios *in vitro* (Middleton *et al.*, 2000) hayan sido puestos en duda al no ser extrapolables a los efectos *in vivo*. Se ha sugerido que los compuestos que se deben utilizar en los estudios *in vitro* son los metabolitos conjugados, que son los que se encuentran de forma mayoritaria en el plasma humano (Kay, 2010; Kroon *et al.*, 2004). En los últimos años, por tanto, se han estudiado los efectos de los metabolitos mayoritarios de los principales flavonoides de la dieta. Así, se ha descrito que los principales metabolitos del plasma humano Q3GA, Q3'S e I3GA son inactivos o presentan un efecto *in vitro* menor que sus formas agliconas (Lodi *et al.*, 2009; Winterbone *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010). Nuestro grupo ha demostrado que los metabolitos conjugados pierden su efecto vasodilatador directo y que no tienen efecto sobre la función endotelial en ausencia de estrés oxidativo. Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo preservan, al menos parcialmente, la actividad biológica tanto del NO añadido exógenamente como del derivado del endotelio. Además la Q3GA previene la disfunción endotelial inducida por endotelina-1 (Lodi *et al.*, 2009). El efecto *in vivo* de los metabolitos no ha sido estudiado hasta el momento.

Sin embargo, se ha descrito también que los glucurónidos de quercetina, pueden ser desconjugados por macrófagos en cultivo (Kawai *et al.*, 2008b; Shimoi *et al.*, 2001) y en homogenizados de hígado humano y de intestino delgado (O'Leary *et al.*, 2001). Además, a pesar de que la quercetina no se detecta en el plasma humano o de animales en forma de aglicona, en cerdos alimentados con suplementos de este flavonoide, se detectaron concentraciones relativamente altas de la forma aglicona de la quercetina en diversos tejidos (Bieger *et al.*, 2008).

Por otra parte, debido a su amplia distribución, las diferentes clases de flavonoides están normalmente presentes de manera simultánea en un mismo alimento y por ello, es frecuente que se consuman conjuntamente a través de la dieta. De hecho, los prototipos de alimentos ricos en flavonoides contienen un amplio número de flavonoides diferentes en cantidades variables. Sin embargo, se conoce poco sobre las interacciones entre ellos. Se ha demostrado que la catequina y la quercetina tienen una actividad sinérgica sobre la agregación plaquetaria a través de la inhibición de la proteína kinasa C y de la activación de NADPH oxidasa (Pignatelli *et al.*, 2006a; Pignatelli *et al.*, 2006b; Pignatelli *et al.*, 2000). Se han descrito también interacciones farmacocinéticas (Silberberg *et al.*, 2005).

La hipótesis general que nos planteamos en esta Tesis Doctoral es que el posible efecto beneficioso de la quercetina en las enfermedades cardiovasculares, y en concreto, su efecto vasodilatador, es debido a un proceso de desconjugación metabólica a nivel vascular más que a la actividad de sus metabolitos conjugados.

Objetivos:

1) Analizar el efecto prooxidante de los metabolitos conjugados de quercetina y su papel en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) en la aorta de rata.

2) Estudiar si el metabolito mayoritario de la quercetina en el plasma humano, quercetina-3-glucurónido (Q3GA): a) Se desconjuga a nivel vascular, b) si produce efecto vasodilatador a largo plazo como consecuencia de la desconjugación, c) si tiene efectos vasodilatadores *in vivo*.

3) Determinar las posibles consecuencias de la interacción entre quercetina y catequina, los dos representantes de las dos principales clases de flavonoides en la dieta, sobre a) los efectos vasodilatadores, b) el efecto prooxidante y c) los efectos sobre la disfunción endotelial.

OBJECTIVES

Objectives:

- 1) To analyse the pro-oxidant effects of conjugated metabolites of quercetin and their role in the bioavailability of NO in rat aorta.
- 2) To determine whether quercetin-3-glucuronide (Q3GA) the major quercetin metabolite in human plasma a) can be deconjugated, b) exerts its effects *in vitro* via the release of quercetin and c) exerts a blood pressure lowering effect.
- 3) To study the interactions between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on a) their vasodilatador effects, b) their pro-oxidant effects and c) their effects on endothelial dysfunction.

RESULTS I:

Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidize, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability.

Lodi F., *et al.* Planta Med. 2008;74:741-746.

Glucuronidated Metabolites of the Flavonoid Quercetin do not Auto-Oxidise, do not Generate Free Radicals and do not Decrease Nitric Oxide Bioavailability

Author

Federica Lodi^{1,3}, Rosario Jiménez², Carmen Menendez¹, Paul W. Needs³, Juan Duarte², Francisco Perez-Vizcaino¹

Affiliation

¹ Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Spain and Ciber Enfermedades Respiratorias (CibeRes)

² Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, Granada, Spain

³ Institute of Food Research, Norwich, U.K.

Key words

- Quercetin
- conjugated metabolites
- nitric oxide
- pro-oxidant and antioxidant effects

Abstract

▼ Quercetin, the most abundant flavonoid in the diet, reduces blood pressure and restores endothelial dysfunction in hypertensive animals. However, quercetin (as the aglycone) is usually not present in plasma, but it is rapidly metabolised during absorption by methylation, glucuronidation and sulfation. Depending on the experimental conditions, quercetin can show anti-oxidant or pro-oxidant effects. We have analysed the pro-oxidant effects of quercetin and its methylated (3-methylquercetin or isorhamnetin), sulfated (quercetin 3'-sulfate), glucuronidated (quercetin 3-glucuronide) and methylated plus glucuronidated (isorhamnetin 3-glucuronide) metabolites. Auto-oxidation, O₂⁻ release and NO scavenging were analysed by means of absorption spectra, lucigenin chemiluminescence or superoxide dismutase inhibitable cytochrome C re-

duction and an amperometric electrode, respectively. The biological activity of NO was tested in rat aortic rings. Quercetin, isorhamnetin and quercetin 3'-sulfate auto-oxidized in aqueous buffer and generated superoxide radical. Quercetin but not the glucuronide scavenged NO. In contrast, the glucuronides were without effect. Quercetin, but not quercetin 3-glucuronide, inhibited the biological activity of NO. These data indicate that, in contrast to quercetin, its main circulating forms, i.e., the glucuronides, do not exert pro-oxidant effects.

Abbreviations

- ▼
- DMSO: dimethyl sulfoxide
 - NO: nitric oxide
 - O₂⁻: superoxide
 - ROS: reactive oxygen species

Introduction

▼ Flavonoids belong to a large group of plant polyphenols that are consumed in large amounts with dietary fruit and vegetables [1]. Large epidemiological studies have shown an inverse association between dietary flavonoid intake and mortality from coronary heart disease [1], [2]. There has been considerable interest in the flavonols, particularly quercetin, due to its potency in a number of *in vitro* assays of biological activity and its prevalence in the diet. Quercetin exerts systemic and coronary vasodilator effects *in vitro* [3], [4], [5] and reduces blood pressure, cardiac hypertrophy, endothelial dysfunction and vascular remodelling in several rat models of hypertension [6], [7].

Quercetin exerts dual effects on oxidative stress and nitric oxide. On the one hand, quercetin is able to directly scavenge O₂⁻ superoxide anion [8]

and is also a powerful inhibitor of LDL oxidation [9]. *In vivo*, it reduces the oxidative status in animal models of disease, e.g., the spontaneously hypertensive rat [10], [11]. By reducing O₂⁻ concentrations, quercetin is expected to protect NO from O₂⁻-driven inactivation. Thus, quercetin restored the impaired endothelial function in aortas from spontaneously hypertensive rats both *in vivo* [6], [7], [11] and *in vitro* [12] by enhancing the bioavailability of NO. This is believed to be one of the fundamental mechanisms by which flavonoids protect against endothelial dysfunction and cardiovascular disease [13]. On the other hand, quercetin may also behave as a pro-oxidant and generate reactive oxygen species (ROS) [14], [15], [16]. Under physiological conditions of pH and O₂/NO concentrations, quercetin has been shown to efficiently scavenge NO in the low micromolar range [15], [17], [18]. This reaction involved the auto-oxidation of quercetin and the

received October 31, 2007

revised March 6, 2008

accepted March 19, 2008

Bibliography

DOI 10.1055/s-2008-1074525

Planta Med 2008; 74: 741–746

© Georg Thieme Verlag KG

Stuttgart · New York

Published online May 16, 2008

ISSN 0032-0943

Correspondence

Prof. Francisco Pérez Vizcaino

Department of Pharmacology

School of Medicine

Universidad Complutense

28040 Madrid

Spain

Tel.: +34-91-394-1477

Fax: +34-91-394-1465

fperez@med.ucm.es

RESULTS II:

Vascular deconjugation of quercetin glucuronide. The flavonoid paradox revealed?

Menendez C., *et al.* Mol Nutr Food Res. 2011;55:1780-1790.

RESEARCH ARTICLE

Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: The flavonoid paradox revealed?

Carmen Menendez^{1,2*}, Montserrat Dueñas^{3*}, Pilar Galindo⁴, Susana González-Manzano³, Rosario Jimenez⁴, Laura Moreno^{1,2}, María José Zarzuelo⁴, Isabel Rodríguez-Gómez⁵, Juan Duarte⁴, Celestino Santos-Buelga³ and Francisco Perez-Vizcaino^{1,2}

¹ Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

² Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Bunyola, Spain

³ Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain

⁴ Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad de Granada, Granada, Spain

⁵ Department of Physiology, School of Medicine, Universidad de Granada, Granada, Spain

Scope: The dietary flavonoid quercetin exerts protective cardiovascular effects. Because quercetin is rapidly metabolized into less active or inactive glucuronidated metabolites and the plasma concentrations of free quercetin are very low, a huge amount of scientific data generated along decades with the unconjugated compounds *in vitro* has been questioned. We aimed to determine whether glucuronidated quercetin can deconjugate *in situ* and whether deconjugation leads to a biological effect.

Methods and results: Quercetin and quercetin-3-*O*-glucuronide (Q3GA) were perfused through the isolated rat mesenteric vascular bed. Quercetin was rapidly metabolized in the mesentery. In contrast, the decay of Q3GA was slower and was accompanied by a progressive increase of quercetin in the perfusate and in the tissue over 6 h, which was prevented by the β -glucuronidase inhibitor saccharolactone. Incubation of mesenteric arterial rings mounted in a wire myograph with Q3GA for ≥ 1 h resulted in a significant inhibition of the contractile response which was also prevented by saccharolactone. Moreover, the intravenous administration of Q3GA resulted in a slow onset and sustained blood pressure lowering effect, demonstrating for the first time that Q3GA has effects *in vivo*.

Conclusion: We propose that Q3GA behaves as a quercetin carrier in plasma, which deconjugates *in situ* releasing the aglycone which is the final effector.

Received: June 6, 2011
Revised: July 27, 2011
Accepted: August 9, 2011

Keywords:

Blood pressure / Glucuronide / Metabolism / Quercetin / Vasodilation

1 Introduction

Quercetin is the most abundant and widely distributed flavonoid, a class of phenolic compounds consumed in the diet in fruits, vegetables, nuts and derived products such as red wine and chocolate. Prospective epidemiological studies

have shown an inverse correlation between dietary flavonoid intake and mortality from coronary heart disease [1–3]. These data are supported by multiple animal studies showing that quercetin and related flavonoids exert a wide range of biological effects both *in vitro* and *in vivo* [4]. Thus, they induce systemic and coronary vasodilatation and anti-aggregant effects *in vitro* [5–9] and reduce blood pressure, the oxidative status and the end-organ damage in animal models of hypertension [10].

One of the main difficulties in understanding the biological activity *in vivo* of flavonoids is their low concentration

Correspondence: Professor Francisco Perez-Vizcaino, Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

E-mail: fperez@med.ucm.es

Fax: +34-913941465

Abbreviation: Q3GA, quercetin-3-*O*-glucuronide

*These authors contributed equally to this work.

RESULTS III:

Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle.

Menendez C., *et al.* Br J Nutr. 2011;105:1287-1293.

Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle

Carmen Menendez^{1,2}, Rosario Jimenez³, Laura Moreno^{1,2}, Pilar Galindo³, Angel Cogolludo^{1,2}, Juan Duarte³ and Francisco Perez-Vizcaino^{1,2*}

¹Department of Pharmacology, School of Medicine, University Complutense of Madrid, 28040 Madrid, Spain

²Ciber Enfermedades Respiratorias (CIBERES), 28040 Madrid, Spain

³Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, 18071 Granada, Spain

(Received 28 April 2010 – Revised 5 October 2010 – Accepted 1 November 2010 – First published online 10 December 2010)

Abstract

Due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods. However, little is known about the interactions between them. The flavonol quercetin and the flavan-3-ol (+)-catechin are among the most abundant flavonoids in the diet. In the present study, we have analysed the interactions between these two flavonoids on vascular function using two pure compounds and mixtures of these flavonoids in 1:0.1, 1:1 or 1:10 proportions. Quercetin induced a more potent concentration-dependent relaxant effect than catechin in the isolated rat aorta, and the isobolographic analysis of the mixtures showed no synergistic or antagonistic effects between them, i.e. their effects were additive. Quercetin was more potent in mesenteric than in pulmonary arteries. Catechin had weak effects in these vessels and did not modify the effects of quercetin. Endothelial dysfunction induced by increased oxidative stress by the superoxide dismutase inhibitor diethyldithiocarbamate was prevented by quercetin, whereas catechin showed a weak effect and the 1:1 mixture an intermediate effect compared with the pure compounds. Quercetin but not catechin showed a pro-oxidant and NO-scavenging effect, which was not prevented by catechin. In conclusion, catechin was less potent than quercetin as a vasodilator, pro-oxidant or to prevent endothelial dysfunction, and there were no synergistic interactions between quercetin and catechin.

Key words: Quercetin: Catechin: Isobologram: Endothelium

Flavonoids are polyphenolic compounds ubiquitously distributed in plants and are consumed regularly in the diet in considerable amounts in the form of fruits, vegetables, nuts and derived products such as red wine, tea and chocolate. Based on their chemical structure, flavonoids can be classified into several subclasses such as flavonols, flavones, flavanones, flavan-3-ols (also referred to as catechins), anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols and chalcones. Flavan-3-ols and flavonols are the most abundant and are widely distributed in food. The average daily intake in the occidental diet of flavonols is estimated to be approximately 20–25 mg, with quercetin contributing 60–75% of the total^(1,2). The average intake of flavan-3-ols is within a similar range (approximately 18–31 mg), with (+)-catechin (henceforth referred to as catechin) and epicatechin being the most abundant⁽³⁾.

Prospective epidemiological studies have shown an inverse correlation between dietary flavonoid intake and mortality from CHD^(1,2). Several studies using various animal models have provided support for the observed protective effects of dietary flavonoids with respect to CVD^(4–6). However, the

profiles of biological effects show marked differences among the different classes of flavonoids⁽⁷⁾. For example, flavonols exert systemic and coronary vasodilatation^(8,9), while catechins exhibit a weak vasodilator effect⁽⁸⁾. Both flavonoid groups show antioxidant effects *in vitro* and can prevent endothelial dysfunction *in vivo*^(10,11).

Due to their ubiquitous distribution, flavonoids from different classes are commonly present together in foods and/or are consumed in the same meal. In fact, prototypical flavonoid-rich foods contain a large number of different flavonoids in variable amounts. However, little is known about the interactions between them. Quercetin and catechin have been reported to act synergistically in reducing platelet recruitment via the inhibition of protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation^(12,13). Pharmacokinetic interactions have also been described⁽¹⁴⁾.

In the present study, we have analysed the interactions between quercetin and catechin, the representative compounds of the two major classes of flavonoids, on vascular function *in vitro*.

Abbreviations: DETCA, diethyldithiocarbamate; DHE, dihydroethidium.

* **Corresponding author:** F. Perez-Vizcaino, email fperez@med.ucm.es

DISCUSIÓN GENERAL

El rápido aumento de las enfermedades degenerativas en todo el mundo es una amenaza para la calidad de vida y la salud de millones de personas. Además supone un grave problema para el desarrollo económico y social de este siglo. Se estima que hasta un 80% de las enfermedades cardiovasculares, el 90% de la diabetes tipo II y un tercio de los cánceres podrían evitarse cambiando factores que afectan al estilo de vida, incluyendo la dieta (WHO, 2003). Existe, por tanto, un interés creciente en el papel de la nutrición y de componentes específicos de la dieta en la prevención de tales enfermedades. Dentro de los constituyentes de la dieta que están en el foco de interés, los flavonoides y los compuestos fenólicos han atraído la atención de los nutricionistas y de los farmacólogos, especialmente por su alta distribución en frutas, verduras y productos derivados.

A diferencia de las vitaminas tradicionales, los flavonoides no son esenciales para el bienestar a corto plazo, pero existe una evidencia creciente de que su ingesta a medio-largo plazo podría modular el metabolismo humano de una manera favorable, previniendo o reduciendo el riesgo de enfermedades degenerativas, como las cardiovasculares, la diabetes, la obesidad y el cáncer (Holst *et al.*, 2008; Middleton *et al.*, 2000).

Más concretamente, y tal y como hemos revisado en la introducción, aunque todavía no existe una prueba sólida, las evidencias científicas que apoyan la hipótesis de que los flavonoides tienen un importante papel protector de las enfermedades cardiovasculares sigue en continuo crecimiento (Perez-Vizcaino *et al.*, 2010). Se han publicado más de 35,000 estudios sobre los flavonoides y cerca de 10,000 sobre la quercetina, el principal flavonol de la dieta y en el que se ha centrado la atención de esta Tesis Doctoral, y sin embargo, aún quedan por responder algunas preguntas fundamentales acerca de su eficacia, el mecanismo de acción y la biodisponibilidad de los flavonoides.

Los flavonoides son ingeridos regularmente en la dieta en forma de mezclas complejas de los diferentes tipos junto con otras sustancias activas. Una vez ingeridos, los flavonoides están sujetos a modificaciones químicas en el tracto gastrointestinal, mediadas tanto por las enzimas como por la microbiota del organismo y, tras su

absorción a través de la pared intestinal, son metabolizados por el hígado y tejidos periféricos. La matriz del alimento puede influir también en el metabolismo y la absorción gastrointestinal de los flavonoides. Por tanto, a través de nuestra dieta diaria, una multitud de compuestos alcanzan el lumen gastrointestinal, la sangre y los tejidos. Las concentraciones alcanzadas por la mayoría de estas sustancias se encuentran por debajo del rango micromolar y no son detectadas por las técnicas analíticas comunes y, de hecho, sólo un número reducido de estas sustancias centra la atención científica. Sin embargo, es importante destacar que una baja concentración no indica necesariamente una falta de actividad biológica ya que la potencia de la sustancia puede ser muy alta.

Estudios farmacocinéticos en humanos (Day *et al.*, 2001; Gugler *et al.*, 1975) han demostrado que las concentraciones de quercetina como aglicona son indetectables en el plasma. Sin embargo, un gran número de estudios tanto en animales como en humanos, demuestran que la administración oral de quercetina produce un claro efecto biológico. Es decir, paradójicamente, la quercetina produce efectos biológicos a nivel sistémico a pesar de que no se detecta en el plasma después de la ingesta oral.

Durante la última década, se ha demostrado que aunque la quercetina no se encuentra en plasma en su forma aglicona, sí lo están sus metabolitos conjugados con el ácido glucurónico y sulfato, resultantes del efecto de primer paso en el intestino o en el hígado. Day *et al.* (2001) demostraron que los metabolitos de quercetina más numerosos presentes en el plasma son la quercetina-3-glucurónico, la quercetina-3'-sulfato y la isoramnetina-3-glucurónico (3'-metil-quercetina-3-glucurónico).

Durante las últimas décadas, se han obtenido una gran cantidad de resultados a partir de estudios científicos *in vitro* utilizando tanto la quercetina aglicona como otros flavonoides relacionados. Pero, puesto que la quercetina no está presente en el plasma, la relevancia de todos estos estudios utilizando agliconas ha sido cuestionada (Kroon *et al.*, 2004). Por tanto, se propuso que los estudios realizados *in vitro* para caracterizar los posibles mecanismos de acción de estos flavonoides deberían ser repetidos utilizando los principales metabolitos conjugados presentes en el plasma. Aunque la realización de los estudios se ha ralentizado debido a que durante varios años estos metabolitos no han

sido disponibles comercialmente, la información disponible sobre los efectos *in vitro* de estos metabolitos indica que son menos activos que las agliconas y, en la mayoría de los casos, totalmente inactivos. Por ejemplo, los metabolitos glucurónidos y sulfato no tienen ningún efecto vasodilatador en las arterias aisladas y ejercen solo un efecto parcial en la prevención de la disfunción endotelial aguda (Lodi *et al.*, 2009). Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran además, que la quercetina-3-glucurónido, a diferencia de la quercetina e isoramnetina, no sufre auto-oxidación y no modifica los efectos del NO ni la función endotelial en la aorta de rata en condiciones fisiológicas (RESULTS I; Lodi *et al.*, 2008). Por tanto, los resultados disponibles actualmente, no avalan la hipótesis de que los metabolitos son las formas activas y responsables de la actividad biológica *in vivo* de los flavonoides. No obstante, es importante destacar que aún no se ha demostrado que el efecto pro-oxidante de quercetina ocurra también *in vivo*. Para ello sería necesario llevar a cabo más estudios, especialmente en presencia de sangre total y de proteínas como la albúmina humana, la cual podría proteger a la quercetina de la oxidación.

Por otra parte, aunque la quercetina no se encuentra en el plasma sino que, como hemos dicho anteriormente, son sus metabolitos conjugados los que están presentes, varios estudios han observado que en los tejidos las formas agliconas sí están presentes, junto con cantidades variables de metabolitos conjugados (Bieger *et al.*, 2008). Además, los metabolitos glucurónidos de la quercetina pueden ser hidrolizados por la β -glucuronidasa, liberando la estructura aglicona. A principios del siglo XXI, Lee-Hilz *et al.*, (2008) y O'Leary *et al.*, (2001) demostraron que los glucurónidos de quercetina eran hidrolizados y que la actividad de los metabolitos glucurónidos de la quercetina dependía de su desconjugación. Terao *et al.* (2011), basándose en estas evidencias indirectas, propusieron que los metabolitos glucurónidos de quercetina no tenían como única función la de convertirse simplemente en metabolitos no tóxicos, sino que también actuaban como agentes bioactivos hidrofílicos en diversos sistemas de generación de ROS, además de ser precursores de la aglicona hidrofóbica.

En la presente Tesis Doctoral se han abordado algunas de las preguntas fundamentales de esta paradoja en la actividad biológica de los flavonoides. La primera pregunta que

nos planteamos es si los glucurónidos de la quercetina son activos *in vivo*. Para ello, inyectamos la quercetina-3-glucurónido por vía intravenosa (1 mg/kg) a las ratas, es decir, directamente al torrente sanguíneo, que es donde están presentes tras la administración oral de la quercetina, y monitorizamos la presión arterial de la rata durante 8 horas. Observamos que *in vivo*, la quercetina-3-glucurónido produce una progresiva disminución de la presión arterial, confirmando que el glucurónido en plasma es capaz de mimetizar los efectos de la quercetina administrada de forma oral, lo que sugiere que el metabolito glucurónido podría ser el responsable de los efectos de la aglicona. Hay que destacar que el efecto no fue inmediato, sino que sólo se observó una disminución significativa de la presión arterial a partir de 2 horas después de su administración, además, el efecto fue más persistente (hasta 7 horas) que la presencia del propio metabolito en el plasma (RESULTS II; Figura 8; Menendez *et al.*, 2011a).

La segunda pregunta a la que intentamos responder fue la de si los glucurónidos de la quercetina se desconjugan *in vitro* en los tejidos diana. Para responder a esta pregunta, utilizamos el lecho mesentérico aislado como modelo vascular, el cual perfundimos de forma continuada y con la ayuda de una bomba peristáltica con una solución que contenía el metabolito glucurónido, creando un circuito cerrado. Con este diseño experimental, observamos que la aglicona aparecía lentamente en la solución recirculante, era detectable después de 1 ó 2 horas y aumentaba hasta después de 6 horas, mientras que se observaba una disminución en paralelo de la concentración del glucurónido (RESULTS II, Figura 3). Las agliconas también estaban presentes en el tejido después de 3 y 6 horas lo que demuestra que la quercetina-3-glucurónido se desconjuga en la pared vascular. (RESULTS II, Figura 4).

La tercera pregunta que nos planteamos fue si los metabolitos conjugados poseían efectos *in vitro* cuando eran incubados durante un tiempo suficiente como para que se llevara a cabo su desconjugación. Los datos presentados en la sección RESULTS II, muestran que la incubación de anillos aislados de la arteria mesentérica con quercetina-3-glucurónido durante un periodo de 3 horas, inhibe significativamente la vasoconstricción inducida por la fenilefrina, mientras que tiempos más cortos de exposición (por ejemplo, 30 minutos) no son capaces de modificar la respuesta al vasoconstrictor (RESULTS II, Figura 5).

Por último, nos preguntamos si la inhibición de la desconjugación prevendría los efectos de los glucurónidos que habíamos observado. Tras confirmar que la enzima β -glucuronidasa se expresa y es activa en la pared vascular, decidimos analizar los efectos de un inhibidor clásico de la β -glucuronidasa, la D-sacarolactona (RESULTS II, Figuras 3 y 4). El efecto inhibitorio de la sacarolactona sobre la desconjugación del glucurónido de la quercetina había sido previamente demostrado utilizando extractos de hígado (O'Leary *et al.*, 2001). En línea con estos resultados, observamos que este compuesto inhibía tanto la desconjugación a nivel del lecho mesentérico perfundido como los efectos a largo plazo de los metabolitos glucurónidos sobre la vasoconstricción a fenilefrina en los anillos aislados de arterias mesentéricas (RESULTS II, Figuras 5 y 6). Todos estos resultados apoyan la hipótesis de que los glucurónidos presentes en el plasma se comportan como portadores de la quercetina y que la aglicona liberada mediante desconjugación en los órganos diana es el efector final.

Por otra parte, también hemos analizado esta paradoja de los efectos de los flavonoides utilizando un modelo animal de hipertensión arterial esencial, las ratas espontáneamente hipertensas (SHR, Galindo *et al.*, 2012). En este trabajo, no incluido en la presente Tesis Doctoral, demostramos que los efectos antihipertensivos de la quercetina-3-glucurónido son dependiente de dosis, y que este metabolito es eficaz incluso a dosis tan bajas como 0,2 mg/kg. La isoramnetina-3-glucurónido también demostró ser efectiva *in vivo* mientras que, el tercer metabolito más abundante en plasma, la quercetina-3'-sulfato, no presentó ningún efecto. Además, los efectos presentados *in vivo* por la quercetina-3-glucurónido eran prevenidos por la inhibición de la desconjugación mediante la sacarolactona. Los resultados anteriores planteaban una última pregunta fundamental, si la desconjugación estaba implicada en los efectos de la quercetina administrada por vía oral como aglicona. Nuestros datos confirman que, tal y como sugerían los ensayos *in vitro*, la inhibición de la β -glucuronidasa por la sacarolactona bloqueaba totalmente los efectos de la quercetina (Galindo *et al.*, 2012).

En conjunto, la evidencia disponible actualmente indica que la quercetina ingerida oralmente se absorbe parcialmente en el intestino, se metaboliza mayoritariamente

formando metabolitos glucurónidos y sulfatos, que son las formas que circulan en el plasma, y que los glucurono-, pero no los sulfo-conjugados, se hidrolizan a nivel vascular liberando la forma aglicona libre que se acumula en los tejidos (Figura 9). Por lo tanto, estas evidencias confirman que el proceso de conjugación es reversible y, al menos en lo que se refiere al efecto vasodilatador y antihipertensivo, las reacciones de conjugación y desconjugación parecen ser un requisito absoluto.

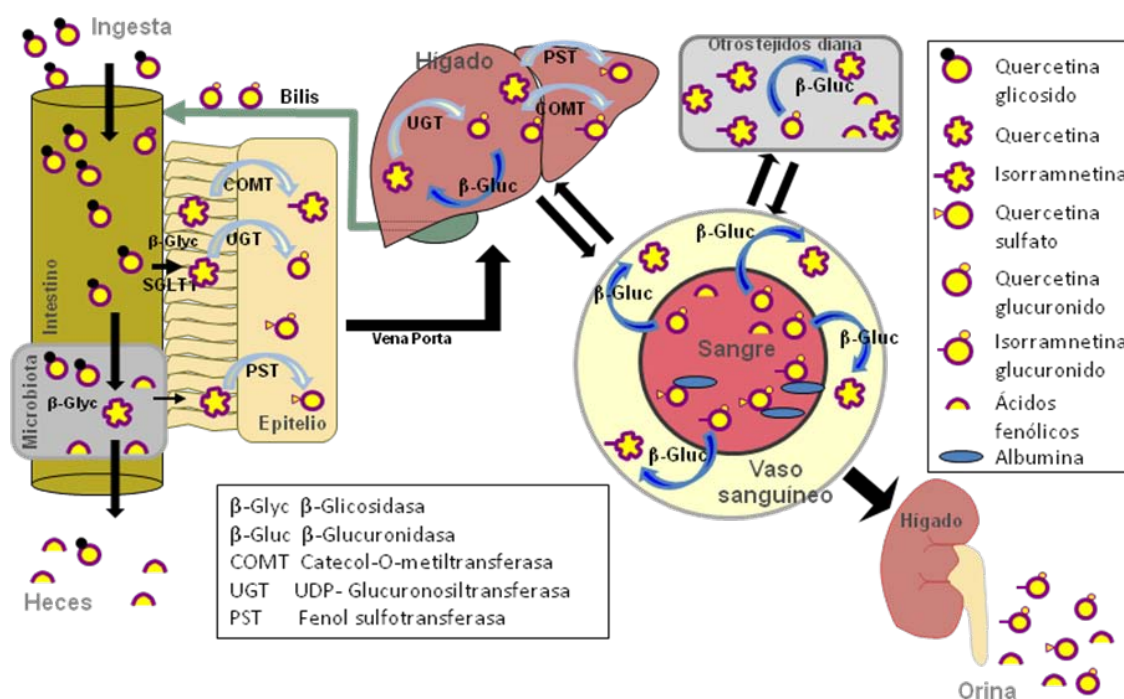


Figura 9. Esquema de la farmacocinética de los flavonoides en el que se muestra gráficamente que la quercetina ingerida oralmente se absorbe parcialmente en el intestino, se metaboliza mayoritariamente formando metabolitos glucurónidos y sulfatos, que son las formas que circulan en el plasma, y en el que se destacan especialmente los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral que indican que los glucurono-, pero no los sulfo-conjugados, se hidrolizan a nivel vascular liberando la forma aglicona libre que se acumula en los tejidos. Este ciclo de conjugación-desconjugación a nivel vascular es esencial en el efecto antihipertensivo de quercetina.

Los metabolitos glucurónidos de quercetina transportan y liberan la aglicona libre *in situ* mediante su desconjugación, que parece ser un proceso más lento que el de

conjugación. Gracias a que la quercetina es más lipofílica puede permanecer unida a los tejidos y en el caso de que la quercetina se liberara de los tejidos hacia el plasma, ésta sería reconjugada de nuevo en el hígado, lo que explica los bajos niveles plasmáticos de quercetina libre. Sin embargo, algunos efectos de los flavonoides podrían ser atribuidos a los metabolitos conjugados por sí mismos y, por lo tanto, aún queda por demostrar si la desconjugación es también necesaria en el resto de efectos importantes de los flavonoides, en especial, en los efectos antiaterogénicos.

Los resultados de esta tesis discutidos anteriormente nos llevan a plantearnos nuevas cuestiones. La más importante es que si la quercetina es, tal y como hemos demostrado el efector final, varios cientos de estudios sobre sus mecanismos de acción, llevados a cabo con la quercetina aglicona *in vitro*, son verdaderamente útiles. En segundo lugar, en los estudios que analizan los efectos de los metabolitos conjugados *in vitro*, la actividad β -glucuronidasa concreta de cada tipo de células estudiada es esencial y, además, el factor tiempo debe ser considerado, ya que la desconjugación es un proceso lento. En tercer lugar, debido a que la pared vascular es capaz de desconjugar los glucurónidos y estos metabolitos deben cruzar esta barrera para alcanzar cualquier tejido, se espera que la aglicona pueda entrar en los tejidos, independientemente de la actividad β -glucuronidasa de las células no vasculares del órgano diana. De hecho, Bieger et al., (2008) analizaron la capacidad de la quercetina para acumularse en los tejidos tras su administración oral y, a pesar que estos autores encontraron la aglicona en todos los tejidos analizados, la actividad específica β -glucuronidasa no se correlacionaba con la proporción de los flavonoles desconjugados en los diferentes tejidos. En cuarto lugar, se confirma a la sacarolactona como una herramienta útil para analizar el papel del proceso de conjugación-desconjugación. En quinto lugar, la actividad β -glucuronidasa puede influir en la eficacia de la quercetina. De hecho, se ha observado que la actividad β -glucuronidasa es mayor en los ratones transgénicos que expresan apoE₃ en comparación con aquellos que expresan apoE₄ (Boesch-Saadatmandi *et al.*, 2010b) y esto podría estar relacionado con la disminución de la presión arterial sistólica en pacientes con un genotipo apoE₃, mientras que el efecto no fue significativo en el grupo con genotipo apoE₄ (Egert *et al.*, 2010b). Por otra parte, la actividad β -glucuronidasa se incrementa en presencia de endotoxinas bacterianas

(Shimoi *et al.*, 2001), lo que sugiere que la quercetina podría ser más activa en condiciones de inflamación. Finalmente, se ha observado que la desconjugación de la quercetina-O-glucurónido sustituida en diferentes posiciones así como la desconjugación de otros flavonoles o isoflavonoides tiene lugar con una eficacia catalítica similar (O'Leary *et al.*, 2001), sugiriendo que todo lo demostrado con la quercetina podría ser válido también para el resto de flavonoides.

Por otra parte, debido a su amplia distribución, las diferentes clases de flavonoides están normalmente presentes de manera simultánea en un mismo alimento y por ello, es frecuente que se consuman conjuntamente a través de la dieta. De hecho, los prototipos de alimentos ricos en flavonoides contienen un amplio número de flavonoides diferentes en cantidades variables. Sin embargo, se conoce poco sobre las interacciones entre ellos. Las tres principales dianas de los efectos de los flavonoides en las enfermedades cardiovasculares son el endotelio, las células del músculo liso vascular y las plaquetas. Pignatelli *et al.* han descrito que existe una interacción sinérgica entre la catequina y la quercetina en sus efectos para inhibir la agregación plaquetaria (Pignatelli *et al.*, 2006; Pignatelli *et al.*, 2000). Los resultados presentados en esta Tesis muestran que en comparación con la quercetina, la catequina produce un modesto efecto vasodilatador en arterias de conductancia y resistencia, sus efectos protectores sobre la disfunción endotelial en condiciones de estrés oxidativo son mínimos y no tiene ningún efecto pro-oxidante. Además, la presencia de la catequina no modifica los efectos de la quercetina en dichos parámetros.

Los mecanismos de interacciones entre fármacos (sinergia, adición o antagonismo) se analizan frecuentemente de manera intuitiva, sin utilizar un método cuantitativamente apropiado. Sin embargo, el análisis isobolográfico representa un método fácil y apropiado para el estudio de las interacciones farmacológicas siempre y cuando ambos fármacos presenten actividad (Tallarida, 2001). En la aorta, este análisis demostró que los efectos de ambos flavonoides fueron aditivos, ya que los puntos que representan su combinación estaban dentro de la línea de aditividad (teniendo en cuenta los errores estándar de los puntos) (RESULTS III, Figura 1. Menendez *et al.*, 2011b). Aunque no pudimos realizar este estudio isobolográfico en las arterias mesentéricas (debido al

insignificante efecto de la catequina), los datos disponibles sugieren que de nuevo no existe ninguna interacción (RESULTS III, Figura 2).

La disfunción endotelial es considerada un indicador precoz e independiente de mal pronóstico para la mayoría de las enfermedades cardiovasculares. Uno de los principales mecanismos causantes de la disfunción endotelial vascular es el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, en particular, del superóxido producido por la NADPH oxidasa, que reacciona rápidamente con el NO endotelial e induce su inactivación. Nuestro grupo ha demostrado previamente que la quercetina restaura la disfunción endotelial tanto *in vitro* (Sanchez *et al.*, 2007) como *in vivo* en varios modelos animales de hipertensión (Sanchez *et al.*, 2006) mediante al menos dos mecanismos. La quercetina muestra de forma aguda un efecto directo barrador de superóxido e inhibe la actividad de las enzimas generadoras de superóxido. De forma crónica, además, puede prevenir la expresión de los genes involucrados en la generación de superóxido, tales como las subunidades de la NADPH oxidasa, que son inducidas por estímulos patológicos como la angiotensina II o la endotelina-1. En este trabajo, inducimos una disfunción endotelial aguda mediante un protocolo basado puramente en la producción de estrés oxidativo, que consiste simplemente en la inhibición de la degradación del superóxido endógeno. En los últimos tiempos se ha formulado la hipótesis de que los compuestos con propiedades barradoras del superóxido intracelular o con capacidad para inhibir su síntesis podrían tener un efecto protector de esta u otras formas de disfunción endotelial. La catequina, a la concentración fisiológicamente relevante de 10 μ M, mostró un mínimo efecto protector sobre el daño producido por el inhibidor de la superóxido dismutasa DETCA sobre la relajación inducida por la acetilcolina. La combinación de la catequina y de la quercetina, a una concentración de 5 μ M, produce un menor efecto que la quercetina 10 μ M, lo que permite descartar una interacción sinérgica entre los dos componentes.

Los antioxidantes muestran frecuentemente también un efecto pro-oxidante cuando se analizan bajo unas condiciones experimentales concretas. De hecho, además de su efecto antioxidante, los flavonoides presentan un efecto prooxidante (Halliwell, 2008; Lopez-Lopez *et al.*, 2004) que puede estar implicado en algunos de sus efectos

biológicos. En condiciones experimentales concretas, el aumento de superóxido producido por la quercetina tiene un efecto barredor de NO que disminuye, por tanto, la vasodilatación inducida por NO (Lopez-Lopez *et al.*, 2004). Además, la quercetina activa los canales de potasio de alta conductancia (canales BKCa), a través de la producción de H₂O₂ (Cogolludo *et al.*, 2007), que contribuye al menos parcialmente a su efecto vasodilatador coronario. La quercetina se auto-oxida y genera superóxido que reacciona rápidamente con NO (Lopez-Lopez *et al.*, 2004). En cambio, la catequina a 10 µM no presenta ningún efecto “*barredor*” de NO. Los compuestos “*barredores*” de superóxido tales como la superóxido dismutasa previenen estos efectos de la quercetina sobre el NO. Se podía esperar que la catequina pudiera prevenir los efectos de la quercetina gracias a su efecto antioxidante, sin embargo, al menos a esta concentración de 10µM, la catequina no previene la auto-oxidación de la quercetina ni el efecto barredor de NO. Las especies reactivas de oxígeno se detectaron usando sondas fluorescentes, tales como DHE, el cual detecta superóxido, o DCF, que detecta principalmente H₂O₂. En esta Tesis, también hemos demostrado que la quercetina aumenta las especies reactivas de oxígeno en el músculo liso de la aorta, confirmando así, los resultados previamente descritos usando DCF en las arterias coronarias (Cogolludo *et al.*, 2007). De acuerdo con su débil efecto barredor de NO descrito en el sistema experimental libre de células, la catequina tampoco mostró un incremento significativo del superóxido intracelular. Se han descrito efectos sinérgicos de la mezcla de polifenoles (catequina, quercetina, hesperidina y ácido ferúlico) en la prevención de la oxidación del LDL en humanos (Cirico *et al.*, 2006). Sin embargo, la presencia de la catequina por sí sola no previene, como ya hemos mencionado, el efecto pro-oxidante de la quercetina ni en el sistema libre de células ni en células de músculo liso en cultivo.

Los flavonoides ejercen efectos vasodilatadores independientes de endotelio que representan uno de los posibles mecanismos implicados en sus efectos antihipertensivos, que a su vez podrían contribuir en la prevención de otros tipos de enfermedades cardiovasculares, tales como el infarto agudo de miocardio y el ictus. Curiosamente, el efecto vasodilatador de la quercetina es más potente en las arterias de resistencia, que son las implicadas en el control de las resistencias vasculares y que, por tanto, regulan el flujo y la presión sanguínea (Perez-Vizcaino *et al.*, 2002). Esta

diferencia puede deberse a las diferencias existentes entre las vías de señalización implicadas en la vasoconstricción de las grandes y pequeñas arterias. Recientemente, se ha considerado que la presión arterial pulmonar puede ser un factor de riesgo cardiovascular (Lam *et al.*, 2009). En este trabajo, se muestra por primera vez que la quercetina también tiene un efecto vasodilatador en las arterias pulmonares de resistencia. Sin embargo, aunque la potencia vasodilatadora de la quercetina fue mayor en las arterias pulmonares que en la aorta, el efecto fue menor que en las arterias mesentéricas de resistencia, lo que indica una baja selectividad por la circulación pulmonar. De nuevo, la catequina mostró un efecto vasodilatador muy pequeño. La catequina y la quercetina tienen una estructura similar, aunque difieren en su estructura tridimensional, la segunda es plana y la primera no, y lo que podría explicar las diferencias entre las actividades biológicas de ambas. Además, aunque el estudio isobolográfico no pudo llevarse a cabo debido al insignificante efecto de la catequina, los datos disponibles sugieren que de nuevo no existe ninguna interacción. Por tanto, al igual que en las arterias sistémicas, la catequina no modifica el efecto vasodilatador de la quercetina en las arterias pulmonares. Es importante destacar que en esta Tesis hemos estudiado la interacción de los dos flavonoides más representativos de la dieta, lo cual no excluye posibles interacciones entre 36366 otras combinaciones diferentes.

CONCLUSIONES

- 1. La quercetina-3-glucurónido, a diferencia de quercetina e isorramnetina, no sufre auto-oxidación y no modifica los efectos del NO y la función endotelial en condiciones fisiológicas.**
- 2. La quercetina-3-glucurónido se desconjuga a nivel vascular, liberando la quercetina libre.**
- 3. La incubación prolongada con quercetina-3-glucurónido produce una inhibición de la vasoconstricción *in vitro* gracias a su desconjugación y a la liberación de la porción de la aglicona activa.**
- 4. La quercetina-3-glucurónido produce una disminución en la presión arterial *in vivo*.**
- 5. Los resultados anteriores sugieren que la quercetina-3-glucurónido actúa como un transportador de la quercetina en el plasma y que la aglicona liberada en los órganos diana es el efector final, al menos para explicar los efectos vasodilatadores.**
- 6. La catequina presenta un débil efecto vasodilatador y sobre la disfunción endotelial y no tiene ningún efecto prooxidante. Los débiles efectos de la catequina sobre la función vascular son aditivos a los producidos por la quercetina, excluyendo por tanto, cualquier interacción sinérgica entre los representantes de las dos principales clases de flavonoides en la dieta.**

CONCLUSIONS

- 1. As opposed to quercetin and isorhamnetin, quercetin-3-glucuronide did not suffer auto-oxidation and did not modify the effects of NO and endothelial function under physiological conditions.**
- 2. Quercetin-3-glucuronide can be deconjugated enzymatically in a perfused vascular bed releasing the free quercetin.**
- 3. Quercetin-3-glucuronide exerts inhibitory effects on vascular contraction *in vitro* when incubated for long time periods via the release of free quercetin.**
- 4. Quercetin-3-glucuronide exerts a progressive and long lasting blood pressure lowering effect *in vivo*.**
- 5. Taken together, these results suggest that the circulating glucuronides in plasma behave as quercetin carriers and that the aglycone released in the target organs seems to be the final effector, at least to explain the vasodilatory effects.**
- 6. Catechin, compared with quercetin, produced weak vasodilator effects in conductance and resistance arteries, a weak ability to modulate oxidative stress-induced endothelial dysfunction and did not show pro-oxidant effects. The weak effects on vascular function produced by catechin are additive with those of quercetin, excluding synergistic interactions of these two flavonoids at this level.**

BIBLIOGRAFÍA

Ahn J, Lee H, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373:545-549.

Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, *et al.* Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:643-651.

Ajay M, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Effect of quercetin on altered vascular reactivity in aortas isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;73:1-7.

Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;74:603-612.

Andlauer W, Kolb J, Stehle P, Furst P. Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine. *J Nutr.* 2000;130:843-846.

Andriambelason E, Magnier C, Haan-Archipoff G, Lobstein A, Anton R, Beretz A, *et al.* Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J Nutr.* 1998;128:2324-2333.

Annapurna A, Reddy CS, Akondi RB, Rao SR. Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61:1365-1374.

Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:892-896.

Aron PM KJ. Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir during fermentation. *J Agric Food Chem* 2007;55:5670-5680.

Auger C, Al Awwadi N, Bornet A, Rouanet J, Gasc F, Cros G, *et al.* Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. *Food Res Int* 2004;37:233-245.

Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, *et al.* Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem.* 2005;53:2015-2021.

Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, *et al.* Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:892-904.

Baba S, Furuta T, Fujioka M, Goromaru T. Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVII: urinary metabolites of rutin in rats and the role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. *J Pharm Sci.* 1983;72:1155-1158.

Balentine D, Wiseman S, Bouwnes L. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997;37:693-704.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond).* 1998;95:115-128.

Barnes S. Phyto-oestrogens and osteoporosis: what is a safe dose? *Br J Nutr.* 2003;89 Suppl 1:S101-108.

Bast A, Wolf G, Oberbaumer I, Walther R. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 2002;45:867-876.

Behr D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L, *et al.* Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chemical biology & drug design.* 2009;74:619-624.

Belinha I, Amorim MA, Rodrigues P, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, *et al.* Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 2007;55:2446-2451.

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

Benito S, Lopez D, Saiz MP, Buxaderas S, Sanchez J, Puig-Parellada P, *et al.* A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2002;135:910-916.

Beretz A, Cazenave JP, Anton R. Inhibition of aggregation and secretion of human platelets by quercetin and other flavonoids: structure-activity relationships. *Agents Actions.* 1982;12:382-387.

Bergeron R, Russell RR, 3rd, Young LH, Ren JM, Marcucci M, Lee A, *et al.* Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. *Am J Physiol.* 1999;276:E938-944.

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

Boersma MG, van der Woude H, Bogaards J, Boeren S, Vervoort J, Cnubben NH, *et al.* Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:662-670.

- Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, *et al.* Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem.* 2011;22:293-299.
- Boesch-Saadatmandi C, Loboda A, Wagner AE, Stachurska A, Jozkowicz A, Dulak J, *et al.* Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem.* 2010a;22:293-299.
- Boesch-Saadatmandi C, Niering J, Minihane AM, Wiswedel I, Gardeman A, Wolfram S, *et al.* Impact of apolipoprotein E genotype and dietary quercetin on paraoxonase 1 status in apoE3 and apoE4 transgenic mice. *Atherosclerosis.* 2010b;211:110-113.
- Bokkenhuse VDSCHLaW, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem. J.* 1987;248:953-956.
- Boulton DW, Walle UK, Walle T. Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51:353-359.
- Bramati L, Aquilano F, Pietta P. Unfermented rooibos tea: Quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2003;51:7472-7474.
- Brookes PS, Digerness SB, Parks DA, Darley-Usmar V. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:1220-1228.
- Bruneton J. *Farmacognosia: fitoquímica y plantas medicinales.* Acribia ed. 2001.
- Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2006;111:508-531.
- Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism.* 2005;54:500-507.
- Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, *et al.* Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 2011;477:482-485.
- Burns J, Gardner P, Matthews D, Duthie G, Lean M, Crozier A. Extraction of phenolic compounds and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J Agric Food Chem.* 2001;49:5797-5808.
- Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean M, Crozier A. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J Agric Food Chem.* 2002;50:3337-3340.
- Busse WW, Kopp DE, Middleton E, Jr. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *J Allergy Clin Immunol.* 1984;73:801-809.

Cano A, Arnao MB, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization. *Redox Rep.* 2002;7:379-383.

Carlstrom J, Symons JD, Wu TC, Bruno RS, Litwin SE, Jalili T. A quercetin supplemented diet does not prevent cardiovascular complications in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr.* 2007;137:628-633.

Cirico TL, Omaye ST. Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol.* 2006;44:510-516.

Clark WG, Mac KE. The absorption and excretion of rutin and related flavonoid substances. *J Am Med Assoc.* 1950;143:1411-1415.

Clifford M. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1063-1072.

Cody V. Crystal and molecular structures of flavonoids. *Prog Clin Biol Res.* 1988;280:29-44.

Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, Cobeno L, Moreno L, Lodi F, *et al.* The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H₂O₂. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res.* 2007;73:424-431.

Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, *et al.* Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;305:390-392.

Comalada M, Ballester I, Bailon E, Sierra S, Xaus J, Galvez J, *et al.* Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1010-1021.

Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr.* 1998;128:593-597.

Corriu C, Feletou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996;119:959-964.

Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005;51:117-123.

Coughtrie MW, Sharp S, Maxwell K, Innes NP. Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases. *Chem Biol Interact.* 1998;109:3-27.

- Coward L, Smith M, Kirk M, Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:14865-14915.
- 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.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol.* 1999;277:G120-126.
- Crozier A, Ashihara H, Clifford M *Plant Secondary Metabolites and the Human Diet*. edn,2006a. Blackwell Publishing: Oxford.
- Crozier A, Jaganath I, Clifford M Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: In: Crozier A AH, Clifford MN (ed)^(eds). *Plant Secondary Metabolites and the Human Diet*, edn,2006b. Oxford: Blackwell Publishing. p^pp 1-31.
- Crozier A MM, Lean MEJ, Black C. Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997;45 590-595
- Crozier A, Yokota T, Jaganath I, Marks S, Saltmarsh M, Clifford M Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. In: Crozier A AH, Clifford MN, (ed)^(eds). *Plant Secondary Metabolites and the Human Diet*, edn,2006c. Oxford: Blackwell Publishing. p^pp 208-302.
- Cui Y, Konig J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem.* 2001;276:9626-9630.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr.* 2000;130:1963-1970.
- Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schhmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citrata* (DC.)). *J Agric Food Chem* 2005;53:2511-2517.
- Cho JY, Kim IS, Jang YH, Kim AR, Lee SR. Protective effect of quercetin, a natural flavonoid against neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *Neurosci Lett.* 2006;404:330-335.
- Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl 3:S28-39.

Choudhury R, Srani SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:278-286.

Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, *et al.* Cell culture protection and *in vivo* neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res.* 2003;5:425-432.

Dauchet L, Amouyel P, Dallongeville J. Fruits, vegetables and coronary heart disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6:599-608.

Day AJ, Bao Y, Morgan MR, Williamson G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med.* 2000a;29:1234-1243.

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, *et al.* Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* 2000b;468:166-170.

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, *et al.* Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* 1998;436:71-75.

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:1199-1206.

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

de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, *et al.* Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr.* 2005;135:1718-1725.

de Pascual-Teresa S, Johnston KL, DuPont MS, O'Leary KA, Needs PW, Morgan LM, *et al.* Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *J Nutr.* 2004;134:552-557.

Dégenève A Antioxidants in Fruits and Vegetables. MSc Thesis, University of Glasgow., Glasgow, 2004.

Del Rio D, Stewart A, Mullen W, Burns J, Lean M, Brighenti F, *et al.* HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2807-2815.

- Delmonte P, Perry J, Rader J. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, red clover and kudzu: Extraction followed by basic or acid hydrolysis. *J Chromatography A* 2006;1107:59-69.
- DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem Toxicol.* 2001;39:209-228.
- Dewick P Isoflavonoids. In: JB H (ed)^(eds). *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, edn,1993. London: Chapman and Hall. p^pp 117-238.
- Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005;135:2299-2304.
- Dixon R, Steele C. Flavonoids and isoflavonoids-a goldmine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 1999;4:394-400.
- Donner H, Gao L, Mazza G. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions. *Allium cepa L. Food Res Int.* 1997;30:637-643.
- Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, Galisteo M, Perez-Palencia R, Vargas F, *et al.* Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J Hypertens.* 2002;20:1843-1854.
- Duarte J, Jimenez R, Villar IC, Perez-Vizcaino F, Jimenez J, Tamargo J. Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta. *Planta Med.* 2001a;67:567-569.
- Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, *et al.* Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001b;133:117-124.
- Duarte J, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1993a;239:1-7.
- Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993b;24:857-862.
- 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.
- Dvorakova M, Hulín P, Karabín M, Dostalek P. Determination of polyphenols in beer by an effective method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography with diode-array detection. *Czech J. Food Sci* 2007;25:182-188.

Echeverry C, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Midiwo JO, Ochieng C, Kerubo L, *et al.* Pretreatment with natural flavones and neuronal cell survival after oxidative stress: a structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem.* 2010;58:2111-2115.

Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr.* 2007;137:2405-2411.

Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Muller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr.* 2009;140:278-284.

Egert S, Boesch-Saadatmandi C, Wolfram S, Rimbach G, Muller MJ. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *J Nutr.* 2010b;140:278-284.

Eid HM, Martineau LC, Saleem A, Muhammad A, Vallerand D, Benhaddou-Andaloussi A, *et al.* Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54:991-1003.

Fang XK, Gao J, Zhu DN. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. *Life Sci.* 2008;82:615-622.

Feletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 2009;117:139-155.

Ferreres F, Gil M, Castañer M, Tomás-Barberán F. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *J Agric Food Chem.* 1997;45:4249-4254.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol.* 1993;265:H774-778.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet.* 1993;341:454-457.

Fryer LG, Foufelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carling D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J.* 2002;363:167-174.

Galindo P, Rodriguez-Gomez I, Gonzalez-Manzano S, Duenas M, Jimenez R, Menendez C, *et al.* Glucuronidated Quercetin Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats via Deconjugation. *PLoS One.* 2012; 7(3).

- Galisteo M, Garcia-Saura MF, Jimenez R, Villar IC, Wangensteen R, Zarzuelo A, *et al.* Effects of quercetin treatment on vascular function in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Comparative study with verapamil. *Planta Med.* 2004;70:334-341.
- Garcia-Saura MF, Galisteo M, Villar IC, Bermejo A, Zarzuelo A, Vargas F, *et al.* Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2005;270:147-155.
- Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 2002;75:880-886.
- Gil M, Tomás-Barberán F, Hess-Pierce B, Holcroft D, Kader A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Biol Chem.* 2000;48:4581-4589.
- Gong M, Garige M, Varatharajalu R, Marmillot P, Gottipatti C, Leckey LC, *et al.* Quercetin up-regulates paraoxonase 1 gene expression with concomitant protection against LDL oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379:1001-1004.
- Graham T. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 1991;95:594-603.
- Granado-Serrano AB, Martin MA, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin modulates NF-kappa B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells. *Nutr Cancer.* 2010;62:390-401.
- Griffiths LA, Hackett AM. Hepatic clearance and disposition of hydroxyethylrutosides. *Arch Toxicol Suppl.* 1978;243-246.
- Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:317-322.
- Gu L, Kelm M, Hammerstone J, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, *et al.* Concentration of proanthocyanidins in common foods and estimates of normal consumption. *J Nutr* 2004;134:613-617.
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ. Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol.* 1975;9:229-234.
- Hackett AM. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. *Prog Clin Biol Res.* 1986;213:177-194.
- Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008;476:107-112.

Harada M, Kan Y, Naoki H, Fukui Y, Kageyama N, Nakai M, *et al.* Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999;63:973-977.

Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000;55:481-504.

Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, *et al.* Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2744-2752.

Herrmann K. Flavonols and flavones in food plants: A review. *J Food Technol.* 1976;11:433-448.

Hertog M, Hollman P, Katan M. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992;40:2379-2383.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342:1007-1011.

Hertog MG, Hollman PC. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50:63-71.

Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:1489-1494.

Holst B, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19:73-82.

Hollman PC. Bioavailability of flavonoids. *Eur J Clin Nutr.* 1997a;51 Suppl 1:S66-69.

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.

Hollman PC, Geelen A, Kromhout D. Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women. *J Nutr.* 2010;140:600-604.

Hollman PC, Katan MB. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl.* 1998;20:237-248.

Hollman PC, vd Gaag M, Mengelers MJ, van Trijp JM, de Vries JH, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:703-707.

Hong Y-J, Mitchell E. Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2005;52:6794-6801.

Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, *et al.* Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:38-50.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006;444:860-867.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003;425:191-196.

Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Huang JH, Huang CJ, *et al.* Effects of luteolin and quercetin, inhibitors of tyrosine kinase, on cell growth and metastasis-associated properties in A431 cells overexpressing epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol.* 1999;128:999-1010.

Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS. Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin and other flavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997;63:9-15.

Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:904-908.

Ibarra M, Moreno L, Vera R, Cogolludo A, Duarte J, Tamargo J, *et al.* Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats. *Planta Med.* 2003;69:995-1000.

Ibarra M, Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Lopez-Lopez JG, *et al.* Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria. *Planta Med.* 2002;68:307-310.

Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett.* 2001;171:11-16.

Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in planta. *J Plant Res.* 2000;113:287-299.

Jackson SJ, Venema RC. Quercetin inhibits eNOS, microtubule polymerization, and mitotic progression in bovine aortic endothelial cells. *J Nutr.* 2006;136:1178-1184.

Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, Wu TC, *et al.* Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47:531-541.

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, *et al.* Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:255-262.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B, Keppler D. ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* 1997;327 (Pt 1):305-310.

Jimenez R, Andriambelason E, Duarte J, Andriantsitohaina R, Jimenez J, Perez-Vizcaino F, *et al.* Involvement of thromboxane A2 in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1539-1544.

Joubert E, Ferreira D. Antioxidants of rooibos tea-a possible explanation for its health promoting properties? *SA J Food Sci Nutr* 1996;8:79-83.

Jurkovicova D, Kopacek J, Stefanik P, Kubovcakova L, Zahradnikova A, Jr., Zahradnikova A, *et al.* Hypoxia modulates gene expression of IP3 receptors in rodent cerebellum. *Pflugers Arch.* 2007;454:415-425.

Kamada C, da Silva EL, Ohnishi-Kameyama M, Moon JH, Terao J. Attenuation of lipid peroxidation and hyperlipidemia by quercetin glucoside in the aorta of high cholesterol-fed rabbit. *Free Radic Res.* 2005;39:185-194.

Kanazawa K, Sakakibara H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in Cavendish banana. *J Agric Food Chem* 2000;48:844-848.

Kao TK, Ou YC, Raung SL, Lai CY, Liao SL, Chen CJ. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci.* 2010;86:315-321.

Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, *et al.* Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem.* 2008b;283:9424-9434.

Kawai Y, Nishikawa T, Shiba Y, Saito S, Murota K, Shibata N, *et al.* Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem.* 2008;283:9424-9434.

Kay CD. The future of flavonoid research. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl 3:S91-95.

- Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med.* 1996;156:637-642.
- Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes.* 2005;54:3056-3062.
- Khan NQ, Lees DM, Douthwaite JA, Carrier MJ, Corder R. Comparison of red wine extract and polyphenol constituents on endothelin-1 synthesis by cultured endothelial cells. *Clin Sci (Lond).* 2002;103 Suppl 48:72S-75S.
- Khoo NK, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, *et al.* Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free Radic Biol Med.* 2010;49:339-347.
- Kim DS, Takai H, Arai M, Araki S, Mezawa M, Kawai Y, *et al.* Effects of quercetin and quercetin 3-glucuronide on the expression of bone sialoprotein gene. *J Cell Biochem.* 2007;101:790-800.
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 2006a;113:1888-1904.
- Knab AM, Shanely RA, Henson DA, Jin F, Heinz SA, Austin MD, *et al.* Influence of quercetin supplementation on disease risk factors in community-dwelling adults. *J Am Diet Assoc.* 2011;111:542-549.
- Knekt P, Isotupa S, Rissanen H, Heliovaara M, Jarvinen R, Hakkinen S, *et al.* Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54:415-417.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 1996;312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:560-568.
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Takahashi Y. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:859-868.
- Kobuchi H, Roy S, Sen CK, Nguyen HG, Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am J Physiol.* 1999;277:C403-411.
- Koga T, Meydani M. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:941-948.

Kong J, Chia L, Goh N, Chia T, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003 64.

Konig J, Cui Y, Nies AT, Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G156-164.

Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1461:377-394.

Konishi Y. Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Agric Food Chem.* 2005;53:601-607.

Krafczyk N, Glomb M. Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. *J Agric Food Chem* 2008;56:3368-3376.

Krause M, Galensa G. Determination of naringenin and naringenin-chalcone in tomato skins by reversed phase HPLC after solid phase extraction. *Z Lebensmittel Forschung A* . 1992;194:29-32.

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

Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-191.

Kuhnle G, Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srail SK, *et al.* Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;277:507-512.

Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, *et al.* Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J.* 2007;21:366-377.

Lam CS, Borlaug BA, Kane GC, Enders FT, Rodeheffer RJ, Redfield MM. Age-associated increases in pulmonary artery systolic pressure in the general population. *Circulation.* 2009;119:2663-2670.

Lee-Hilz YY, Stolaki M, van Berkel WJ, Aarts JM, Rietjens IM. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:2128-2134.

Lee KH, Park E, Lee HJ, Kim MO, Cha YJ, Kim JM, *et al.* Effects of daily quercetin-rich supplementation on cardiometabolic risks in male smokers. *Nutr Res Pract.* 2011;5:28-33.

- Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase. *J Agric Food Chem*. 2009;57:11463-11468.
- Liang C, DeCourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2009a;59:943-950.
- Liang C, Oest ME, Prater MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2009b;86:377-384.
- Lin J, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Rimm EB, *et al*. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1305-1313.
- Lodi F, Jimenez R, Menendez C, Needs PW, Duarte J, Perez-Vizcaino F. Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta Med*. 2008;74:741-746.
- Lodi F, Jimenez R, Moreno L, Kroon PA, Needs PW, Hughes DA, *et al*. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis*. 2009;204:34-39.
- Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2008a;88:1018-1025.
- Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, *et al*. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:749-757.
- Lopez-Lopez G, Moreno L, Cogolludo A, Galisteo M, Ibarra M, Duarte J, *et al*. Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*. 2004;65:851-859.
- Luo H, Jiang BH, King SM, Chen YC. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. *Nutr Cancer*. 2008;60:800-809.
- Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs*. 2003;63:71-100.
- Llorach R, Martinez-Sanchez A, Tomas-Barberan F, Gil M, Ferreres F. Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole. *Food Chem Toxicol*. 2008;108:1028-1038.

- Mackraj I, Govender T, Ramesar S. The antihypertensive effects of quercetin in a salt-sensitive model of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;51:239-245.
- Machha A, Mustafa MR. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005;46:36-40.
- Makris D, Rossiter J. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. *J Agric Food Chem* 2001;49:3216-3222.
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F, *et al*. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett*. 1998;426:331-336.
- Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*. 1997;409:12-16.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, *et al*. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*. 1995;125:1911-1922.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-747.
- Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Regerat F, Demigne C, *et al*. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:1259-1266.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:230S-242S.
- Mantei N, Villa M, Enzler T, Wacker H, Boll W, James P, *et al*. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme. *EMBO J*. 1988;7:2705-2713.
- Marks S, Mullen W, Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *J Sci Food Agric* 2007;87:719-728.
- Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, *et al*. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14855-14860.
- Mazza G, Miniati E. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. *Boca Raton, FL: CRC Press*. 1993.

- McAnlis GT, McEneny J, Pearce J, Young IS. Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur J Clin Nutr.* 1999;53:92-96.
- McKay D, Blumberg J. A review of the bioactivity of South African herbal teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytotherap Res* 2007;21:1-16.
- Menendez C, Duenas M, Galindo P, Gonzalez-Manzano S, Jimenez R, Moreno L, *et al.* Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol Nutr Food Res.* 2011a;55:1780-1790.
- Menendez C, Jimenez R, Moreno L, Galindo P, Cogolludo A, Duarte J, *et al.* Lack of synergistic interaction between quercetin and catechin in systemic and pulmonary vascular smooth muscle. *Br J Nutr.* 2011b;105:1287-1293.
- Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:339-345.
- 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.
- Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, *et al.* SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1263-1269.
- Mochizuki M, Kajiya K, Terao J, Kaji K, Kumazawa S, Nakayama T, *et al.* Effect of quercetin conjugates on vascular permeability and expression of adhesion molecules. *Biofactors.* 2004;22:201-204.
- Monfardini C, Veronese FM. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug Chem.* 1998;9:418-450.
- Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* 2001;276:30392-30398.
- Moon JH, Nakata R, Oshima S, Inakuma T, Terao J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R461-467.
- Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J. Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:1274-1285.
- Moon SK, Cho GO, Jung SY, Gal SW, Kwon TK, Lee YC, *et al.* Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle

regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301:1069-1078.

Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol.* 1998;275:R212-219.

Motoyama K, Koyama H, Moriwaki M, Emura K, Okuyama S, Sato E, *et al.* Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice. *Nutrition.* 2009;25:421-427.

Mullen W, Boitier A, Stewart A, Crozier A. Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: Analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2004;1058:163-168.

Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br J Nutr.* 2006;96:107-116.

Mullen W, Rouanet JM, Auger C, Teissedre PL, Caldwell ST, Hartley RC, *et al.* Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats. *J Agric Food Chem.* 2008;56:12127-12137.

Munzel T, Hink U, Yigit H, Macharzina R, Harrison DG, Mulsch A. Role of superoxide dismutase in *in vivo* and *in vitro* nitrate tolerance. *Br J Pharmacol.* 1999;127:1224-1230.

Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2003;417:12-17.

Murota K, Terao J. Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett.* 2005;579:5343-5346.

Negre-Salvayre A, Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med.* 1992;12:101-106.

Ness AR, Powles JW. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol.* 1997;26:1-13.

Nifli AP, Theodoropoulos PA, Munier S, Castagnino C, Roussakis E, Katerinopoulos HE, *et al.* Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution. *J Agric Food Chem.* 2007;55:2873-2878.

Nomura M, Takahashi T, Nagata N, Tsutsumi K, Kobayashi S, Akiba T, *et al.* Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. *Biol Pharm Bull.* 2008;31:1403-1409.

- Nuraliev Iu N, Avezov GA. [The efficacy of quercetin in alloxan diabetes]. *Eksp Klin Farmakol.* 1992;55:42-44.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:479-491.
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Sly WS, O'Brien NM, Williamson G. Flavonoid glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* 2001;503:103-106.
- O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res.* 2004;551:245-254.
- Oliveira EJ, Watson DG. *In vitro* glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1A9 microsomes. *FEBS Lett.* 2000;471:1-6.
- Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr.* 2000;130:1200-1203.
- Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010;17:431-435.
- Paigen K. Mammalian beta-glucuronidase: genetics, molecular biology, and cell biology. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1989;37:155-205.
- Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J Agric Food Chem.* 2005;53:158-163.
- Patil CS, Singh VP, Satyanarayan PS, Jain NK, Singh A, Kulkarni SK. Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. *Pharmacology.* 2003;69:59-67.
- Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, Duarte J, Cogolludo A, Moreno L, *et al.* The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006a;346:919-925.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. *Mol Aspects Med.* 2010;31:478-494.
- Perez-Vizcaino F, Duarte J, Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols. *Free Radic Res.* 2006b;40:1054-1065.

Perez-Vizcaino F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnaez F, Moreno L, *et al.* 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.

Peterson J, Dwyer M. Flavonoids: Dietary occurrences and biochemical activity. *Nutr Res* 1998;18:1995-2018.

Picq M, Dubois M, Prigent AF, Nemoz G, Pacheco H. Inhibition of the different cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms separated from rat brain by flavonoid compounds. *Biochem Int.* 1989;18:47-57.

Pietsch K, Saul N, Menzel R, Sturzenbaum SR, Steinberg CE. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology.* 2009;10:565-578.

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

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. *FASEB J.* 2006a;20:1082-1089.

Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G, *et al.* Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis.* 2006b;188:77-83.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, *et al.* The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:1150-1155.

Piskula MK. Soy isoflavone conjugation differs in fed and food-deprived rats. *J Nutr.* 2000;130:1766-1771.

Prior R, Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Rad Res* 2006;40:1014-1028.

Punithavathi VR, Prince PS. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sci.* 2009;86:178-184.

Purohit A, Reed MJ, Morris NC, Williams GJ, Potter BV. Regulation and inhibition of steroid sulfatase activity in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;784:40-49.

Quast U, Cook NS. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10:431-435.

Reaven GM, Chang H. Relationship between blood pressure, plasma insulin and triglyceride concentration, and insulin action in spontaneous hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens.* 1991;4:34-38.

Regazzetti C, Peraldi P, Gremeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, *et al.* Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes.* 2009;58:95-103.

Rice-Evans C, Packer L *Flavonoids in Health and Disease.* edn,1998.

Rice-Evans CA PL *Flavonoids in Health and Disease.* edn,1998b: New York.

Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1106-1110.

Rivera F, Costa G, Abin A, Urbanavicius J, Arruti C, Casanova G, *et al.* Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotox Res.* 2008a;13:105-114.

Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2008b;16:2081-2087.

Romero M, Jimenez R, Hurtado B, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Lopez-Sepulveda R, *et al.* Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 2010;627:242-250.

Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, *et al.* Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis.* 2009;202:58-67.

Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 2002;102:1414-1420.

Sanchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, *et al.* Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006;24:75-84.

Sanchez M, Lodi F, Vera R, Villar IC, Cogolludo A, Jimenez R, *et al.* Quercetin and isorhamnetin prevent endothelial dysfunction, superoxide production, and overexpression of p47phox induced by angiotensin II in rat aorta. *J Nutr.* 2007;137:910-915.

- Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric* 2000;80:1094-1117.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000;130:2073S-2085S.
- Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
- Schieber A, Ullrich W, Carle R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Sci Emerg Technol* 2000;1:161-166.
- Sesso HD, Gaziano JM, Liu S, Buring JE. Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:1400-1408.
- Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:665-679.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, *et al*. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr*. 2001;131:1362S-1375S.
- Shan B, Cai Y, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem* 2005;53:7749-7759.
- Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, *et al*. Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain Res Bull*. 2007;73:55-63.
- Shiba Y, Kinoshita T, Chuman H, Taketani Y, Takeda E, Kato Y, *et al*. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem Res Toxicol*. 2008;21:1600-1609.
- Shimoi K, Saka N, Nozawa R, Sato M, Amano I, Nakayama T, *et al*. Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab Dispos*. 2001;29:1521-1524.
- Shirai M, Moon JH, Tsushida T, Terao J. Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin 3-O-beta-D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes. *J Agric Food Chem*. 2001;49:5602-5608.
- Shirai M, Yamanishi R, Moon JH, Murota K, Terao J. Effect of quercetin and its conjugated metabolite on the hydrogen peroxide-induced intracellular production of reactive oxygen species in mouse fibroblasts. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:1015-1021.

- Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, *et al.* Influence of the antioxidant quercetin *in vivo* on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol.* 1999;57:199-208.
- Silberberg M, Gil-Izquierdo A, Combaret L, Remesy C, Scalbert A, Morand C. Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2006;60:529-535.
- Silberberg M, Morand C, Manach C, Scalbert A, Remesy C. Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sciences.* 2005;77:3156-3167.
- Silva B, Oliveira PJ, Dias A, Malva JO. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. *Neurotox Res.* 2008;13:265-279.
- Simonyi A, Wang Q, Miller RL, Yusof M, Shelat PB, Sun AY, *et al.* Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2005;31:135-147.
- Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *J Am Coll Nutr.* 2005;24:376-384.
- Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys.* 2004;423:148-161.
- Spencer JP, Chaudry F, Pannala AS, Srai SK, Debnam E, Rice-Evans C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:236-241.
- Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* 1999;458:224-230.
- Stewart A, Mullen W, Crozier A. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:19.
- Stewart LK, Soileau JL, Ribnicky D, Wang ZQ, Raskin I, Poulev A, *et al.* Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism.* 2008;57:S39-46.

Stoclet JC, Kleschyov A, Andriambeloson E, Diebolt M, Andriantsitohaina R. Endothelial no release caused by red wine polyphenols. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50:535-540.

Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J*. 2005;386:471-478.

Stump CS, Henriksen EJ, Wei Y, Sowers JR. The metabolic syndrome: role of skeletal muscle metabolism. *Ann Med*. 2006;38:389-402.

Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, *et al*. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:836-841.

Sultana B, Anwar F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem*. 2008;108:879-884.

Suri S, Liu XH, Rayment S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, *et al*. Quercetin and its major metabolites selectively modulate cyclic GMP-dependent relaxations and associated tolerance in pig isolated coronary artery. *Br J Pharmacol*. 2010;159:566-575.

Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison JL, *et al*. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J Nutr*. 2004;134:2275-2279.

Tallarida RJ. Drug synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298:865-872.

Tauber AI, Fay JR, Marletta MA. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Biochem Pharmacol*. 1984;33:1367-1369.

Taubert D, Berkels R, Klaus W, Roesen R. Nitric oxide formation and corresponding relaxation of porcine coronary arteries induced by plant phenols: essential structural features. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;40:701-713.

Terao J Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation: Significance of metabolic conversion. In: Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (ed)^(eds). *Antioxidant Food Supplements in Human Health.*, edn,1999. San Diego: Academic Press. p[^]pp 255-269.

Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*. *Food Funct*. 2011;2:11-17.

Tomás-Barberán F, Clifford M. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1024-1032.

Tribolo S, Lodi F, Connor C, Suri S, Wilson VG, Taylor MA, *et al.* Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2008;197:50-56.

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

Ullmann U, Haller J, Decourt JP, Girault N, Girault J, Richard-Caudron AS, *et al.* A single ascending dose study of epigallocatechin gallate in healthy volunteers. *J Int Med Res*. 2003;31:88-101.

van de Woude H, Boersma M, Vervoort J, Rietjens I. Identification of 14 quercetin phase II mono and mixed conjugates and their formation by rat and human phase II *in vitro* model systems. *Chem Res Toxicol* 2004;17:1520-1530.

Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens*. 2004;17:1040-1044.

Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:829-837.

Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol*. 2007;17:354-362.

Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J Nutr*. 2005;135:48-52.

Wan LL, Xia J, Ye D, Liu J, Chen J, Wang G. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc Ther*. 2009;27:28-33.

Wang H, Race E, Shrikhande A. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2003;51:1839-1844.

Weinreb RN, Jeng S, Miller AL. Lysosomal enzyme activity in human aqueous humor. *Clin Chim Acta*. 1991;199:1-5.

WHO (2003). Diet Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, WHO Technical Report Series 916. Geneva: World Health Organization.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1149-1160.

Williamson G Common features in the pathways of absorption and metabolism of flavonoids. In: Mark S . Meskin WRB, Audra J . Davies , Douglas S . Lewis , and R . Keith Randolph CRC Press 2004 (ed)^(eds). *Phytochemicals*, edn,2004. p^pp.

Williamson G, Barron D, Shimoi K, Terao J. *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Radic Res.* 2005a;39:457-469.

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:16-22.

Winterbone MS, Tribolo S, Needs PW, Kroon PA, Hughes DA. Physiologically relevant metabolites of quercetin have no effect on adhesion molecule or chemokine expression in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2009;202:431-438.

Wright B, Moraes LA, Kemp CF, Mullen W, Crozier A, Lovegrove JA, *et al.* A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *Br J Pharmacol.* 2010;159:1312-1325.

Wu X, Gu L, Prior R, McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *J Agric Food Chem.* 2004;52:7846-7856.

Yamamoto N, Moon JH, Tsushida T, Nagao A, Terao J. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion-induced lipid peroxidation in human low-density lipoprotein. *Arch Biochem Biophys.* 1999;372:347-354.

Yamamoto Y, Oue E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:933-939.

Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, *et al.* Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci.* 2008;82:1032-1039.

Yochum L, Kushi LH, Meyer K, Folsom AR. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* 1999;149:943-949.

Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y, Kirima K, Kyaw M, Moon JH, *et al.* Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293:1458-1465.

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, *et al.* Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem.* 2002;277:50230-50236.

Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 2005;39:1119-1125.

Zhao X, Gu Z, Attele AS, Yuan CS. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. *J Ethnopharmacol.* 1999;67:279-285.

Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG. Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *J Biol Chem.* 1994;269:292-299.

