

**UNIVERSIDAD:** Universidad Nacional de La Plata

**NUCLEO DISCIPLINARIO:** Productos Naturales Bioactivos y sus aplicaciones

**TITULO DEL TRABAJO:** EFECTO DE LOS HIDROLIZADOS DE AMARANTO SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.

**AUTORES:** Fritz Mariana, Vecchi Bruno, Condés María Cecilia, Añón María Cristina y Rinaldi Gustavo.

**CORREO ELECTRONICOS DE LOS AUTORES:** [marianafritz@hotmail.com](mailto:marianafritz@hotmail.com)

**PALABRAS CLAVES:** Hidrolizado de amaranto, presión arterial, enzima convertidora de angiotensina.

## **INTRODUCCIÓN**

Desde hace ya varios años existe una gran preocupación social sobre el efecto que poseen los alimentos en la salud del consumidor. En este sentido existen numerosos estudios que muestran la acción de diferentes componentes alimentarios sobre distintos sistemas del organismo humano. Así por ejemplo en los últimos diez años se han reunido evidencias que indican que las proteínas alimentarias son fuentes de péptidos bioactivos, los cuales se liberan en el organismo durante la digestión y ejercen un efecto benéfico más allá del nutricional (1, 2).

## **OBJETIVOS**

En función de estas evidencias decidimos analizar la existencia de péptidos bioactivos con actividad hipotensora obtenidos por hidrólisis enzimática controlada de aislados proteicos de amaranto (APA). Se procedió a la obtención de hidrolizados con alcalasa y de distinto grado de hidrólisis. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- 1- Evaluar la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina por los hidrolizados de amaranto.
- 2- Evaluar el efecto de los hidrolizados de amaranto sobre la presión arterial
- 3- En el caso de encontrar un efecto hipotensor, estudiar in-vitro si ese efecto se debe predominantemente a vasodilatación periférica o a depresión de la contractilidad miocárdica.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las semillas de *Amaranthus mantegazzianus* pass c.v. Don Juan fueron donadas por la Ingeniera Rosa Troiani (Estación experimental INTA Anguil La Pampa). Las semillas enteras se molieron en un molino Udy, de 1mm de mesh y se tamizaron a través de un cedazo de mesh 10xx (0,092mm). La harina se desgrasó mediante tratamiento con n-hexano. Una suspensión de harina al 10% p/v en n-hexano se mantuvo bajo agitación continua durante 5 horas a temperatura ambiente. Luego se procedió a separar la harina tratada del hexano mediante filtración a temperatura ambiente y se secó en las mismas condiciones. La harina así obtenida, desgrasada, se almacenó a 4°C.

La obtención de aislado nativo a partir de harina desgrasada de amaranto se efectuó según la técnica descrita por Martínez y col. (1996) (3). La harina desgrasada se suspendió en agua bidestilada a un 10% p/v. Las proteínas se extrajeron en agua alcalina durante una hora a temperatura ambiente a pH = 9 (llevado con NaOH 2 N). La dispersión así obtenida

se centrifugó durante 20 minutos a 9.000 g en centrífuga Beckman a 10°C. Se extrajo el sobrenadante; las proteínas se precipitaron a pH = 5 con HCl 2 N. Se centrifugó a 9.000 g durante 20 minutos a 10°C. El precipitado se resuspendió en agua bidestilada (1:3) y se llevó a neutralidad (pH = 7 con NaOH 0,1 N). Se congeló y liofilizó, conservando a 4°C hasta su uso.

El aislado nativo se suspendió a un 10% p/v en agua alcalina a pH = 10 llevado con NaOH 0,1 N, con agitación constante durante una hora a 37°C en un agitador orbital con termostato. Luego se agregó la solución de alcalasa (Sigma Protease from *Bacillus licheniformis*: actividad 1,71 unidades Anson/g sólido) y se incubó durante 4 o 5 horas a 37°C. La detención de la reacción se efectuó a 85°C durante 10 minutos, el calentamiento fue seguido de una congelación y liofilización inmediatas. La relación enzima-sustrato fue de 0,08  $\mu$ l de enzima por mg de aislado para la alcalasa.

El grado de hidrólisis se determinó dosando los grupos amino libres mediante la reacción del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS, 4)

$$GH \% = \frac{(NH_{2t} - NH_{2t=0}) \times 100}{NH_{2 \text{ totales}}}$$

El contenido proteico fue determinado por el método de Kjeldahl de acuerdo con la AOAC (1984) (5). El factor de conversión utilizado fue 5,85 gramos de proteína/gramo de N por ser el que mejor se ajusta para las proteínas de amaranto (6, 7). Para determinar la solubilidad se utilizó el método de Lowry y col. (1951) (8), y el porcentaje de solubilidad fue expresado como: (s x 100) / mg de proteína total (método de Kjeldahl).

#### Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina

La actividad inhibitoria de ECA fue medida utilizando el método de Cushman y Cheung (1971) modificado por Kim y col. (1999) (9).

Reactivos:

Muestra (inhibidor): suspensión del hidrolizado 5 mg/mL en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,3 M (pH 8,3). Se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante.

Captopril (inhibidor): se preparó una solución stock de 1 mg/mL (4,6 mM) en agua bidestilada, de 1 semana de vida útil a 4 °C. Al momento de utilizar se diluyó 1:4000 en tres diluciones seriadas de 1:20, 1:20 y 1:10, llegando a una concentración de 1,15  $\mu$ M.

Hipuril-Histidil-Leucina (HHL, sustrato): 5 mM en el buffer anterior.

ECA: La proteína purificada sólida se llevó a 1 U/mL en buffer anterior + glicerol al 20% p/v.

Desarrollo:

Se incubaron 2,5 mU de enzima con 150  $\mu$ L de sustrato sintético y 25  $\mu$ L de muestra a 37 °C durante 1 hora. La reacción se detuvo con 250  $\mu$ L de HCl 1 N. El ácido hipúrico formado por

la acción enzimática se extrajo con 1,5 mL de acetato de etilo, con agitación suave durante 30 minutos. Se tomó 1 mL de fase orgánica y se trasvasaron a nuevos tubos. El solvente se evaporó durante la noche bajo campana a 65 °C. El sólido remanente en los tubos se suspendió en 1 mL de agua bidestilada y se midió la absorbancia a 228 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 650. El blanco se obtuvo incubando el sustrato sintético con la muestra y reemplazando la enzima ECA por su equivalente en volumen de buffer fosfato de sodio 0,1 M NaCl 0,3 M (pH 8,3).

Para determinar la actividad máxima se siguió el mismo procedimiento reemplazando la muestra por 25 µL de buffer fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,3 M (pH 8,3). El respectivo blanco se determinó omitiendo el agregado de enzima y reemplazando por el buffer anterior. Para las determinaciones de EC<sub>50</sub> se variaron las concentraciones de muestra, haciendo diluciones seriadas de muestra preparada como se describió anteriormente.

El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\% \text{ inhibición} = 100 ( 1 - (A_m - A_{0m} / A_{MAX} - A_{0MAX}))$$

A<sub>m</sub> y A<sub>0m</sub> son las absorbancias de los tubos con muestra en presencia y ausencia de ECA, respectivamente.

A<sub>MAX</sub> y A<sub>0MAX</sub> son las absorbancias en ausencia de muestra y en ausencia de muestra y ECA, respectivamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

#### Animales:

Se trabajó con 52 ratas machos espontáneamente hipertensas (SHR), y 10 ratas Wistar normotensas de 3 a 4 meses de edad y 220-270 gramos de peso. Los animales fueron criados y mantenidos en la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, y todos los procedimientos experimentales fueron supervisados y aprobados por el Comité de Ética de la Institución. Las ratas se colocaron en jaulas de acero inoxidable con viruta, la cual se cambió y esterilizó cada día. Los animales permanecieron con una temperatura ambiental estable, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, y libre acceso al consumo de agua y comida. Se les proporcionó agua de canilla en botellas esterilizadas con picos de acero inoxidable. El alimento, en forma de pellet extruido (nutrientes Purina) está compuesto por (en %): 10 humedad; 24,6 proteínas; 7 lípidos; 6,4 cenizas; 4 fibra cruda; 7,7 hemicelulosa; 1,1 calcio; 1,4 fósforo; 1,05 potasio; 0,2 magnesio; 0,25 azufre; 0,11 sodio; 0,25 cloro; 2,25 ácido linoleico; 0,15 ácido linoléico; 1,55 arginina; 0,42 cistina; 1,4 glicina; 0,59 histidina; 0,97 isoleucina; 2,25 leucina; 1,2 lisina; 0,4 metionina; 1,18 fenilalanina; 0,09 serina; 0,9 treonina; 1,2 valina; 12 FDN; 4,5 FDA; 36 CNF; 82 TDN.

#### Experimentos con administración orogástrica del hidrolizado de amaranto y medida indirecta de la presión sistólica:

Las ratas se mantuvieron en una incubadora a 37°C durante 10 minutos, luego fueron transferidas a un inmovilizador de acrílico (10, 11) sobre una almohadilla térmica, luego se colocó en la cola, el manguito de presión y el sensor de pulso (Narco Biosystems, Houston, TX). Para subir la presión en el manguito ocluser utilizamos aire proveniente de un tubo de oxígeno comprimido, y con un juego de válvulas de entrada y salida realizamos el inflado y desinflado del manguito ocluser a un ritmo uniforme y en un tiempo breve. La presión del manguito ocluser fue registrada continuamente con un sensor de presión de estado sólido (Sensym. Honeywell Sensing & Control, Inc.). Las señales del sensor de presión y de pulso fueron amplificadas y luego digitalizadas con una plaqueta analógico-digital (DT-01 EZ, Data Translation, Inc., Marlboro, MA) y archivadas en una computadora. Se obtuvieron los archivos on-line mediante un software adecuado (Labtech Notebook Pro, Laboratory Technology Corp., Wilmington, MA) para su posterior análisis (12). Los animales se familiarizaron rápidamente con el procedimiento y se mantuvieron en calma dentro del inmovilizador, sin necesidad de usar la puerta de acrílico. En raros casos que se presentaron señales de molestia, el procedimiento fue interrumpido. Después de tres medidas control se administraron los hidrolizados de amaranto con un abreboca metálico y una pequeña sonda orogástrica, y la presión sistólica indirecta se midió cada una hora y durante 7 horas.

#### Experimentos con administración intragástrica de los hidrolizados y medida directa de la presión arterial:

Para mediciones directas de la presión arterial, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg / kg IP) y colocadas en una almohadilla de calefacción. La arteria carótida izquierda fue expuesta y canulada con un catéter hecho con un trozo de tubo de Microbore Tygon (Cole-Parmer Scientific Co., Chicago), con una unión de Teflón al final (OD 0,7 mm, Small Parts, Inc., Miami Lakes, FL), usando la técnica descrita por Chen et al (13).

Para la administración del hidrolizado se realizó una pequeña gastrostomía a través de una incisión abdominal y un catéter de sylastic de 1,5 mm de diámetro que a través de un pequeño orificio peritoneal se introdujo en el estómago sujetándolo a la pared mediante una sutura en bolsa de tabaco (14).

Tanto el catéter arterial como gástrico fueron tunelizados por el tejido subcutáneo y exteriorizados a través de una incisión en la nuca. Un conjunto de chaleco con resortes flexibles (Alice King Chatham Medical Arts, Hawthorne, CA) permitió anclar los catéteres encima de la jaula, facilitando la movilidad del animal y el registro continuo de la presión arterial en estado consciente (15). Todos los estudios se iniciaron 24 horas después de la intervención quirúrgica, con los animales recuperados totalmente. La presión arterial se

midió conectando el catéter carotídeo con un transductor de presión (P23Gb, Gould Inc., Cleveland, OH) (12), y los hidrolizados de amaranto se administraron a través de la sonda intragástrica sin causar molestias a los animales. Debido a la amortiguación de la señal de presión causada por los catéteres, solo se informa la presión arterial media (PAM), y se midió durante más de 7 horas en la mayoría de los animales.

#### Experimentos con músculo papilar aislado:

Se extrajo el corazón de ratas anestesiadas con pentobarbital sódico y se colocó en una cápsula de Petri llena de solución salina fisiológica (SSF) compuesta por (en mM): NaCl 130; KCl 4,7, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,17; MgSO<sub>4</sub> 1,16; HCO<sub>3</sub>Na 24,0; CaCl<sub>2</sub> 1,6 y glucosa 11,0 y burbujeada con una mezcla de 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de O<sub>2</sub>. Se fijó el corazón con agujas, se extirparon las aurículas y se abrió longitudinalmente el ventrículo izquierdo a partir del orificio aurículo ventricular. Se identificó un músculo papilar apropiado y el extremo de las cuerdas tendinosas se fijo con una ligadura de seda 6-0 construyendo una especie de asa de hilo por dónde enganchar el preparado. El extremo opuesto del músculo, por dónde se inserta en la pared ventricular, se separó de la misma y se lo atravesó con un micro alfiler de 0,20 mm de diámetro. El músculo se trasladó luego a una cámara de 5 ml tallada en un bloque de acrílico en la cual se montó un microsensor de fuerza SENSOR ONE AE 801 (SENSOR ONE INC, Sausalito, California). La cámara se encontraba termostatzada, y a través de ella circulaba continuamente SSF a 37°C (aproximadamente 1ml/min) y burbujeada con carbógeno; el excedente de líquido se aspiraba continuamente con una bomba de vacío. El microsensor de fuerza estaba montado sobre un micrómetro que permitía estirar el músculo con precisión de 0,001 pulgadas, y la señal de fuerza se amplificaba y adquiría con una plaqueta DT 9801. Los preparados se estiraban hasta una tensión de reposo de entre 0,5 y 0,75 gramos y se los estimulaba con una frecuencia de 0,5 hertz (16). Luego de media hora de estabilización en SSF el preparado era expuesto a una solución con hidrolizado de amaranto 1mg/ml durante una hora. Luego se compararon los valores de fuerza y la derivada al final del periodo de estabilización con respecto al final de la perfusión con hidrolizado de amaranto.

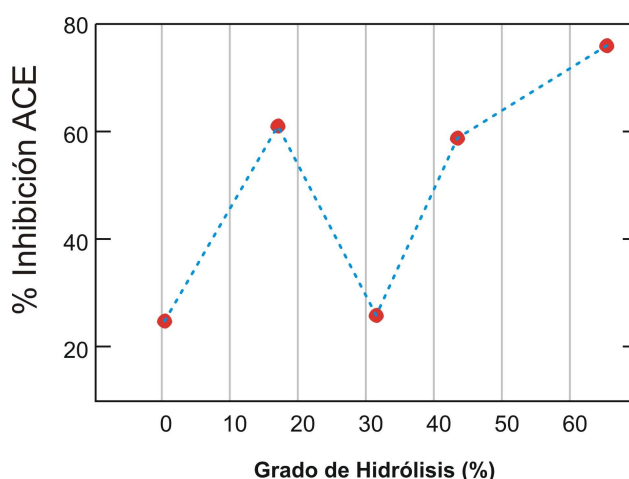
#### Experimentos con anillos de aorta aislada:

Después que se obtuvo el corazón de rata descrito en el párrafo anterior, la aorta torácica fue separada y colocada en solución salina fisiológica (SSF). Se eliminó el tejido conectivo adyacente y se cortaron anillos de aorta de 2 mm de largo. Se tuvo especial cuidado en no dañar el endotelio durante este procedimiento. Los anillos fueron suspendidos entre dos alambres de acero inoxidable en cámaras con baño termostatzado y llenas de solución salina fisiológica burbujeadas con carbógeno (5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub>), obteniendo un pH de

7,40. La parte inferior del alambre se fijó a una varilla vertical de plástico sumergido en la cámara, mientras que la parte superior se vinculó rígidamente a un transductor de fuerza (Grass FT.03D, Grass Telefactor, West Warwick, CT, EE.UU.). Los preparados fueron estirados con una tensión de reposo de 2 gramos y el músculo liso se estabilizó durante 1 hora, cambiando la solución cada 20 minutos (17). Al final de este periodo los anillos fueron expuestos a concentraciones crecientes de norepinefrina ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M) y se registró la respuesta contráctil en cada caso. En los preparados control se realizó un lavado para recuperar la línea de base y se realizó una segunda curva respuesta-concentración en solución salina fisiológica. En los preparados experimentales (obtenidos de la misma rata) primero se realizó un lavado para recuperar la línea de base y se realizó una segunda curva respuesta-concentración después de la incubación con una solución de 1mg/ml de hidrolizado de amaranto. Se compararon las respuestas en ambas situaciones.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los ensayos in vitro mostraron que los aislados proteicos de amaranto tienen una capacidad moderada de inhibición de ECA, capacidad que se incrementa considerablemente luego de la hidrólisis con alcalasa. A 45 y 65% de grado de hidrólisis se obtiene una capacidad inhibitoria superior a cualquier hidrolizado de proteínas vegetales que haya podido ser relevado en la bibliografía (Figura 1). La hidrólisis enzimática del aislado proteico produce un aumento en la actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina. Esto se debe a un incremento en la abundancia de péptidos inhibidores.



**Figura 1:** Actividad inhibitoria de hidrolizados con Alcalasa de distinto grado de hidrólisis.

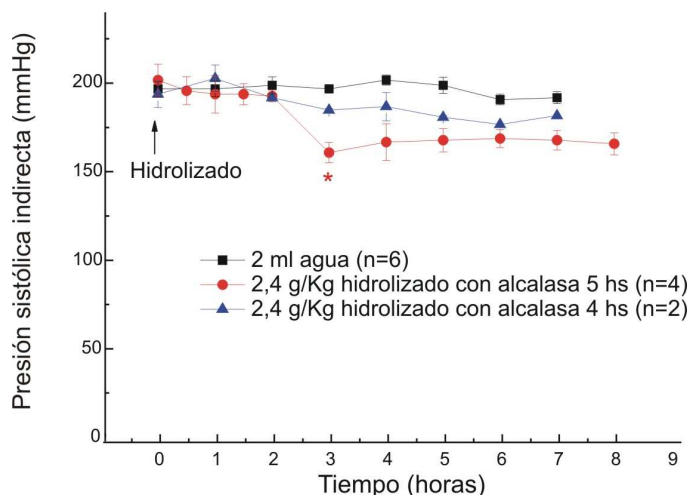
Los valores obtenidos de Concentración Efectiva 50 (EC50) para los hidrolizados de 45 y 65% son comparables a los de hidrolizados de proteínas lácteas (consideradas las

naturalmente más propensas a poseer péptidos inhibidores de ECA encriptados) y mejores que los de hidrolizados de otras proteínas vegetales (Tabla 1).

Origen	EC50 (mg/mL)
A. Mantegazzianus. Alcalasa (GH 45%)	0,12 ± 0,2
A. Mantegazzianus. Alcalasa (GH 65%)	0,12 ± 0,2
Suero Leche Cabra. Termolisina 24 Hs.	0,081
Soja. Alcalasa 12 Hs.	0,32

**Tabla 1:** EC50 en mg/ml para Amaranto Mantegazzianus hidrolizado con Alcalasa, con un GH de 45% y 65%, para Suero de Leche de Cabra hidrolizado con Termolisina durante 24 hs., y para Soja, hidrolizada con Alcalasa durante 12 hs.

En las ratas SHR con medida indirecta de la presión arterial ya sea la administración de 1) agua o 2) hidrolizado con alcalasa 4 horas (2,4 g/Kg de rata) no produjeron ningún efecto significativo sobre la presión arterial (Figura 2). Solo la administración de hidrolizado con alcalasa 5 hs (2,4 g/Kg de rata) produjo una disminución significativa de la presión arterial que se detectó después de las 3 hs (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ) de administrar el hidrolizado y que persistió durante 7 horas. En las ratas normotensas WKY ninguno de los hidrolizados mencionados mostró un efecto significativo sobre la presión arterial (datos no ilustrados).

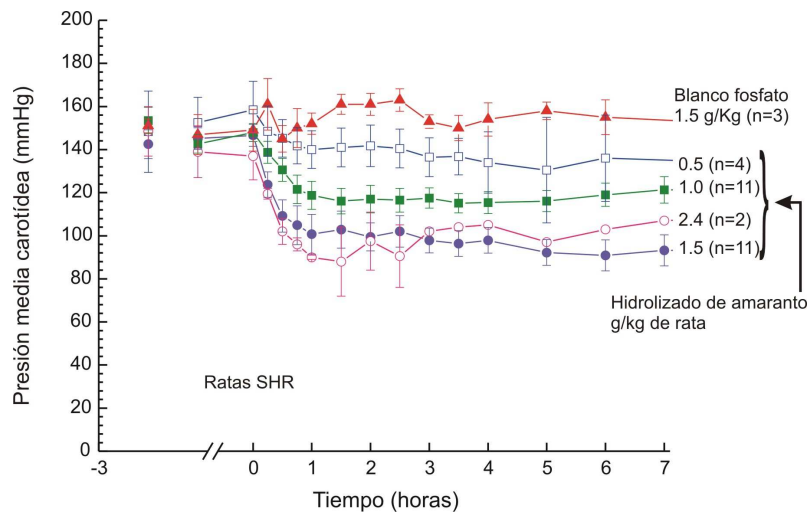


**Figura 2:** Presión sistólica indirecta medida a lo largo de 7 horas en 6 ratas SHR a las cuales se les administró 2 ml de agua por intubación orogástrica y se repitió la administración 2 días. Presión sistólica indirecta en 2 y en 4 ratas SHR a las que se les administró por intubación orogástrica hidrolizado de amaranto con alcalasa 4 hs y 5 hs respectivamente en una dosis de 2,4 g/kg de rata disueltos en 2 ml de agua. \* =  $p < 0,05$ .

En las ratas SHR con medida directa de la presión arterial y administración intragástrica de los hidrolizados de amaranto, se obtuvo una moderada pero no significativa disminución de la presión arterial con una dosis de 0,5 g/Kg de rata. La presión arterial descendió de

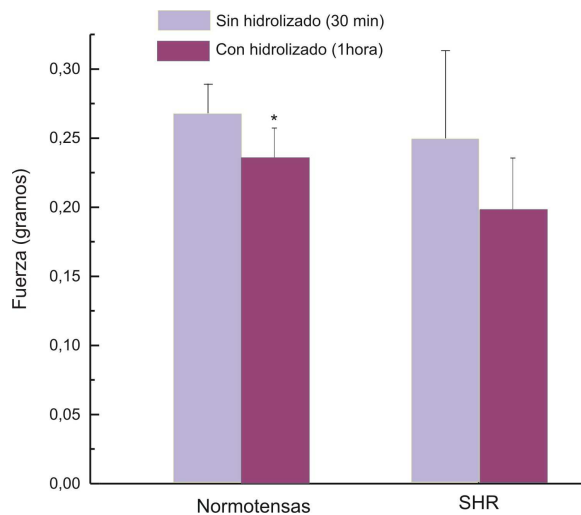


manera dependiente al aumento de la concentración de hidrolizado (1,0; 1,5 y 2,4 g/Kg de rata) alcanzando significación con las concentraciones de 1 y 1,5 g/Kg de rata a partir de los 45 minutos (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ), en la concentración de 1 g/Kg al final del experimento empezó a ascender la presión arterial y en la séptima hora los valores de caída ya no fueron significativos (Figura 3). En varios animales, el catéter se dejó hasta 5 días después de la administración de hidrolizado de amaranto, y pudimos comprobar que la presión arterial volvió a los valores control.



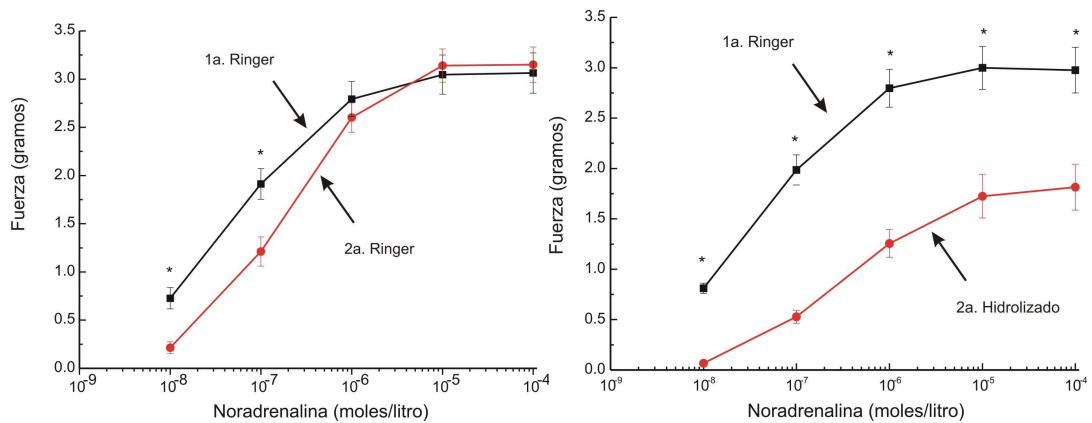
**Figura 3:** Presión media carotídea en ratas SHR a lo largo de 7 horas luego de administrar por vía intragástrica una solución de blanco fosfato 1,5 g/Kg de rata e hidrolizado de amaranto en las concentraciones indicadas a la derecha de cada curva. En todos los casos el blanco y los hidrolizados se disolvieron en 2 ml de agua.

La Figura 4 muestra el efecto de 1mg/ml de hidrolizado de amaranto sobre los músculos papilares aislados. Se ve que los hidrolizados de amaranto deprimieron la fuerza contráctil alcanzando significación estadística solo en ratas normotensas (test de t por apareados,  $p < 0,05$ ). La  $(\Delta F/\Delta t)$  no produjo cambios significativos al exponer los músculos papilares al hidrolizado de amaranto (datos no mostrados).



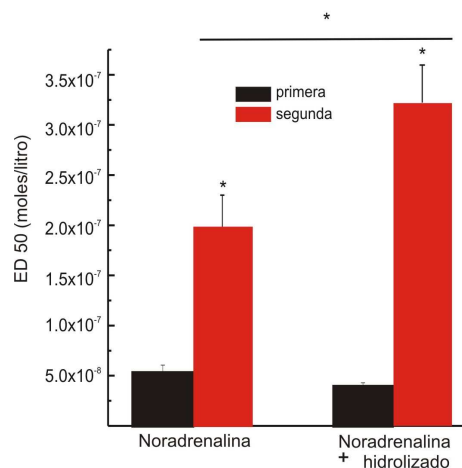
**Figura 4:** Fuerza desarrollada por músculos papilares de ratas normotensas (n=10) y SHR (n=9) estimulados eléctricamente a una frecuencia de 0,5 Hz. Las barras color lila representan la fuerza promedio al final del periodo de estabilización de 30 minutos en solución de Ringer, las barras de color violeta representan la fuerza promedio al final del periodo de incubación de 1 hora con hidrolizado de amaranto (1mg/ml). \* = p < 0,05.

La Figura 5 muestra el efecto de la misma concentración de hidrolizado de amaranto utilizada en músculos papilares (1mg/ml) ensayada en anillos de aorta aislados. En el panel izquierdo se puede observar que la repetición de la curva de concentración-contracción causa disminución de la fuerza en  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M. En cambio en el panel de la derecha puede observarse que en presencia del hidrolizado la fuerza resultó significativamente deprimida a todas las concentraciones de noradrenalina utilizadas (test de t por apareadas, p < 0,05)



**Figura 5:** Fuerza desarrollada por anillos aislados de aorta (n=10) en 2 exposiciones sucesivas a noradrenalina desde  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M. En el panel izquierdo ambas exposiciones fueron realizadas en solución de Ringer, observándose que a las concentraciones de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  la diferencia entre ambas curvas fue significativa (test de t por apareadas, p < 0,05). En el panel derecho la segunda curva se realizó luego de incubar media hora con hidrolizado de amaranto (1mg/ml). \* = p < 0,05.

La Figura 6 muestra en el panel izquierdo que la ED<sub>50</sub> aumentó significativamente por la mera repetición de la curva concentración-contracción. Sin embargo en el panel de la derecha se ve que la presencia del hidrolizado produjo un aumento aún mayor, que fue significativo con respecto al primero (test de t por apareadas, p < 0,05).



**Figura 6:** Dosis efectiva 50 para la noradrenalina calculada a partir de los datos de la figura 5. Puede observarse que la realización de 2 curvas consecutivas en Ringer (barras de la izquierda) aumenta significativamente la ED 50. \* =  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La administración intragástrica de hidrolizados de amaranto fue eficaz en reducir la presión arterial en experimentos agudos, alcanzando su máximo efecto a los 90 minutos aproximadamente. Existe una discrepancia entre los efectos obtenidos con la administración orogástrica e intragástrica de los hidrolizados de amaranto, ya que 2,4 g/Kg fue la única dosis que produjo disminución de la presión arterial por el primer procedimiento, esta dosis fue el doble de efectiva cuando se la administro por el segundo método. Con toda probabilidad, esto se debió a los diferentes procedimientos: la administración a través de una gastrostomía no produce molestias en la rata, mientras que la administración por sonda orogástrica provoca un considerable grado de estrés. Además la medida de presión arterial indirecta implica primero un calentamiento y a continuación la inmovilización del animal y estos dos procedimientos producen cierto grado de excitación. Por el contrario, la medición directa de la presión arterial se realiza sin que el animal se de cuenta.

Dado que la presión arterial es el producto del volumen minuto y la resistencia periférica, su caída podría deberse a la acción del hidrolizado en cualquiera de las dos variables. A fin de evaluar un efecto depresor de los hidrolizados sobre el miocardio, se realizaron experimentos en músculo papilar aislado de corazones de la misma especie de ratas. En estos experimentos no detectamos ningún efecto inotrópico negativo y, por lo tanto se puede suponer que “in vivo” las condiciones del corazón no se verían afectadas y que la resistencia periférica sería la causa de la caída de presión sanguínea.

Esta afirmación se demostró realizando experimentos en músculo liso de aorta aislada, en la que la disminución de la contractilidad del músculo liso es mucho mayor que el efecto en el miocardio. Aún considerando el hecho de que la aorta no es un buen vaso de resistencia, con toda probabilidad el efecto sobre las arteriolas es similar y, por lo tanto el efecto hipotensor puede atribuirse a una disminución de la resistencia periférica.

Teniendo en cuenta los resultados “in vitro” mencionados que demuestran la actividad inhibidora del hidrolizado de amaranto sobre la enzima convertidora de angiotensina, es razonable suponer que ese efecto podría haber estado presente en los experimentos “in vivo” y podría ser el responsable del efecto hipotensor.

La comparación de los resultados en músculo papilar y aorta aislados demuestran que el efecto predominante fue sobre el músculo liso vascular, y que debió ejercerse seguramente sobre sistemas renina-angiotensina locales que han sido demostrados en músculo liso, ya que en este caso no estaría operante el sistema renina-angiotensina humoral.

En síntesis, puede concluirse que la administración intragástrica directa de hidrolizados de amaranto tiene un efecto hipotensor en la rata consciente que se debe a sus efectos inhibidores sobre la enzima convertidora de angiotensina, los cuales pueden llevarse a cabo sobre el sistema renina-angiotensina circulante y también local como lo demuestran los experimentos in vitro. El efecto predominante sería sobre la resistencia periférica y no sobre el músculo cardíaco.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Guzman-Maldonado S, Paredes López O. Functional products of plants indigenous to Latin American: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. En: *Functional foods. Biochemical and processing aspects*. Ed. G. Mazza, cap.9, 293-327 (1998).
- 2) Meisel, H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, 21: 55-61 (2004).
- 3) Martínez, N. E. y Añón M. C. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2523-2530 (1996).
- 4) Adler-Nissen, J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 1256-1262 (1979).
- 5) AOAC. Association of Official Analytical Chemists Inc. Official Methods of Analysis, ed. 14; Ed. Williams, S.; Arlington, VA. Método 2057, pp 16 (1984).
- 6) Becker, R.; Wheeler, E.; Lorenz, K.; Stafford, A.; Grosjean, O.; Betschart, A.; Saunders, R. A Compositional Study of Amaranth Grain. *J. Food Sci.*, 46: 1175-1180 (1981).
- 7) Segura-Nieto, M.; Barba de la Rosa, A. P.; Paredes-López, O. Biochemistry of Amaranth Proteins. En: *Amaranth. Biology, Chemistry and Technology*. Ed. Paredes-López, O. Boca Ratón: CRC pp. 75-106 (1994).
- 8) Lowry, O. H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275 (1951)
- 9) Kim, Y.; Yoon, S.; Yu, D.; Lönnerdal, B.; Cheung, B. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\kappa$ s1-casein expressed in *Escherichia coli*. *J. of Dairy Research*, 66: 431-439 (1999).
- 10) Fritz M, Rinaldi G. Influence of nitric oxide-mediated vasodilation on the blood pressure measured with the tail-cuff method in the rat. *Journal of Biomedical Science*, 14:757-765 (2007).
- 11) Fritz M, Rinaldi G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58:215-221 (2008).
- 12) Cobbold R. S. C.. *Transducers for biomedical measurements: Principles and applications*. John Wiley & Sons. New York. 1974. pp: 190-243.

- 13) Chen Y.F., Chandler M.P., Dicarlo S.E. Acute exercise attenuates cardiac autonomic regulation in hypertensive rats. *Hypertension*, 26:676-683 (1995).
- 14) Acland R. D.. *Practice Manual for Microvascular Surgery*. The C. V. Mosby Company. St. Louis. Washington, D. C. Toronto (1989).
- 15) Rinaldi G, Cingolani H. Relationship between baseline blood pressure and blood pressure decrease after calcium channel blockers in conscious rats. *Can J. Cardiol*, 10 (7): 743-747 (1994)
- 16) Alvarez B. V., Pérez N. G., Ennis I. L, Camilión de Hurtado M. C., Cingolani H. E. Mechanisms underlying the increase in force and calcium transient that follows stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res*, 85: 716-722 (1999).
- 17) Rinaldi G. J. Blood pressure fall and increased relaxation of aortic smooth muscle in diabetic rats. *Diabetes Metab*, 31: 487-495 (2005).