



**Universidad Nacional De La Plata. Facultad De Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas**

**CIDCA (CONICET-UNLP-Facultad de Ciencias Exactas)  
CIC (CONICET-UNLP-Facultad de Ciencias Médicas)**

**Trabajo de Tesis Doctoral**

**“DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS  
PARA LA MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN LA RATA.  
SU USO PARA EL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS  
HIDROLIZADOS DE AMARANTO SOBRE EL SISTEMA  
VASCULAR”.**

**Mariana Fritz**

**Director:** Dr. Gustavo Rinaldi

**Codirector:** Dr. Alejandro Rebolledo

**-2009-**

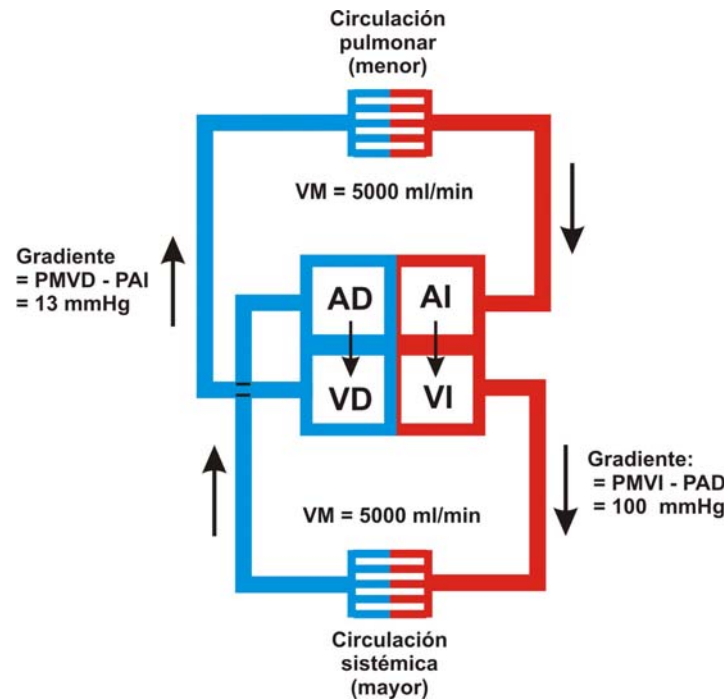


## **Bases fisiológicas de la presión arterial**

### **Descripción general del aparato circulatorio**

El aparato circulatorio tiene por función conducir la sangre hacia y desde los tejidos, renovando y manteniendo constante la composición del medio líquido que rodea a las células, a la cual el fisiólogo francés Claudio Bernard denominó “medio interno” (Sanchez Gisande, 1945).

La circulación está formada por dos circuitos conectados en serie (Harvey, 1628) y denominados circulación menor o pulmonar y circulación mayor o periférica (Figura 1). La circulación menor comienza en el ventrículo derecho y continúa por la arteria pulmonar que por sucesivas subdivisiones da origen a los capilares pulmonares, los cuales luego confluyen en las venas pulmonares que drenan en la aurícula izquierda. Esta parte del circuito tiene por función más importante intercambiar con el aire alveolar los gases respiratorios principales, oxígeno y dióxido de carbono. La circulación mayor comienza en el ventrículo izquierdo y continúa por la aorta, de la cual van a originarse todas las arterias periféricas. Estas dan origen a los lechos capilares de todos los órganos, los cuales confluyen luego hacia las diversas venas sistémicas que dan origen a las venas cavas superior e inferior que drenan en la aurícula derecha. Esta parte de la circulación es la que, como se mencionó al principio, mantiene constante la composición del medio interno. Como ambos circuitos están conectados en serie el caudal que circula por ellos en la unidad de tiempo es el mismo, unos 5000 ml/minuto en un organismo de 70 kg, y se denomina volumen minuto (VM) (Levy y Pappano, 2007). Ese volumen minuto impulsado por el corazón a través de la resistencia de los dos circuitos descritos produce una presión intravascular (arterial o venosa) que es igual a la fuerza ejercida por la sangre por unidad de superficie del vaso. La presión arterial oscila continuamente entre un valor máximo o sistólico y uno mínimo o diastólico. En la Figura 1 se utilizó un valor estable representativo de esa onda de presión que se denomina presión arterial media y cuyo cálculo se explicará posteriormente.



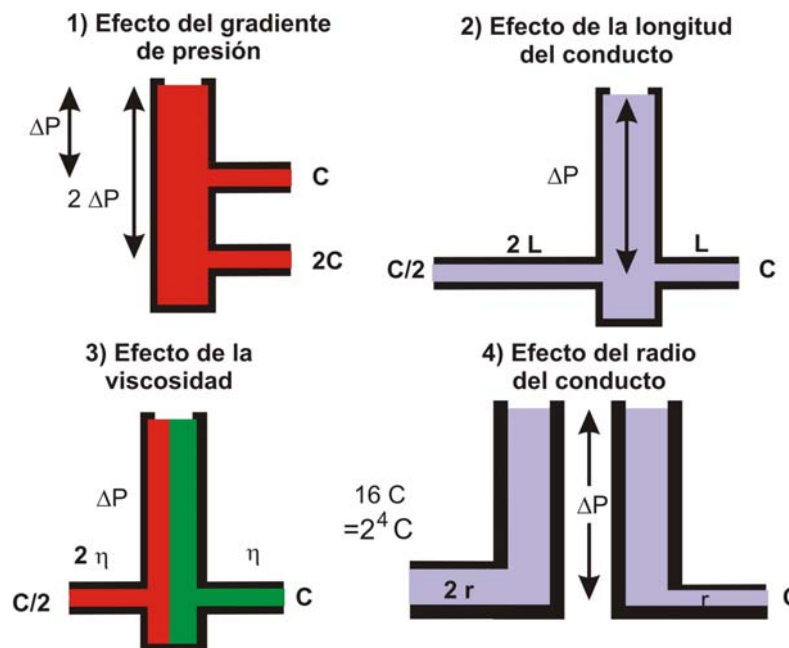
**Figura 1:** Esquema de la circulación mostrando el corazón con sus 4 cámaras, el circuito menor que va desde ventrículo derecho (VD) hasta aurícula izquierda (AI), y el circuito mayor que va desde ventrículo izquierdo (VI) hasta aurícula derecha (AD). Puede observarse que a pesar de que el gradiente de presión media (PM) en la circulación mayor es de 100 mmHg y en la circulación menor de solamente 13 mmHg el caudal o volúmen minuto (VM) es el mismo en ambos circuitos, ya que están colocados en serie. Esto nos indica que la resistencia de la circulación pulmonar es mucho menor que la de la circulación mayor o sistémica.

La sangre que cada ventrículo expulsa durante la sístole no pasa de inmediato a los tejidos sino que se almacena en las grandes arterias elásticas, las cuales la continúan impulsando hacia la periferia durante la diástole ventricular (Rushmer, 1970). Esta función amortiguadora de las arterias elásticas provee un caudal constante hacia la periferia, que normalmente se cumple de manera laminar, es decir sin turbulencias. La velocidad de la sangre es máxima en la aorta y sus ramas principales, llegando a aproximadamente 50 cm/segundo y va decayendo hacia las arterias periféricas, haciéndose mínima (aproximadamente 1mm/segundo) a nivel de los capilares. Si en algún punto de la circulación arterial existiesen estrechamientos o irregularidades en las cuales aumentara mucho la velocidad de la sangre podría superarse un valor crítico que, como demostró Reynolds, generarían formación de remolinos y turbulencias que transferirían energía cinética a la pared vascular y generan vibraciones audibles (Burton, 1972).

### Principios Físicos de la circulación

A continuación vamos a desarrollar las principales variables que influyen en la

producción de un caudal sanguíneo ( $C$ ) determinado. El primero que estudió en forma sistemática estas variables fue el médico francés Jean Louis Marie Poiseuille (1797-1869), que en horarios posteriores a su práctica médica en un consultorio de París estudió el caudal a través de tubos de pequeño calibre y pared rígida. De sus experimentos dedujo que las variables principales son cuatro, y las enunció en forma de una ley que lleva su nombre (Burton, 1972; Frumento, 1979; Gow, 1979; Houssay, 1970). Las mismas se describen a continuación y se ilustran en la Figura 2.



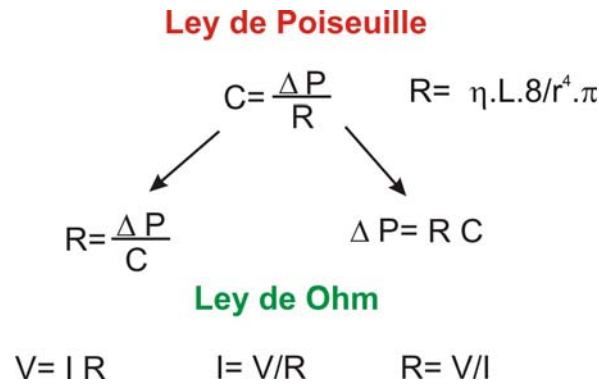
**Figura 2:** En esta figura se ilustran las 4 variables que inciden en la determinación del caudal ( $C$ ) a través de un sistema de tubos rígidos. El gradiente de presión ( $\Delta P$ ) aumenta el caudal en forma directamente proporcional (1); mientras que la longitud ( $L$ ) del conducto (2) y la viscosidad ( $\eta$ ) del líquido (3) afectan el caudal en forma inversamente proporcional. La variable más importante es sin duda el radio ( $r$ ) del conducto (4), ya que un cambio del mismo afecta el caudal en proporción a la cuarta potencia del cambio producido. En nuestro ejemplo un aumento al doble del radio incrementa 16 veces el caudal.

- 1) Gradiente de presión ( $\Delta P$ ): en un órgano es la presión arterial menos la presión venosa mientras que en un vaso o conducto individual es la diferencia entre dos puntos particulares del mismo. Es intuitivamente evidente que si no hubiese gradiente de presión no habría caudal, así como que a medida que el gradiente aumenta el caudal también lo va a hacer. Poiseuille demostró que la proporcionalidad es directa y si se multiplica el gradiente por un valor el caudal aumentará exactamente en la misma proporción.
- 2) Longitud del conducto ( $L$ ): los líquidos reales presentan rozamiento entre sus moléculas y la pared del tubo que los conduce. Por esa causa la capa de líquido

que circula en íntimo contacto con la pared es la que se desplaza más lentamente, mientras que la capa ubicada en el eje del tubo o conducto es la que se desplaza a mayor velocidad. Es evidente que este efecto enlentecedor del roce será más pronunciado a medida que aumente la longitud del conducto. Poiseuille demostró que la proporcionalidad es en este caso inversa, y si se multiplica la longitud del conducto por un valor el caudal resulta dividido por el mismo valor.

- 3) Viscosidad del líquido ( $\eta$ ): el fenómeno de rozamiento descrito en el párrafo anterior depende obviamente de la naturaleza del líquido. A igualdad de condiciones, un líquido de baja viscosidad como el agua o el alcohol evidentemente se va a desplazar con mayor facilidad que uno más denso, como por ejemplo el aceite (Frumento, 1979). A esta propiedad de los líquidos se la denomina viscosidad y se la mide en unidades denominadas Poise en homenaje a Poiseuille, quien demostró en sus experimentos que la viscosidad está relacionada inversamente con el caudal, y si se multiplica la misma por un cierto valor el caudal resulta dividido por igual valor.
- 4) Radio del tubo ( $r$ ): también en forma intuitiva podemos imaginar que a medida que aumenta el radio de un conducto, y por lo tanto su superficie de sección, va a fluir una mayor cantidad de líquido. Poiseuille demostró que ésta era la más importante de las variables analizadas, ya que si se multiplica el radio por cierto valor el caudal resulta multiplicado por el mismo valor pero elevado a la cuarta potencia. Como se ve en la Figura 2 al multiplicar el radio por 2 el caudal resulta multiplicado 16 veces.

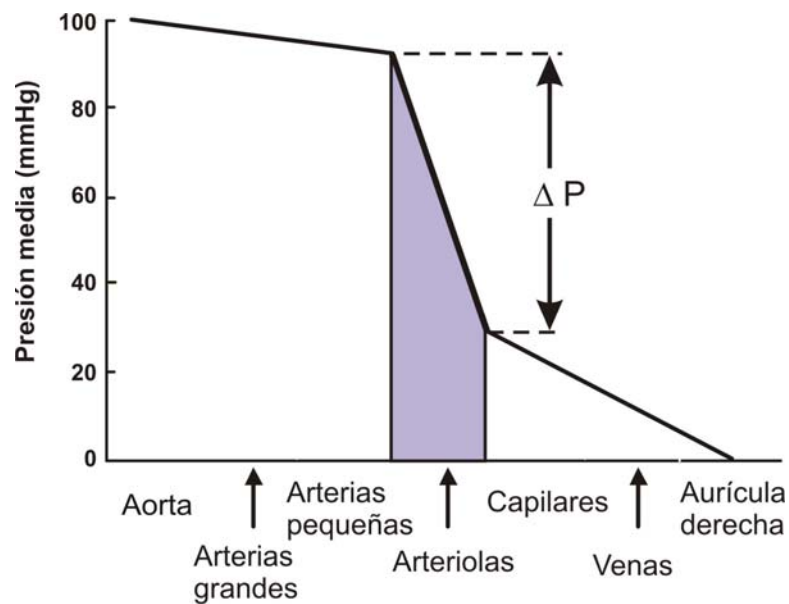
Los hallazgos de Poiseuille pueden resumirse en la fórmula que aparece en la parte superior de la Figura 3, donde las tres últimas variables que acabamos de analizar, con el agregado de un coeficiente de proporcionalidad equivalente a  $8/\pi$  determinan un valor conocido como resistencia ( $R$ ). Esta forma de expresión de la ley de Poiseuille la hace prácticamente igual a la ley de Ohm para circuitos eléctricos que se muestra en la parte inferior de la Figura 3. Esta forma de expresión es útil porque se generaliza el concepto de resistencia y no se necesita conocer la longitud, radio o viscosidad; simplemente basta con calcular la resistencia conociendo el gradiente de presión y midiendo el caudal. En el aparato circulatorio si el gradiente de presión se mide en mmHg y el caudal en  $\text{cm}^3/\text{segundos}$  la resistencia queda expresada en “unidades de resistencia periférica” (Frumento, 1979).



**Figura 3:** En esta figura se muestra la analogía entre la ley de Poiseuille que determina el caudal (C) a través de tubos rígidos y la ley de Ohm que determina la intensidad de corriente (I) a través de un conductor. En los tubos rígidos el caudal es directamente proporcional al gradiente de presión ( $\Delta P$ ) e inversamente proporcional a la resistencia (R), la cual a su vez depende de la viscosidad ( $\eta$ ) del fluido, la longitud (L) del tubo, y el radio del mismo (r) elevado a la cuarta potencia, lo que lo convierte en el factor más importante. De la fórmula de caudal se pueden derivar las de resistencia y gradiente de presión. De la misma forma la ley de Ohm define a la intensidad como el cociente entre diferencia de potencial (V) y resistencia (R), y de esa fórmula se pueden derivar las de resistencia y diferencia de potencial.

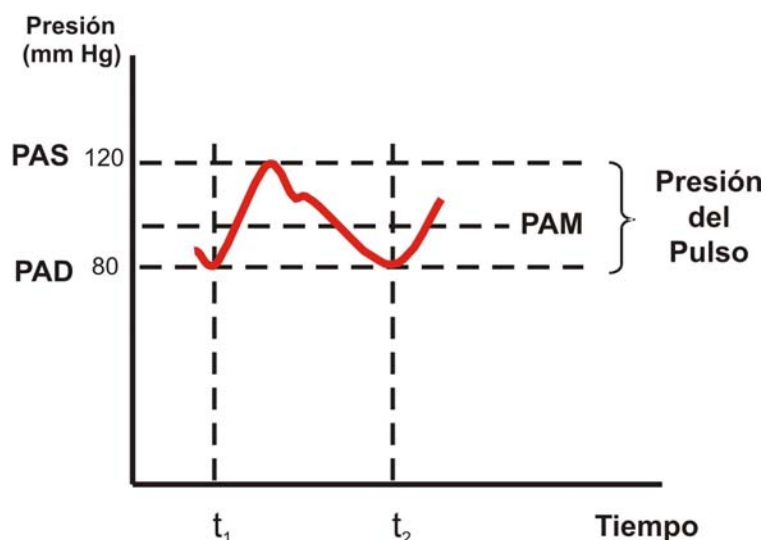
Trasladando los conceptos de la ley de Poiseuille al aparato circulatorio vemos que la longitud del conducto (circuito arterial y venoso), viscosidad de la sangre y presión arterial se mantienen usualmente constantes, y por lo tanto el mecanismo más importante para regular el caudal en el corto plazo es el control del radio vascular. Este control del radio se logra regulando la contractilidad del músculo liso vascular de la capa media de los vasos que se encuentra bajo la influencia tónica del sistema nervioso simpático.

Suponiendo un caudal constante, las variaciones de presión arterial estarán vinculadas a cambios de la resistencia. Como se ve en la Figura 4, en el sistema circulatorio las arteriolas son las principales determinantes de la resistencia vascular periférica (Levy y Pappano, 2007). Son muy pocas las oportunidades en las cuales la presión arterial aumenta por incremento del volumen; habitualmente el ascenso tensional se debe a aumento de la resistencia. De allí que en las consideraciones fisiopatológicas acerca de la regulación de la presión arterial es excluyente de otros factores el comportamiento de la resistencia vascular periférica y, como ésta es influenciada por factores nerviosos y humorales (De la Riva, 2000).



**Figura 4:** Evolución de la presión media desde la salida del ventrículo izquierdo hasta la aurícula derecha. Puede observarse que la presión media cae muy poco hasta el comienzo de las arteriolas, y es en este tipo de vasos dónde se produce la mayor caída hasta llegar a aproximadamente 30 mmHg a la entrada de los capilares. Por lo tanto, son las arteriolas las principales responsables de la resistencia periférica, y su calibre está regulado principalmente por el sistema nervioso simpático, además de factores locales y humorales (ejemplo: Ag II).

La contracción periódica de los ventrículos produce una presión que, del lado arterial, oscila entre un valor máximo (sistólico) y mínimo (diastólico), siendo la diferencia entre ambos valores la presión del pulso o diferencial (Figura 5). Como se mencionó previamente, los gradientes de presión se calculan mediante un valor estable representativo, denominado presión arterial media, que en el adulto normal es  $\sim 95$  mmHg. No debe considerarse a la presión arterial media como el promedio entre presión arterial sistólica y presión arterial diastólica; es la integración de la onda pulsátil de la presión arterial y representa la interacción del volumen minuto medio y la resistencia vascular periférica en el ciclo cardíaco. Clínicamente se la estima como la presión diastólica más un tercio de la presión de pulso (siendo esta última la diferencia entre presión sistólica y diastólica), aunque en altas frecuencias cardíacas se aproxima más al promedio aritmético de las presiones sistólica y diastólica. La presión arterial media está determinada por el producto del volumen minuto cardíaco y la resistencia vascular periférica (Levy y Pappano, 2007).



**Figura 5:** Esquema de una onda de presión aórtica mostrando los principales parámetros que pueden medirse en la misma. La presión sistólica (PAS) es el máximo valor alcanzado durante la sístole, la presión diastólica (PAD) es el mínimo valor alcanzado durante la diástole, y la presión del pulso es la diferencia entre ambas. La presión media (PAM), en razón de la diferente duración de la sístole y la diástole, no es igual a la media aritmética de PAS y PAD, sino ligeramente inferior a este valor. Clínicamente se la calcula como  $PAD + 1/3 (PAS - PAD)$ .

Es necesario recordar que cuando en un mismo vaso aparecen estrecheces sucesivas se generaran sendas resistencias, resultando la resistencia total de ese vaso la suma total de ellas. Pero la resistencia total de una red de vasos ubicados en forma paralela es menor que la resistencia de aquel vaso que aisladamente presente la menor resistencia. Si la red consta de muchas arterias, al cambiar la resistencia de un número reducido de las mismas no se observarán modificaciones mayores de la resistencia total (Rushmer, 1970). También hay que saber que cambios en la resistencia de grandes arterias tienen pocos efectos sobre la resistencia total mientras que ésta es importantemente afectada por cambios en la resistencia arteriolar (Figura 4).

La resistencia vascular periférica se incrementa cuando hay vasoconstricción generalizada, mientras que disminuye cuando se produce vasodilatación; o sea que la misma se vincula primariamente a cambios en el diámetro de la luz vascular, aunque cambios en la viscosidad sanguínea pueden a su vez alterar la resistencia. La resistencia vascular periférica normal es 900 a 1400 dinas x segundos x  $cm^{-5}$  (Guyton y Hall, 2000).

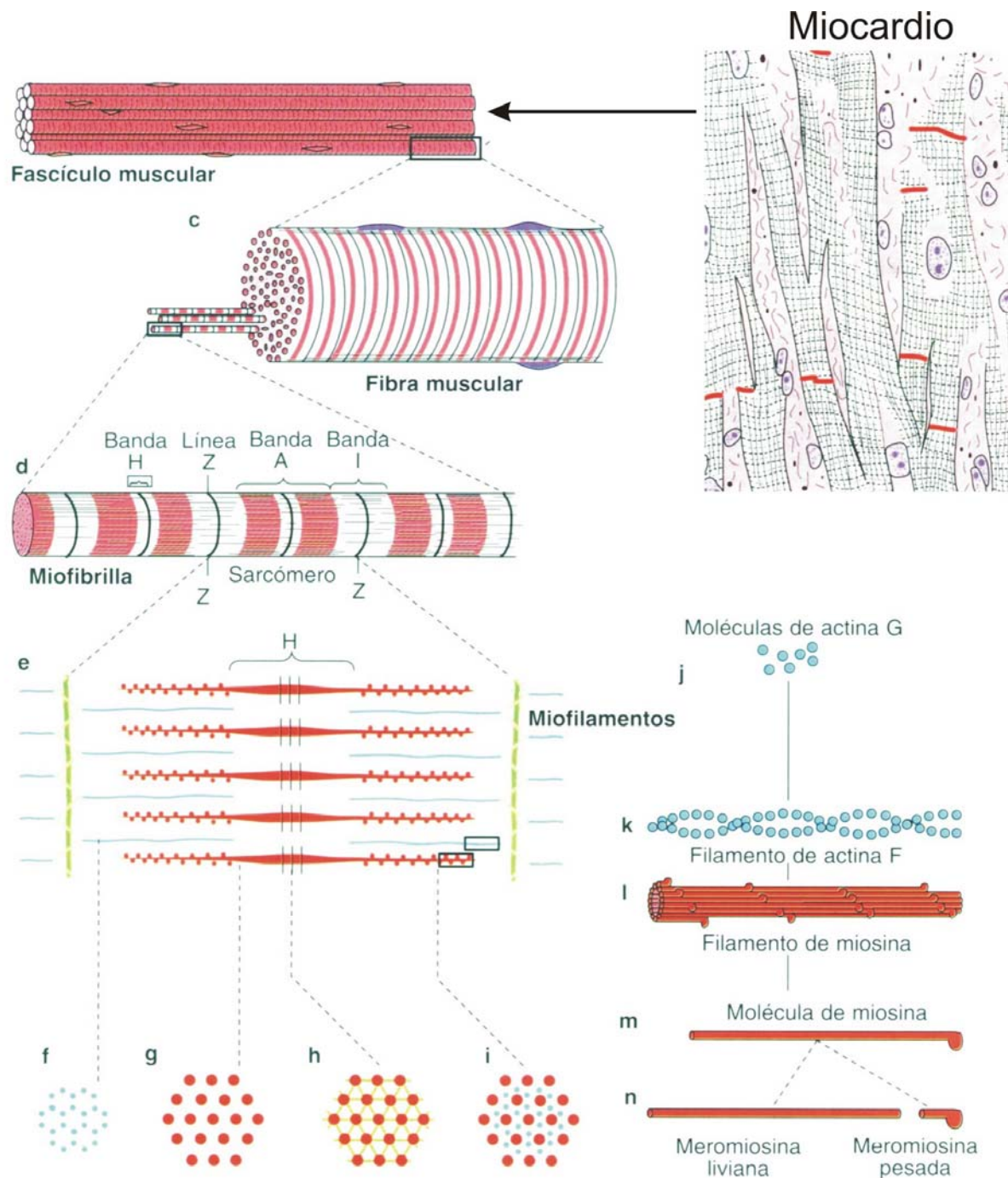
Hay que tener en cuenta, además, que los vasos sanguíneos están tapizados interiormente por endotelio, el cual como se verá más adelante es productor de metabolitos vasodilatadores y vasoconstrictores. Muchos de ellos son liberados como consecuencia del “shear-stress” o deformación, producida en la célula endotelial por el



aumento de flujo sanguíneo. De esta forma, por ejemplo, un aumento del caudal en un territorio vascular podría llevar a la liberación de óxido nítrico, el cual por su efecto vasodilatador llevaría a un valor de resistencia que sería inferior al calculado matemáticamente a partir de la relación  $R = \Delta P/C$  que vimos antes (Levy y Pappano, 2007).

### **Contracción del miocardio**

El músculo cardíaco está formado por células contráctiles individuales denominadas miocitos, las cuales están unidas entre sí por estructuras denominadas discos intercalares que poseen muy baja resistencia eléctrica. A diferencia del músculo esquelético, los miocitos cardíacos presentan ramificaciones laterales que los interconectan entre ellos formando una especie de red muscular (Figura 6).



**Figura 6:** Arriba a la derecha se muestra un fragmento de miocardio, y a su izquierda un fascículo y una fibra provenientes del mismo, todos con resolución de microscopio óptico. Más hacia abajo, y ya con resolución de microscopio electrónico, se muestran los sarcómeros y los miofilamentos que dan origen a las bandas que los caracterizan. Abajo y a la derecha se muestra la disposición de los miofilamentos en cortes transversales y la constitución de la actina y miosina.

La baja resistencia eléctrica mencionada lleva a que la estimulación de un punto del miocardio se difunda rápidamente al resto de los miocitos, los cuales constituyen de esta manera un sincitio desde el punto de vista eléctrico. Otra característica de los miocitos es que poseen un retículo sarcoplásmico muy desarrollado y que se conecta a

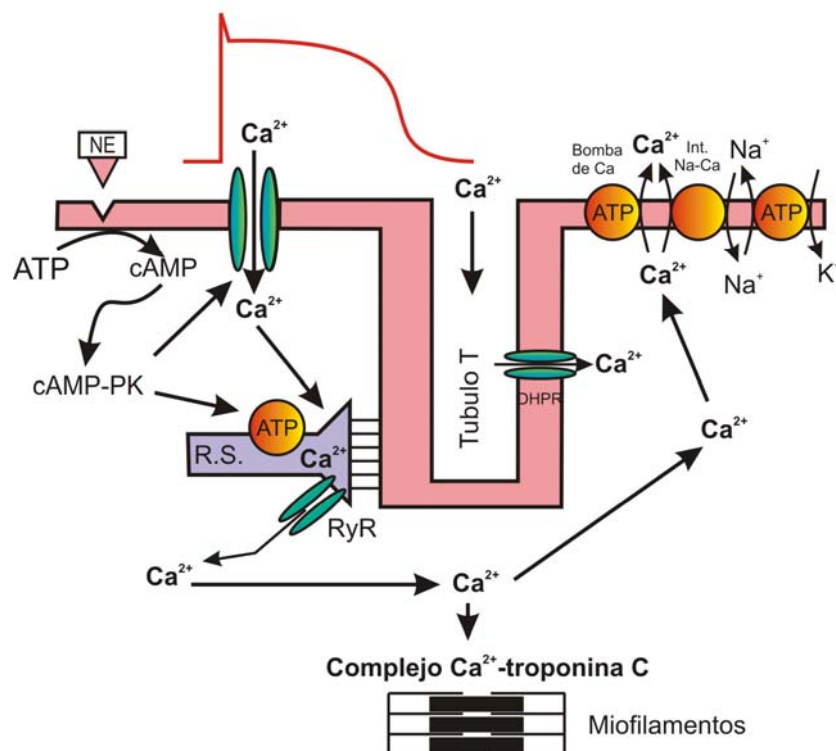
invaginaciones profundas de la membrana celular (túbulos T). Este hecho produce que la estimulación superficial de la membrana celular se transmita rápidamente al retículo y con esto a regiones profundas del miocito cercanas al aparato contráctil; logrando así una contracción simultánea y coordinada de todo el miocito cardíaco (Braunwald y col., 1976, a).

El aparato contráctil está formado por los denominados miofilamentos, compuestos a su vez por proteínas con función contráctil y/o regulatoria. Los filamentos desde el punto de vista histológico se clasifican en finos y gruesos, y se interdigitan entre sí dándole al músculo un aspecto estriado característico. Hoy día se acepta que la contracción del miocardio se debe al deslizamiento de estos miofilamentos unos sobre otros, y no al acortamiento individual de los mismos (Katz, 1977, a).

Los filamentos gruesos están formados por una proteína denominada miosina, de un peso molecular de alrededor de 500.000 Daltons, y compuesta por una parte filamentosa (cola de la miosina) y en un extremo de la misma dos porciones globulares (cabezas de la miosina) que están inclinadas con un determinado ángulo con respecto al eje del filamento. Cada cabeza tiene anexas dos cadenas livianas con un peso de alrededor de 20.000 Daltons, las cuales tienen función reguladora de la contracción. Un filamento grueso está formado por alrededor de 250 moléculas de miosina, la mitad de las cuáles tiene sus cabezas dirigidas hacia un extremo del filamento y la otra mitad hacia el extremo opuesto. Esto hace que la porción central del filamento esté desprovista de cabezas, las cuales aumentan en cantidad hacia los extremos. La inclinación de la cabeza con respecto al cuerpo que fue descrita antes hace que las cabezas protruyan hacia los lados del filamento grueso, formando los denominados “puentes” de unión entre el filamento grueso y los adyacentes (Katz, 1977, a).

Los filamentos finos están formados por tres proteínas contráctiles. La más importante y que forma la principal estructura del filamento es la actina, una proteína de tipo globular (actina G) con un peso molecular de alrededor de 42.000 Daltons. Las moléculas de actina G se unen entre sí formando dos cadenas (actina F o filamentosa) enrolladas una sobre otra y formando la parte principal del filamento fino. A lo largo de éste y ocupando una especie de surco que delimitan las cadenas de actina F se encuentra una segunda proteína contráctil llamada tropomiosina. La tropomiosina es una doble cadena de aminoácidos con un peso molecular de alrededor de 60.000 Daltons y que se repite a intervalos regulares de un extremo al otro del filamento fino. La tercera proteína contráctil es el denominado complejo de troponina, formado a su

vez por tres subunidades: la troponina T, C y la I. Estos complejos de troponina se encuentran unidos a la tropomiosina a intervalos regulares de aproximadamente 500 Angströms a lo largo del filamento fino, pero no en forma continua como la actina y tropomiosina. Dentro del complejo de troponina, la variedad T es la encargada de unirlo a la molécula de tropomiosina, y la variedad I es la que se encarga de inhibir la interacción actina-miosina cuando el miocito se encuentra en reposo y el calcio citosólico se encuentra en baja concentración. Finalmente, la troponina C es la encargada de unirse al calcio por la alta afinidad que presenta hacia el mismo (Katz, 1977, b) (Figura 7).



**Figura 7:** Esquema de las principales vías de ingreso y egreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula cardíaca. A la izquierda se muestran los canales voltaje-operados por los cuales ingresa una cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  insuficiente para desencadenar la contracción pero que libera  $\text{Ca}^{2+}$  adicional del retículo sarcoplásmico. Ese  $\text{Ca}^{2+}$  liberado se une a la troponina C y provoca el deslizamiento de los miofilamentos. La relajación se desencadena cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es descendido por 3 principales mecanismos: la Ca-ATPasa del retículo sarcoplásmico, la Ca-ATPasa de membrana, y el intercambiador Na-Ca. DHPR= canales voltaje operados por  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a las dihidropiridinas. RyR= Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a rianodina.

Como se dijo antes, se acepta que la contracción se debe al deslizamiento unos sobre otros de los filamentos finos y gruesos, o sea de la miosina y la actina-tropomiosina que constituyen sus componentes principales. El mecanismo de deslizamiento es desencadenado por la elevación de la concentración de calcio citosólico, que en reposo es muy bajo, alrededor de 200 a 300 nM. Cuando llega un potencial de acción a la superficie del miocito el mismo es transmitido rápidamente a toda la membrana

incluyendo los túbulos T. Esto produce apertura de canales de calcio voltaje operados y entrada de una escasa cantidad de calcio, que no alcanza por sí solo a desencadenar la contracción. Como los túbulos T se encuentran en íntimo contacto con el retículo sarcoplásmico, el calcio liberado por dichos túbulos actúa sobre canales especiales del retículo (denominados canales de rianodina), produciendo liberación de una cantidad mucho mayor de calcio almacenada en el mismo (liberación de calcio inducida por calcio) (Fabiato y Fabiato, 1979). El aumento de concentración del calcio citosólico provoca la unión del mismo a la troponina C, y este hecho hace que la tropomiosina sufra una traslación lateral con respecto a la actina y libere el sitio de interacción entre la actina y las cabezas de miosina. Como consecuencia de esa interacción y mediante energía aportada por el ATP las cabezas de miosina se flexionan con respecto al cuerpo de la molécula y hacen desplazar el filamento grueso con respecto al fino; este proceso repetido muchas veces lleva al acortamiento muscular. Como el corazón trabaja en forma cíclica alternando sístole y diástole, a cada contracción debe seguir la correspondiente relajación la cual es consecuencia a su vez de un descenso del calcio citosólico. Este descenso puede lograrse por tres mecanismos: 1- retoma del calcio por el mismo retículo que lo liberó (Mattiuzzi y col., 2005); 2- expulsión del calcio al líquido extracelular mediante el intercambiador sodio-calcio que se activa a favor del elevado gradiente extracelular/intracelular que presenta el sodio (Blaustein y Lederer, 1999) y 3- por expulsión de calcio al medio extracelular mediante una bomba ATP dependiente muy similar a la del retículo pero ubicada en la membrana celular (Wang y col., 2002). De éstos mecanismos, el 1 y 2 son habitualmente los más potentes, el 3 trabaja preferentemente cuando el calcio citosólico es muy bajo (Blaustein y Lederer, 1999). El corazón, aún trabajando en forma aislada, posee mecanismos regulatorios de su función que se denominan intrínsecos, y los principales son cuatro (Braunwald y col., 1976, b):

- a- La precarga, representada por el retorno venoso que recibe el corazón y que produce un grado determinado de estiramiento del miocito, se vincula en forma directamente proporcional a la función como bomba: a mayor retorno venoso, mayor volumen expulsado (ley de Frank-Starling) (Patterson y col., 1914).
- b- La poscarga, representada por la presión arterial contra la cual bombea el corazón, se vincula en forma inversamente proporcional a la función como bomba: a mayor poscarga menor acortamiento y menor volumen expulsado.
- c- La frecuencia cardíaca, que se vincula en forma directamente proporcional a la

función como bomba: a mayor frecuencia, mayor volumen expulsado (fenómeno de la escalera).

- d- Contractilidad: manteniendo constantes los tres factores recién mencionados, toda variación en más o en menos de la capacidad de bombeo refleja un aumento o disminución respectivamente de la contractilidad miocárdica, la cual actualmente se sabe que depende de la concentración de calcio en el aparato contráctil (Cingolani, 2000).

El control de la función miocárdica, además de los factores intrínsecos mencionados, está a cargo principalmente del sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático. En el caso del sistema nervioso simpático los principales neurotransmisores fisiológicos son las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, que actúan sobre dos tipos principales de receptores:  $\alpha$  y  $\beta$  (ambos con subtipo 1 y 2). Las catecolaminas son sintetizadas en dos lugares principales: las terminaciones nerviosas del simpático y la médula suprarrenal. En las terminaciones nerviosas se sintetiza noradrenalina que actúa de forma predominante sobre receptores  $\alpha$ , y en la médula suprarrenal se sintetizan ambas catecolaminas, predominando la adrenalina en proporción de 4 a 1 (Hoffman, 2001). En el corazón predominan los receptores  $\beta$  ( $\beta_1/\beta_2$  en miocardio humano normal 70-80%/20-30%) (Zuberbuhler y Bohr, 1965) que actúan vía AMPc y fosforilación de proteínas quinasas AMPc dependientes produciendo los conocidos efectos inotrópico y cronotrópico positivo. Cuando hay una estimulación simpática la primera en ejercer su efecto es la noradrenalina ya que es liberada a nivel local. Si la estimulación es más duradera comienza a predominar la adrenalina circulante proveniente de la médula suprarrenal. El efecto directo de las catecolaminas sobre las coronarias es producir vasoconstricción a través de receptores  $\alpha$ . Sin embargo ese efecto directo se ve contrarrestado por la liberación de adenosina consecuente a la estimulación simpática, o sea que en la práctica y en el corazón entero las catecolaminas terminan provocando dilatación coronaria (Berne y col., 1965).

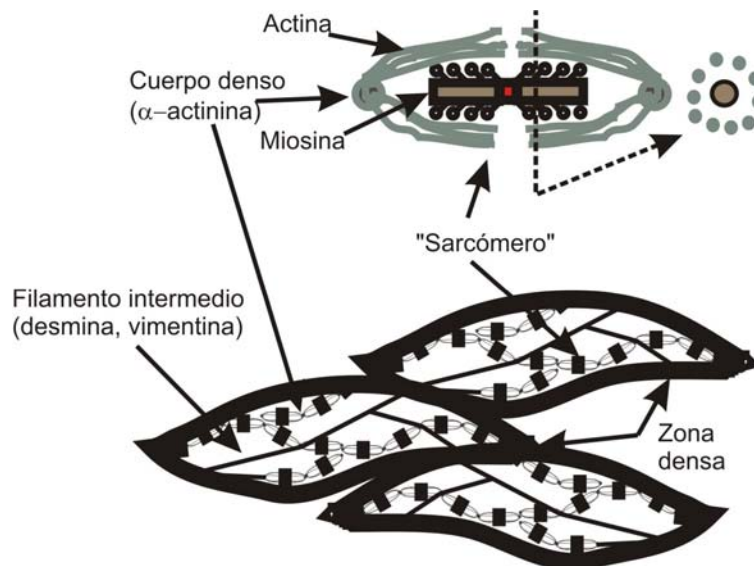
El sistema parasimpático inerva al corazón por vía del nervio vago, que mediante la liberación de acetilcolina (ACh) actúa sobre receptores muscarínicos. La ACh estimula directamente la apertura de canales de potasio por un mecanismo dependiente de GMPc, disminuye la probabilidad de apertura de canales voltaje operados de calcio a través de PKC, y adicionalmente bloquea la liberación de noradrenalina de las terminales simpáticas (Levy y Pappano, 2007). Sobre el miocardio tiene un efecto

cronotrópico e inotrópico negativo, y sobre los vasos coronarios aislados su efecto directo es producir vasodilatación a través de receptores muscarínicos. Sin embargo este efecto directo se ve contrarrestado por su efecto depresor cardíaco que disminuye la liberación tónica de adenosina y provoca así vasoconstricción.

La contracción del músculo cardíaco puede evaluarse *in-vitro* mediante un preparado de músculo papilar aislado, e *in-vivo* midiendo el volumen minuto en un animal intacto.

### Contracción del músculo liso vascular

Al igual que el músculo esquelético, el músculo liso tiene filamentos finos y gruesos que están relacionados con la contracción (Silver y Kraffe, 1996) (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema del aparato contráctil del músculo liso. En la parte inferior se representan tres células unidas por uniones densas, mostrando la distribución irregular de los sarcómeros. En la parte superior se amplía uno de los sarcómeros para mostrar la relación entre filamentos de actina y miosina; en el corte se ve que los filamentos de actina son más abundantes que en el músculo esquelético. Para que el aparato contráctil se vea más claramente no se ha dibujado el núcleo.

Los filamentos gruesos son más largos que en el músculo esquelético: 2,2  $\mu\text{m}$  frente a 1,5  $\mu\text{m}$ . Están compuestos principalmente por la proteína miosina, que está formada por dos subunidades pesadas (~230 kD cada una) y dos pares de cadenas livianas (LC20 de 20 kD y LC17 de 17 kD). Las cadenas pesadas están enrolladas entre sí, constituyendo el cuerpo del filamento, y terminan en dos porciones de naturaleza globular que sobresalen del mismo a intervalos regulares para poder formar puentes con los filamentos finos. Estas subunidades globulares, o "cabezas" de miosina, poseen sitios de unión a la actina y tienen la capacidad de hidrolizar ATP. Además,

sobre cada cabeza de miosina se disponen dos de las cadenas livianas que son importantes para la regulación de la actividad ATPásica.

La longitud de los filamentos finos es de 1-2  $\mu\text{m}$ . La F-actina es el principal constituyente de estos filamentos y está formada por monómeros globulares de G-actina. Los monómeros de actina tienen un peso de 42,3 kD y sus dimensiones son de aproximadamente 5,5 x 5,5 x 3,5 nm. Están formados por una única cadena polipeptídica plegada de forma tal que constituye dos dominios globulares de tamaño similar separados por una hendidura.

En condiciones fisiológicas, los monómeros se polimerizan para formar un polímero filamentoso helicoidal de doble cadena llamado F-actina. La doble hélice de la F-actina constituye la columna vertebral de los filamentos finos. En los surcos de la F-actina se dispone otra proteína fibrilar, la tropomiosina. Los monómeros de tropomiosina están formados por dos cadenas polipeptídicas paralelas cuya estructura predominante es de  $\alpha$  hélice. En la célula, los monómeros se polimerizan cabeza con cola para dar una larga cadena filamentosa que corre por los surcos de la F-actina.

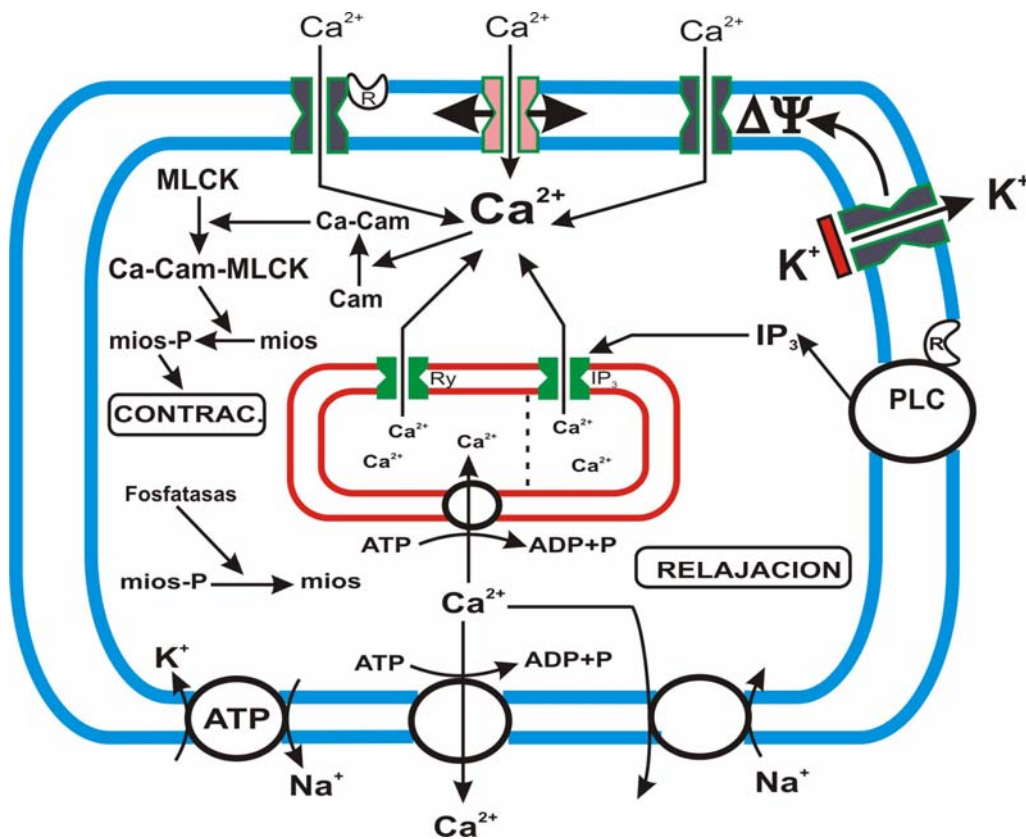
También forman parte de los filamentos finos otras dos proteínas: la calponina y el caldesmón. Hay varios factores, que se discutirán luego, que permiten suponer que la calponina y el caldesmón cumplen un papel de proteínas reguladoras de la contracción, aunque algunos proponen que sólo la calponina tiene esta función, mientras que el caldesmón tendría un rol puramente estructural.

A diferencia del músculo estriado, los filamentos finos del músculo liso carecen de la proteína reguladora troponina.

En estado de reposo el  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol de la célula muscular lisa está dentro del intervalo de 120-170 nM, mientras que en el líquido extracelular la concentración es de 2,4-2,5 mM, o sea unas 10.000 veces mayor. La membrana celular tiene dos mecanismos para disminuir el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico: una bomba Ca-ATPasa que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  a expensas del gasto de ATP, y otra proteína llamada intercambiador Na-Ca que aprovecha el gradiente de  $\text{Na}^+$  a través de la membrana (mantenido por la Na-K-ATPasa) para expulsar un ion  $\text{Ca}^{2+}$  por cada tres iones  $\text{Na}^+$  que ingresan a la célula. En la membrana del retículo sarcoplásmico también hay una bomba Ca-ATPasa que es la que permite incorporar  $\text{Ca}^{2+}$  a este reservorio (Nazer y Van Breemen, 1998). La razón de mantener baja la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico es que esto le permite a la célula utilizar al  $\text{Ca}^{2+}$  como transductor de información: el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular es el principal mecanismo que inicia la contracción muscular. El aumento del  $\text{Ca}^{2+}$



citoplasmático es detectado por la calmodulina, una proteína reguladora que liga calcio. El complejo Ca-calmodulina se une a la enzima MLCK (quinasa de la cadena liviana de miosina) activándola. La fosforilación por la MLCK de la Serina 19 de la cadena liviana reguladora de la miosina permite que la actina active a la ATPasa de las cabezas de miosina y entonces se produzca la contracción muscular. Una disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desactiva a la MLCK; la cadena liviana de la miosina es entonces desfosforilada por una fosfatasa específica, lo que inactiva a la ATPasa provocando la relajación del músculo (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema del mecanismo de contracción del músculo liso. En el lado superior de la membrana se han representado de izquierda a derecha tres diferentes canales de entrada de calcio: receptor-operado, activado por estiramiento y voltaje operado. En el centro de la célula se representó el retículo sarcoplásmico con su calcio ATPasa que secuestra calcio y canales de liberación sensibles a rianodina e  $\text{IP}_3$  (inositol trifosfato). En la parte izquierda del citosol se representa el rol del calcio y la calmodulina en la producción de la contracción; y en la parte inferior de la membrana aparecen los dos restantes mecanismos para descender la concentración de calcio citoplasmático provocando relajación: la calcio ATPasa de membrana y el intercambiador sodio-calcio.

En la membrana plasmática hay dos rutas principales para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a estímulos apropiados: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje (VOC) y canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por receptores (ROC). La despolarización de la membrana produce la apertura de los VOC, y la unión de un ligando específico a su receptor activa

los ROC, lo que permite que el  $\text{Ca}^{2+}$  difunda desde el medio extracelular hacia el citosol gracias al gran gradiente de concentración que existe para este ion. En el retículo sarcoplásmico hay dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : el canal activado por inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), llamado también "receptor de  $\text{IP}_3$ ", y el activado por calcio, también conocido como "receptor de rianodina" (Ry). Cuando ciertos agonistas se unen a sus receptores en la membrana plasmática se activa la enzima fosfolipasa C que hidroliza al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, un fosfolípido de la membrana, produciendo diacilglicerol e  $\text{IP}_3$ . Este último es un segundo mensajero que activa los canales  $\text{IP}_3$  sensibles del retículo sarcoplásmico produciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . El agonista fisiológico del receptor de rianodina todavía no se conoce. Se sabe que puede ser activado por  $\text{Ca}^{2+}$ , produciéndose así la llamada liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , y en publicaciones recientes se ha propuesto a la ADPc-ribosa como efector fisiológico de este canal, aunque también hay opiniones en contra (Hofer y Lefkimmiatis, 2007).

La interacción de los filamentos finos y gruesos durante la contracción del músculo liso se puede explicar mediante el modelo que se utiliza para el músculo esquelético. Este modelo predice que la fuerza desarrollada debe aumentar con el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto con el grado de fosforilación de la miosina. Esto efectivamente se observa en músculos lisos que se exponen a un breve período de estimulación.

Sin embargo, en los músculos lisos en los que la estimulación se mantiene durante períodos prolongados se obtienen contracciones tónicas en las que los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , después de un pico inicial, caen hasta una meseta, lo que determina que el grado de fosforilación de la miosina y la velocidad de consumo de ATP también disminuyan; a pesar de esto, los niveles de fuerza no decaen. Esto es energéticamente favorable para músculos que tienen que mantenerse contraídos durante largos períodos, como el músculo liso vascular, por ejemplo. El hecho de que la fosforilación caiga pero la fuerza se mantenga implica que existen puentes actina-miosina que contribuyen al proceso contráctil aunque estén desfosforilados, llamados "latch" (latch = tranca, cerrojo) (Murphy y Rembold, 2005).

En el control de la contracción del músculo liso tienen importancia diversos agonistas entre los cuales cabe mencionar: 1) catecolaminas, 2) endotelina, 3) óxido nítrico y 4) otros neurotransmisores como serotonina (Rembold, 1996).

- 1) Catecolaminas: al igual que en el miocardio pueden actuar liberadas localmente de las terminaciones nerviosas simpáticas (especialmente noradrenalina) o

pueden llegar por vía humoral provenientes de la médula suprarrenal (en este caso predomina la adrenalina sobre la noradrenalina en una proporción de 4 a 1). En los vasos sanguíneos las catecolaminas actuando sobre el receptor  $\alpha$  provocan vasoconstricción, con la excepción de los vasos del músculo esquelético donde predominan los receptores  $\beta_2$  de los cuales resulta vasodilatación. A nivel del músculo liso las catecolaminas pueden provocar ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales receptor-operados o liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares, predominantemente el retículo sarcoplásmico (Baron y col., 1972).

- 2) Endotelina: las endotelinas son péptidos de 21 aminoácidos producidos por las células endoteliales que tienen un efecto vasoconstrictor muy intenso y duradero. Existen tres variedades de endotelina  $\text{ET}_1$ ,  $\text{ET}_2$  y  $\text{ET}_3$  que derivan a su vez de una molécula de mayor tamaño denominada preproendotelina. El efecto vasoconstrictor lo efectúan actuando sobre la célula muscular lisa por la vía de la fosfolipasa C y liberando  $\text{Ca}^{2+}$  por canales operados por  $\text{IP}_3$  desde el retículo sarcoplásmico. En una etapa más tardía la endotelina provoca también entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular por vías aún no dilucidadas (Barton y Yanagisawa, 2008).
- 3) Óxido Nítrico: la producción de agentes vasodilatadores por parte del endotelio fue descubierta por Furchgott y Zawadzki en 1980, y posteriormente se demostró que ese agente que inicialmente se denominó factor relajante derivado del endotelio era óxido nítrico. El óxido nítrico se sintetiza a partir de la L-arginina y  $\text{O}_2$  molecular por acción de la óxido nítrico sintetasa, de la cual existen 3 variedades: la constitutiva (células endoteliales), la neuronal (neuronas del sistema nervioso central), y la inducible existente en varios tejidos. La producción de óxido nítrico puede ser estimulada por acetilcolina y por nitrodilatadores (nitroglicerina y derivados), y puede ser bloqueada por el inhibidor específico L-NAME (N (G)-nitro-L- arginine methyl ester). Actúa incrementando el GMPc y produciendo relajación del músculo liso. Además del efecto vasodilatador clásico hoy día se reconoce un rol importante del óxido nítrico como neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico, y en procesos patológicos como el shock séptico y la inflamación (Furchgott y Zawadzki, 1980).
- 4) Serotonina: se sintetiza a partir del aminoácido esencial triptófano y se

encuentra en el organismo principalmente en las células cromafines del aparato digestivo, en las plaquetas, y en diversos sitios del sistema nervioso central donde actúa como neurotransmisor. Actúa sobre receptores denominados 5-HT (5-hidroxitriptamina) de los cuales existen al menos 4 variedades. A nivel del aparato cardiovascular la respuesta clásica de los vasos sanguíneos a la serotonina es la vasoconstricción. El mecanismo de acción es vía fosfolipasa C con la generación de dos segundos mensajeros, el diacilglicerol que activa la proteína quinasa C y el  $IP_3$  que libera  $Ca^{2+}$  de depósitos intracelulares (Sanders-Bush y Mayer, 2001).

La contractilidad del músculo liso vascular puede medirse a través del estudio de anillos arteriales aislados.

## **Regulación de la presión arterial**

De acuerdo a lo visto antes la variable que se regula para distribuir el caudal sanguíneo a los diferentes tejidos es la resistencia periférica:  $C = \Delta P/R$ . En base a esta fórmula, para aumentar el caudal hacia un territorio determinado hay que descender su resistencia dilatando sus arteriolas. Pero para que esto pueda producirse, y como surge de la fórmula, la presión arterial tiene que mantenerse constante, y para que eso ocurra el organismo dispone de diversos mecanismos.

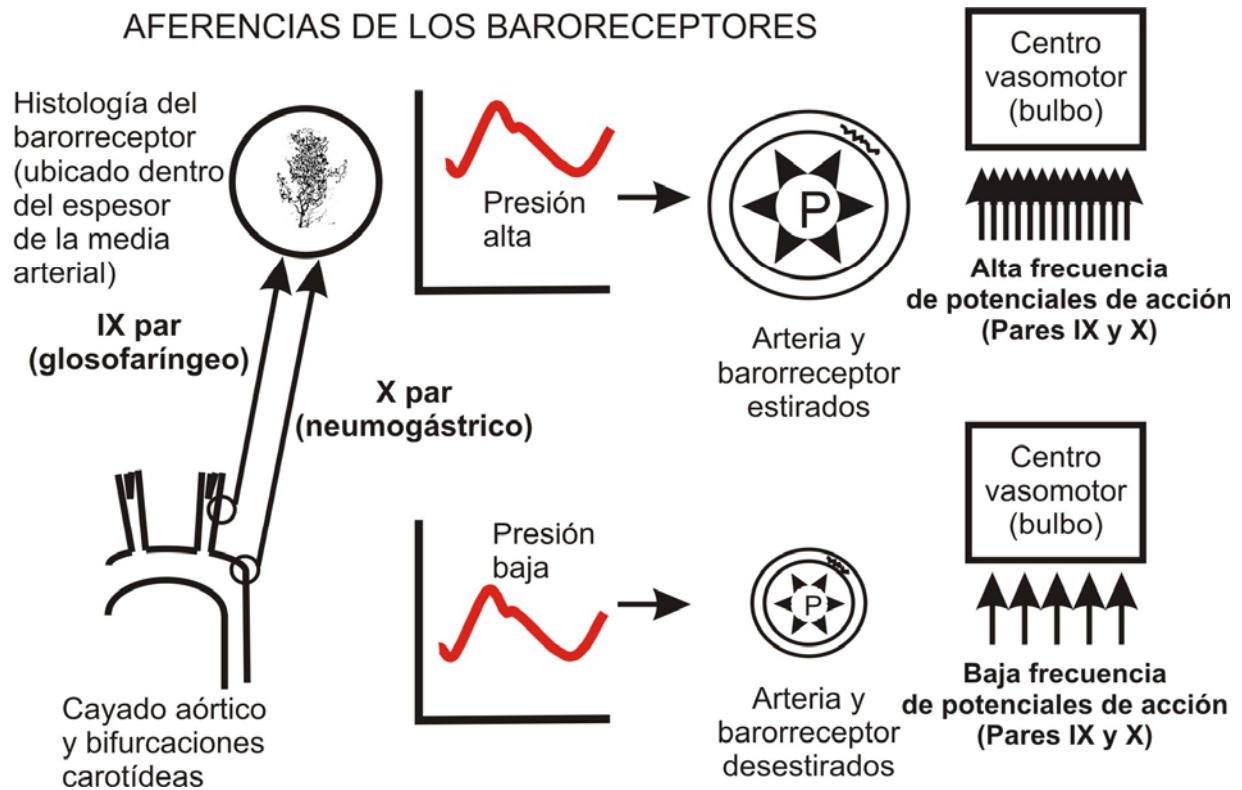
### **Regulación nerviosa de la presión arterial**

En la regulación nerviosa interviene el control autonómico, en el que participan esencialmente los barorreceptores arteriales, receptores de volumen o de baja presión, quimiorreceptores, osmorreceptores, el centro vasomotor del tronco cerebral, y otros núcleos y áreas cerebrales.

#### Barorreceptores

Los barorreceptores arteriales aórticos y carotídeos son receptores de distensión ubicados en el arco aórtico y en el seno carotídeo y son también llamados barorreceptores aortocarotídeos “de presión alta” (Opie y Paterson, 2004). Estos envían las señales sensadas al centro vasomotor del bulbo por vía del nervio aórtico (combinado con el neumogástrico) en el caso de los barorreceptores del arco aórtico, y por medio del nervio glossofaríngeo (nervio de Hering) en el caso de los barorreceptores

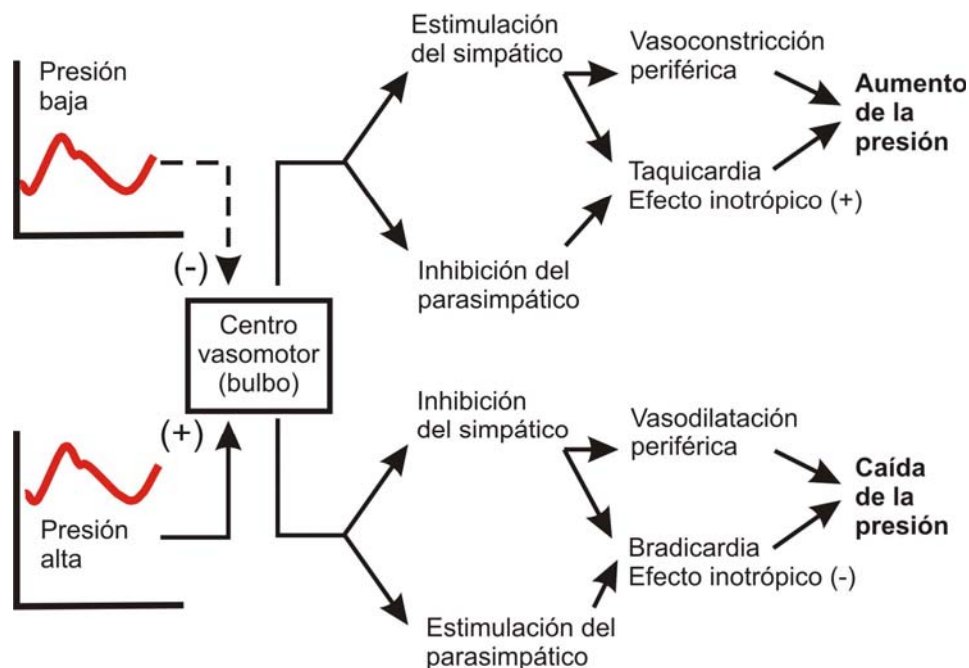
del seno carotídeo (Figura 10 parte izquierda). Ante un aumento de la presión arterial los barorreceptores son estirados y aumenta el número de potenciales de acción enviados por segundo al centro vasomotor, saturándose el mecanismo al llegar a 180 mmHg. Por el contrario, ante un descenso de la presión arterial los barorreceptores disminuyen el número de potenciales de acción, cesando totalmente su actividad por debajo de los 60 mmHg (Figura 10 parte derecha).



**Figura 10:** Esquema del funcionamiento de la vía aferente de los barorreceptores, que se muestran a la izquierda de la figura. En la parte media y derecha de la figura se muestran las consecuencias de variar considerablemente la presión arterial. Cuando la presión aumenta (parte superior) la arteria y el barorreceptor son estirados y aumenta el número de potenciales de acción generados y transmitidos al centro vasomotor por los pares craneales IX y X. Cuando la presión disminuye (parte inferior) la arteria y el barorreceptor se desestiran, el número de potenciales de acción disminuye y el centro vasomotor recibe menos aferencias por los pares craneales IX y X.

La respuesta eferente del centro vasomotor ante un aumento de la presión arterial es disminuir la frecuencia cardíaca, la contractilidad, el volumen minuto y la resistencia vascular periférica, todos los cuales llevan a descender la presión arterial a su nivel normal (Figura 11 parte inferior). Por el contrario la respuesta eferente ante una baja de presión como ocurre por ejemplo cuando se pasa rápidamente de la posición de reposo a la de pie, es una descarga simpática, produciendo vasoconstricción, taquicardia y aumento del inotropismo, todos los cuales tienden a que se recupere nuevamente la presión arterial (Figura 11 parte superior).

## RESPUESTA DEL CENTRO VASOMOTOR



**Figura 11:** Esquema que muestra la respuesta del centro vasomotor a la información recibida de los barorreceptores. En el panel superior se muestra que si la presión baja el centro vasomotor se desactiva y produce la estimulación del simpático (causando vasoconstricción periférica, taquicardia y efecto inotrópico positivo) y la inhibición del parasimpático (ayudando al efecto anterior) y produciendo aumento compensatorio de la presión arterial. En el panel inferior se muestra que si la presión aumenta el centro vasomotor se activa y produce la inhibición del simpático (causando vasodilatación periférica, bradicardia y efecto inotrópico negativo) y la estimulación del parasimpático (ayudando al efecto anterior) y produciendo disminución compensatoria de la presión arterial.

Ambos barorreceptores son óptimamente eficaces en un rango de presiones que va de los 60 a los 180 mmHg, pero si se los mide por separado los carotídeos son más sensibles, es decir que empiezan a descargar a presiones más bajas, y para cada presión por encima de ese umbral descargan más que los aórticos (Downing, 1979).

### Receptores de volumen o de baja presión

Juntamente con los barorreceptores arteriales hay un sentido del volumen circulante por medio de ramas del neumogástrico que inervan las aurículas y ventrículos cardíacos y que son los barorreceptores cardiopulmonares o “de baja presión”.

Estos receptores son sensibles a alteraciones del volumen de llenado cardíaco, y cuando son estimulados por un aumento del mismo, responden por medio de fibras aferentes al cerebro para inhibir el sistema nervioso simpático y disminuir la secreción de renina, descendiendo de tal forma la resistencia vascular periférica y evitando el aumento de presión arterial (Opie y Paterson, 2004). El aumento de retorno venoso puede provocar en ciertas circunstancias aumento de la frecuencia cardíaca por medio

de activación medular de impulsos eferentes simpáticos al nódulo sinusal. Bainbridge, en 1915 describió un reflejo que lleva su nombre consistente en la aparición de taquicardia como respuesta a una transfusión de sangre (Klabunde, 2005; Opie y Paterson, 2004). Sin embargo hay una dependencia de la frecuencia cardíaca previa a la transfusión, de manera que el reflejo clásico de Bainbridge (taquicardia) solo se observa si la frecuencia previa era baja. Por el contrario si se parte de frecuencias altas la infusión de volumen provoca bradicardia (Levy y Pappano, 2007). Otros barorreceptores cardiopulmonares estimulados por aumento del volumen sanguíneo provocan disminución de la liberación de la hormona antidiurética (Gourine, 2005). Hay además fibras vagales aferentes amielínicas en aurículas y ventrículos que van a receptores activados en su frecuencia de descarga por aumento de presiones auriculares y ventriculares. Se comportan en forma similar a la de los barorreceptores arteriales, pero tienen la particularidad que de acuerdo a las circunstancias pueden reforzar u oponerse a la actividad de los barorreceptores. En el caso de hipertensión arterial crónica los barorreceptores presentan el fenómeno de reajuste o reubicación, por el cual su umbral de activación se torna más alto que lo normal, aunque todavía son capaces de responder a los ascensos agudos, pero sin llevar las cifras de presión arterial a lo normal. El sistema nervioso simpático nunca está completamente inhibido, aún cuando la presión arterial sea alta (Gourine, 2005). Las anomalías de los barorreceptores no llevan directamente a hipertensión arterial pero incrementan la variabilidad de la presión arterial y aceleran el daño de órganos blanco.

### Quimiorreceptores

Son grupos celulares que sensan hipoxemia, hipercapnia y estrés oxidativo. Están ubicados cerca de los senos carotídeos y de sectores adyacentes de la aorta (quimiorreceptores periféricos) y en la cara ventral del bulbo raquídeo (quimiorreceptores centrales) y son sensores de  $PO_2$ ,  $PCO_2$  y de concentración de  $H^+$ , siendo su función la de regular la actividad respiratoria para mantener dentro de límites normales a esas variables (Klabunde, 2005). Los quimiorreceptores periféricos están irrigados por pequeñas arterias que emergen directamente de la aorta o del seno carotídeo y son los tejidos con más circulación sanguínea por unidad de peso de todo el organismo (Burton, 1972).

En respuesta a una disminución de la  $PO_2$  las células sensibles tipo I del cuerpo carotídeo liberan ATP para activar fibras aferentes del nervio del seno carotídeo que

Llevar la información a los centros respiratorios reguladores cerebrales. Cuando hay un aumento de  $PCO_2$  las estructuras quimiosensibles de la superficie ventral del bulbo raquídeo liberan ATP, el que va a actuar localmente en esa zona (Gourine, 2005). Aunque de menor importancia que los barorreceptores en la regulación de la presión arterial, pueden participar en ella activamente en casos de hipoxia marcada (Wyss, 2008).

### Osmorreceptores

Otros sensores intervinientes en la regulación de la presión arterial son los osmorreceptores: el aumento de la osmolaridad plasmática estimula la actividad del sistema nervioso simpático, y puede producir incremento sostenido de la presión arterial a través de estimular receptores cerebrales. Se supone que los osmorreceptores se ubican en el núcleo paraventricular hipotalámico de la *lamina terminalis* del cerebro anterior. Estos receptores podrían tener su papel en la hipertensión arterial sensible a la sal (Stocker y col., 2008; Brooks y col., 2005).

### Otros mecanismos influidos por el sistema nervioso central

Alguno de los principales son (Swedberg y col., 1990; Zucker, 2006): 1) El sistema nervioso simpático muscular, que ejerce una acción simpaticoexcitatoria en el sistema nervioso central (la Ang II impide la inhibición del sistema nervioso simpático muscular). 2) Los aumentos de insulina plasmática que aumentan la actividad simpática, residiendo esta acción en el sistema nervioso central. 3) La presencia de opioides endógenos que inhiben los barorreflejos. 4) El óxido nítrico que actúa en el sistema nervioso central inhibiendo la actividad del sistema nervioso simpático.

## **Regulación humoral de la presión arterial**

### Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

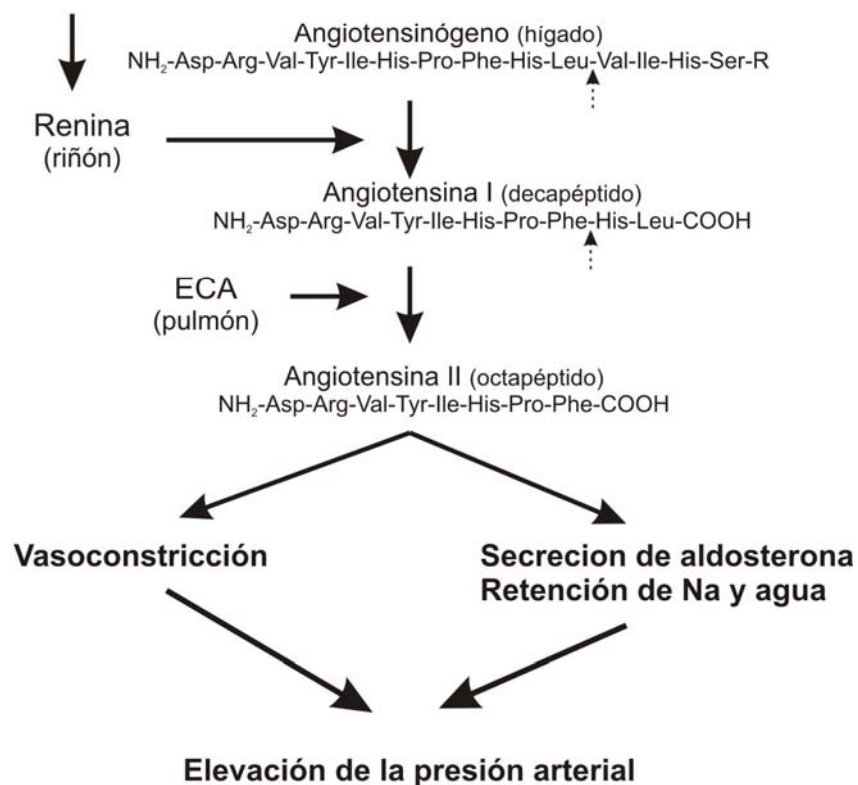
Es regulador de la presión arterial en el mediano y largo plazo. Ejerce un rol central en la fisiopatología de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardíaca. Sus acciones principales incluyen la de regular la presión arterial, el tono vascular y la volemia, y facilitar la transmisión simpática. La hormona final del sistema renina angiotensina es la Angiotensina II. Se forma luego de una cadena de eventos, iniciada por la síntesis de preprorenina, que luego se convierte en prorenina, que es almacenada en gránulos en las células yuxtglomerulares del riñón, ubicadas en la arteriola aferente terminal



(Figura 12).

El barorreceptor renal, considerado el más importante regulador de la liberación de renina, está ubicado en la arteriola glomerular aferente y estimula la formación de renina cuando sensa disminución de la presión de perfusión, atenuando la producción cuando la presión aumenta (Beierwaites, 2008).

- 1) Descenso de la presión arterial en la arteriola aferente.
- 2) Descenso de la cantidad de  $\text{Na}^+$  en el túbulo distal a nivel del aparato yuxtaglomerular.
- 3) Estímulo simpático de las células productoras de renina.



**Figura 12:** Esquema del sistema renina-angiotensina en su descripción tradicional. Hay 3 estímulos principales mostrados arriba a la izquierda que provocan la liberación de renina a nivel del aparato yuxtaglomerular. Esta actúa sobre el angiotensinógeno circulante (producido en el hígado) liberando angiotensina I, un decapeptido sin acción sobre la presión arterial. La enzima convertidora, presente principalmente en el endotelio pulmonar pero también en otros tejidos libera dos aminoácidos y produce angiotensina II, un octapéptido que provoca una intensa vasoconstricción, secreción de aldosterona y retención de sodio y agua, todo lo cual lleva a la elevación de la presión arterial.

Son estímulos de secreción de renina: 1) la disminución de presión en la arteriola aferente del glomérulo renal; 2) la disminución de  $\text{Na}^+$  plasmático (sensada por la mácula densa, que es parte del aparato yuxtaglomerular renal, como una disminución de la carga tubular de  $\text{Na}^+$ ); 3) estímulos simpáticos (estimulación  $\beta$ -1-adrenérgica de

las células yuxtaglomerulares); 4) factores locales como las prostaglandinas, la dopamina, la adenosina, y el óxido nítrico. La secreción de renina es disminuida por los tres primeros factores mencionados actuando en sentido opuesto, y a través de la inhibición y/o disminución de los factores locales. La renina actúa sobre el Angiotensinógeno, sintetizado en el hígado, y lo transforma en Angiotensina I (Ang I), deca péptido sin acción biológica. Luego, la Enzima de Conversión de la Angiotensina (ECA), transforma a la Ang I en el octapéptido Ang II, hormona final efectora del sistema. La ECA también es la encargada de degradar e inactivar a la bradiquinina.

En el organismo (sobre todo en los glóbulos rojos) existen aminopeptidasas, que inactivan a la Ang II, que tiene una corta vida de aproximadamente un minuto. Estas peptidasas la convierten en Ang III (heptapéptido con el 50 % de la actividad presora de la primera), y en el hexapéptido Ang IV, considerado inactivo. La Ang III sería el verdadero efector del sistema renina angiotensina cerebral en el control de la presión arterial y también actúa a través del receptor AT<sub>1</sub> (Reaux-Le Goazigo y col., 2005).

La Ang I puede también ser convertida en el hexapéptido Ang-(1-7) en forma directa por ciertas endopeptidasas tisulares (endopeptidasa neutra y prolil endopeptidasa) (De la Riva, 2000; De Mello y Danser, 2000; Ferrario y col., 1991; Touyz y Schiffrin, 2000). En forma indirecta, la ECA-2 convierte a la Angiotensina I en Angiotensina 1-9 (nonapéptido), que no tiene acción vascular, pero puede ser convertida por la ECA en Angiotensina 1-7, (Boehm y Nabel, 2002). El Mas y el AT (1-7) son los receptores de la Ang-(1-7) (Kostenis y col., 2005).

#### Acciones de Ang II y Ang 1-7

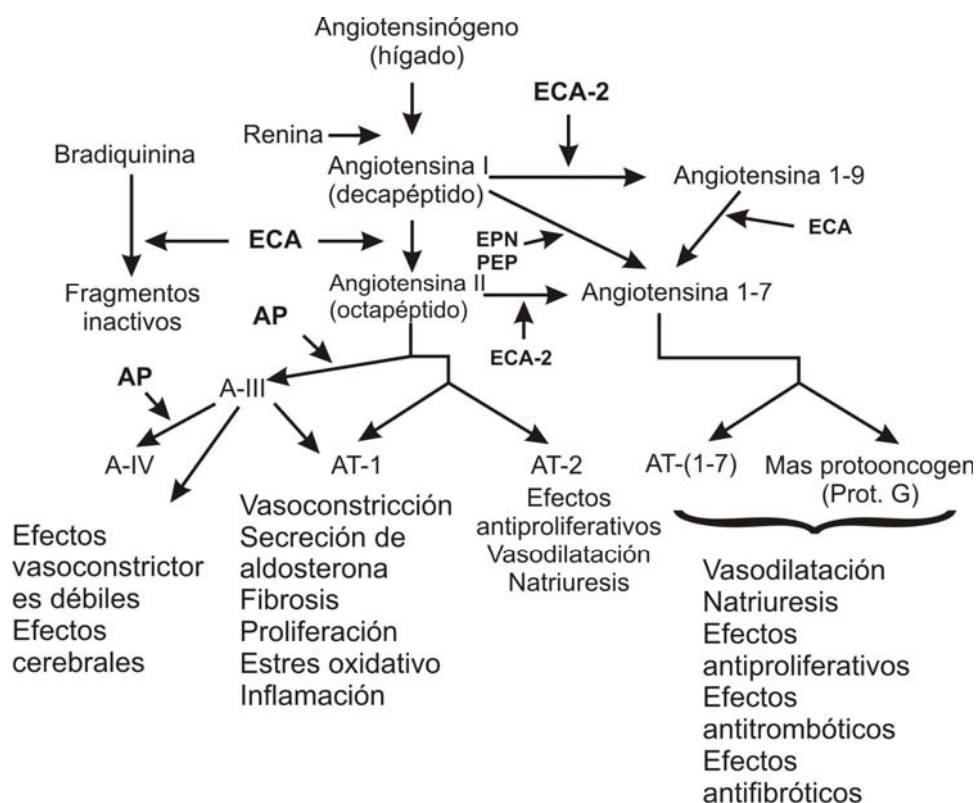
La Ang II ejerce acción importante sobre varios órganos:

- 1- Riñón: tiene acciones vasculares, glomerulares y tubulares. Sobre los vasos la Ang II contrae aquellos ubicados en forma previa al glomérulo (interlobares, arciformes, interlobulillares y aferentes). En el glomérulo, también contrae a la arteriola eferente, y del balance entre ambos efectos resultará la acción sobre la tasa de filtración glomerular, que puede permanecer inalterada, aumentar o disminuir. A nivel tubular proximal la Ang II aumenta la reabsorción de Na<sup>+</sup> a nivel del borde en cepillo de las células.
- 2- Suprarrenal: a nivel de esta glándula el efecto fundamental de la Ang II es aumentar la síntesis y liberación de aldosterona.
- 3- Sistema vascular periférico: la Ang II produce vasoconstricción generalizada y

aumento de la resistencia periférica, y como consecuencia aumento de la presión arterial. La Ang II estimula la síntesis de colágeno y el crecimiento de las células musculares lisas vasculares en cultivo y promueve la proliferación de células simil-fibroblastos (Brilla y col., 1995). Además la Ang II aumenta la producción endotelial de endotelina-1, poderoso vasoconstrictor.

- 4- Corazón: a nivel cardíaco la Ang II tiene un efecto inotrópico positivo débil, y juega un papel muy importante en la hipertrofia miocárdica, insuficiencia cardíaca e insuficiencia coronaria.
- 5- Sistema nervioso central: a nivel cerebral ejerce tres efectos principales: aumento de la sed, estimulación simpática central y aumento de la liberación de hormona antidiurética
- 6- Sistema nervioso autónomo simpático: su función consiste en potenciar la liberación y los efectos constrictores de su neurotransmisor (noradrenalina). (Touyz y Schiffrin, 2000).

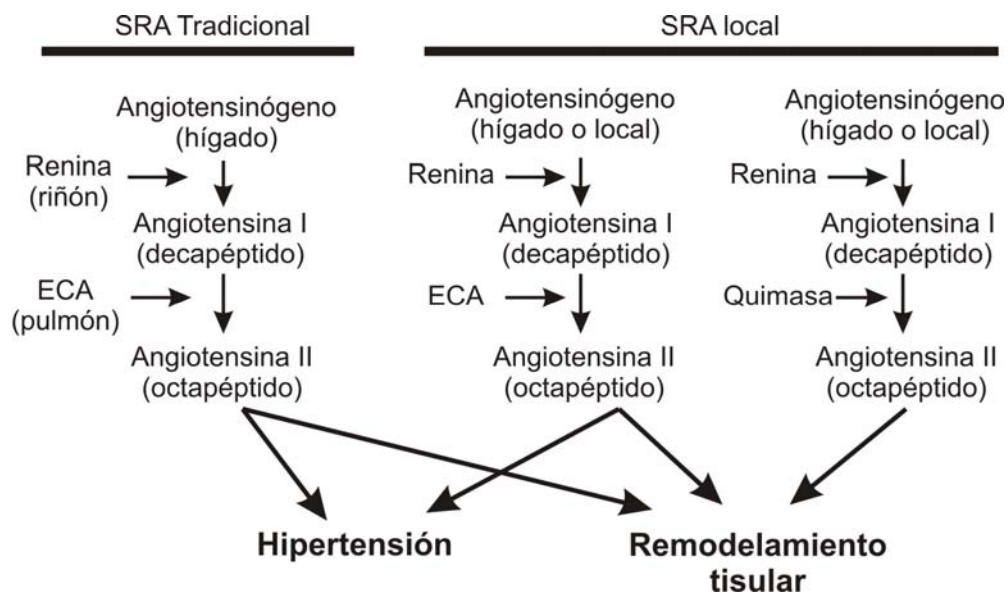
La Ang (1-7) es en cierto sentido antagonista fisiológico de la Ang II: no es dipsogénica ni secretagoga de aldosterona, pero sí libera vasopresina, prostaglandinas y óxido nítrico. También inhibe el crecimiento del músculo liso vascular. Es un vasodilatador en muchos lechos vasculares, y bloquea la vasoconstricción inducida por Ang II en arterias humanas (Roks y col., 1999). Además inhibe la síntesis proteica; amplifica el efecto vasodilatador de la bradiquinina; y probablemente reduce la liberación de noradrenalina a través de un mecanismo mediado por la bradiquinina y el óxido nítrico que estimula el señalamiento GMPc/proteinquinasa G (Figura 13).



**Figura 13:** Ampliación del eje Angiotensinógeno - Ang I - Ang II ya mostrado en la figura anterior y agregando: 1- la inactivación de la Ang II por amino peptidasas específicas (AP), 2- acción de la ECA sobre la bradiquinina, 3- formación de Ang (1-7) a partir de la Ang I, ya sea en forma directa mediante endopeptidasa neutra (EPN) o prolil endopeptidasa (PEP); o en forma indirecta mediante la ECA-2 que la transforma en Ang (1-9), que es convertida por la ECA en Ang (1-7), y 4- efectos opuestos de la Ang II y de la Ang (1-7) en los distintos tejidos y órganos.

Aparte de la formación de Ang II por la ECA en el plasma, debe tenerse en cuenta la existencia de Sistemas Renina Angiotensina locales o tisulares (Dzau, 1988; Hirsch y col., 1990; Ruzicka y Leenen, 1997; Kurabayashi y Yazaki, 1995; Luchner y col., 1996; Urata y col., 1996; Dzau y col., 2001; Re, 2001) (Figura 14).

Aún no está claro si la actividad tisular resulta de la síntesis local de angiotensinógeno, o si el mismo está presente en ciertos tejidos porque proviene del plasma sin ser resultado de síntesis local (Re, 2001). En condiciones fisiológicas la renina tisular proviene de la circulación (Ruzicka y Leenen, 1997), siendo captada por un proceso activo a nivel local (Batenburg y col. 2007), y actuando sobre el Angiotensinógeno produce Ang I. La diferencia entre el sistema tisular y el plasmático es que la conversión de Ang I en Ang II puede producirse tanto por ECA como por enzimas sintetizadas localmente como la quimasa. En el tejido cardíaco se han encontrado todos los componentes del sistema renina angiotensina local. El mismo participa en el crecimiento celular y la apoptosis, jugando así un papel muy importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardíaca.



**Figura 14:** A la izquierda se muestra el sistema renina-angiotensina en su descripción original, con la angiotensina II formándose en el plasma a partir de angiotensina I y angiotensinógeno. A la derecha se muestra el denominado sistema renina-angiotensina local, cuya existencia se ha demostrado en numerosos tejidos entre ellos el cardiaco y vascular. Obsérvese que en el sistema local la formación de angiotensina I depende de renina al igual que en el tradicional, pero la formación de angiotensina II puede deberse a la ECA como en el sistema tradicional, y también a una quimasa sintetizada localmente.

### Receptores de Ang II

Los principales son los AT-1 y AT-2, ambos miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana. La mayoría de los efectos hemodinámicos de la Ang II se explican por su unión al receptor AT-1, mientras que al AT-2 se lo vincula con los efectos sobre la proliferación tisular. Uno de los primeros efectos de la activación del receptor AT-1 es la activación de la fosfolipasa C vía la proteína Gq, generando IP<sub>3</sub> y diacilglicerol. El IP<sub>3</sub> se une a receptores intracelulares liberando Ca<sup>2+</sup>, y además hay una entrada adicional por canales voltaje-operados, todo lo cual lleva al aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular libre y a su unión a calmodulina. Esto activa luego a quinasas específicas que producen el efecto final. Adicionalmente a lo anterior, la activación del receptor AT-1 estimula a la fosfolipasa D, la cual degrada a la fosfatidilcolina generando ácido fosfatídico y luego diacilglicerol. Este, unido al incremento del Ca<sup>2+</sup> citosólico activan a la proteína quinasa C, lo cual desencadena la estimulación de una amplia red de señales. La importancia relativa de cada sistema de transducción por supuesto varía según el tipo de tejido y la respuesta en estudio.

### Aldosterona

Como ha sido dicho la Ang II promueve la liberación de aldosterona por las glándulas

suprarrenales. La corteza suprarrenal produce hormonas mineralo-corticoides, glucocorticoides y esteroides sexuales. De las primeras la principal es la aldosterona, que actúa principalmente en el epitelio de los túbulos renales, glándulas salivales y colon (Wilson y col., 1998). Su característica acción hormonal es de producir retención de sodio y excreción de potasio. Los mayores reguladores de la secreción de aldosterona son la Ang II, el ion  $K^+$  plasmático aumentado, y la ACTH (Oberleithner y col., 2004). En anillos vasculares con conservación de endotelio, la aldosterona atenúa rápidamente la vasoconstricción inducida por fenilefrina. El efecto de la aldosterona es potente, altamente específico y depende de la eNOs (Oxido Nítrico sintetasa endotelial). La activación de la eNOs mediada por la aldosterona es dependiente de la fosfatidil-3-inositol quinasa. O sea que la aldosterona modula la reactividad vascular.

### Vasopresina

La arginina vasopresina (AVP) es un nonapéptido sintetizado en el hipotálamo. En años anteriores se tuvo en cuenta su potente efecto vasoconstrictor, pero luego se vio que también aumentaba la permabilidad al agua en los tubos colectores del riñón, incrementando la reabsorción de la misma, razón por la cual también se la conoce como Hormona Antidiurética.

La secreción de vasopresina se produce en respuesta a la hiperosmolaridad o a la acción estimulante de la Ang II, que actúan en núcleos del hipotálamo que producen la hormona que luego se almacena en el lóbulo posterior de la hipófisis en cantidad suficiente como para mantener una liberación basal durante 30 a 60 días, o máxima durante 5 a 10 días. La deshidratación o la sobrecarga de sal estimulan la liberación de AVP, y si el estímulo es prolongado e intenso puede llevar al agotamiento de las reservas. La AVP tiene 3 receptores:  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  (también llamado receptor  $V_3$ ) y  $V_2$ . El gen del receptor  $V_{1a}$  – mediador de vasoconstricción e hipertrofia miocárdica – se expresa en los vasos sanguíneos de una amplia variedad de órganos y tejidos (células musculares lisas vasculares, plaquetas, linfocitos y monocitos, corteza suprarrenal y miocardio). Los receptores  $V_2$  se encuentran principalmente en las células de los tubos colectores renales, donde estimulan la translocación de la acuaporina-2 (proteína de los canales de agua celulares, que aumenta la permeabilidad de la membrana celular al agua) a la membrana apical. El receptor  $V_{1b}$  (o  $V_3$ ) modula la liberación de ACTH y de  $\beta$ -endorfina. Cabe señalar que la ACTH estimula la liberación de aldosterona (que puede provocar retención de sodio y reabsorción de agua) (Berne y col., 2004).

## Péptidos Natriuréticos

Los Péptidos Natriuréticos (PN) tienen importante participación en la regulación de funciones renales, humorales y cardiovasculares (De Bold y col., 1981; Kone, 2001; Vesely, 2007; Lisy y Burnett, 1999; Schirger y col., 1999).

### Tipos de PN

Los PN son de tres tipos:

- 1) El tipo A es el PNA (Péptido Natriurético Atrial), que es un polipéptido de 28 aminoácidos formando un anillo de 17 aminoácidos unidos por puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, con una extensión terminal carboxilo que le confiere la actividad biológica, fue descrito por De Bold en 1981 (De Bold y col., 1981). Es secretado como prohormona que luego da lugar al pro-PNA terminal amino (t-N) y al PNA activo. Posee propiedades natriuréticas, vasodilatadoras, inhibidoras de la renina, y supresoras del crecimiento.
- 2) El tipo B es el PNC (Péptido Natriurético Cerebral), que se origina en el miocardio, y es un polipéptido de 32 aminoácidos, formando un anillo similar al del PNA de 17 aminoácidos.
- 3) El tipo C es el PN-C (Péptido Natriurético tipo C); es producido por el endotelio, y presenta dos sub-tipos: C-53 y C-22 (de acuerdo al número de aminoácidos de cada uno), formando como en el caso de los anteriores un anillo de 17 aminoácidos, pero carece de la terminal carboxilo; los subtipos de PN-C también están presentes en el corazón, pero en cantidades muy bajas. Además de los anteriores se describió un cuarto tipo llamado urodilatina, y el quinto denominado Dendroaspis Natriuretic Peptide (DNP), de 38 aminoácidos, originalmente aislado del veneno de la serpiente Mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*), que se encuentra en el plasma y en las aurículas humanas, con efectos natriuréticos y vasodilatadores (en arterias coronarias) (Schirger y col., 1999).

Es muy importante la intervención de los PNs en el mantenimiento de la estabilidad circulatoria, actuando como factores antihipertensivos y reductores del volumen líquido. Los PNs provocan disminución del retorno venoso, y de allí disminución del volumen minuto. Inhiben la acción vasoconstrictora del sistema renina angiotensina, del sistema nervioso simpático y de la ET-1 y en el sistema nervioso central modulan el tono vasomotor, la sed y la liberación de vasopresina. Experimentalmente la supresión del PNA o de su receptor GC-A lleva a hipertensión crónica severa, mientras que la

expresión en exceso de uno o ambos de los dos produce una caída de presión arterial. La principal acción hipotensora del PNA incluye la vasodilatación; aumento de permeabilidad vascular; inhibición del sistema renina angiotensina por acciones directas sobre las células yuxtglomerulares; inhibición del tono simpático y estimulación de la función renal. El PN-C actúa como regulador del tono vascular y del crecimiento del músculo liso (Stingo y col., 1992).

## **Antecedentes acerca de la medición de la presión arterial en la rata**

La medición de la presión arterial en animales siempre ha sido de interés para los estudiosos de la fisiología cardiovascular; y precisamente el primer valor confiable de este parámetro fue obtenido por el inglés Stephen Hales en una yegua (Comroe, 1983), utilizando como manómetro un tubo de vidrio lleno con la propia sangre del animal. Posteriormente el propio Hales introdujo el manómetro de mercurio a partir de su aplicación en sus estudios de circulación de savia en las plantas. El mercurio, por su alta densidad, permite utilizar tubos de longitud más reducida, pero su aplicación estuvo limitada a animales de tamaño relativamente grande (gatos, perros, etc). La medición de la presión directa en ratas solamente fue posible al disponer de transductores de presión eléctricos que permitiesen movilizar en el procedimiento volúmenes pequeños de sangre (Cobbold, 1974; Geddes y Baker, 1975).

Cuando en 1934 Goldblatt demostró la posibilidad de producir hipertensión renal experimental en perros, lo cual implica poder controlar la presión en forma seriada, lo hizo utilizando un ingenioso método cruento. Para poder ocluir la arteria renal en forma controlada desarrolló un clamp a tornillo implantable quirúrgicamente y que se podía accionar a través de la piel del animal con anestesia local. Para contar con una medición directa de presión arterial construyó quirúrgicamente un "loop" con la arteria carótida, de manera que la misma transcurriera a pocos milímetros por debajo de la piel. En esa ubicación la arteria podía ser punzada con anestesia local y así se obtenía una medición directa de la presión arterial media con un manómetro de mercurio (Goldblatt y col., 1934; Goldblatt, 1937).

Dada la utilidad que significaba poder usar ratas para desarrollar hipertensión (costo más reducido, facilidad de albergue y manejo, etc), y siendo imposible o impráctico en ellas un control directo repetitivo, se hizo evidente la necesidad de contar con un



método indirecto tipo Riva-Rocci. La cola de la rata era el segmento corporal más obvio para ello, dado que cuenta con la arteria de la cola (continuación distal de la aorta) que la recorre ventralmente en toda su longitud (Olds y Olds, 1979).

En 1938 Byrom y Wilson describieron el primer método práctico (Byrom y Wilson, 1938), que usaba un manguito ocluser conectado a un manómetro de mercurio con el cual se puede interrumpir o readmitir a voluntad el flujo arterial. Para detectar su reaparición utilizaron un pletismógrafo de agua que permitía detectar la restauración del flujo a través del aumento de volumen producido en la cola. Aunque de la lectura del trabajo original puede inferirse que el método debía ser de difícil aplicación, se utilizó durante muchos años. De hecho, cuando Okamoto y Aoki en el año 1963 desarrollaron las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) midieron la presión en la cola con el método de Byrom y Wilson.

Con posterioridad a este trabajo hubo numerosas descripciones de otros métodos, en los cuales lo que difería era el sistema para la detección del pulso, ya que el diseño del manguito ocluser ha sufrido pocos cambios en el transcurso del tiempo.

## **Métodos de medición de presión más utilizados en la actualidad**

### 1) Indirectos

La detección del pulso se realiza fijando sobre la cola (en forma distal al manguito ocluser) un bulbo de goma lleno de aire y conectado a un diafragma sobre el cual está montado un cristal piezoeléctrico. Las vibraciones del bulbo se transmiten al cristal, el cual en respuesta genera una diferencia de potencial, que se registra generalmente en forma visual en una pantalla, y en forma simultánea se lee en un manómetro de mercurio el valor de la presión. La detección del pulso por medio de un fotodiodo (método fotoeléctrico), basándose en el cambio de densidad óptica al reiniciarse la circulación sanguínea, es menos usado (Hermansen, 1970; Ikeda y col., 1991; Lee y col., 2002; Palbøl y Henningsen, 1979). Los métodos indirectos permiten tomar solamente la presión sistólica.

### 2) Directos

Para medir la presión directa en la rata consciente se ha desarrollado un equipo que permite introducir un catéter en una arteria de gran calibre (carótida, aorta) y luego exteriorizarlo a través de la piel de la nuca y unirlo a un transductor de presión. Un

chaleco unido a un resorte flexible permiten que la rata se mueva libremente en la jaula, y un conector especial permite que la rata gire sin estrangular el catéter. Adecuadamente usado, este sistema permite registrar la presión por períodos bastante largos de tiempo (Rinaldi y Cingolani, 1994).

En forma más reciente, y debido a los avances en la miniaturización de la electrónica, se han desarrollado transductores de tamaño reducido que pueden ser implantados o sostenidos en una especie de mochila en la misma rata, y la señal de presión generada se transmite por radio a un receptor con el cual la rata no se encuentra físicamente unida, con lo cual las condiciones de medición serían ideales. No obstante, estos equipos necesitan siempre calibración contra un manómetro de mercurio antes y después del implante y son de manejo más engorroso, con lo cual no son aplicables a un número grande de ratas (Bazil y col., 1993; Brockway y col., 1991; Whitesall y col., 2004).

Si el catéter es de un diámetro suficientemente importante, los métodos directos permiten medir la presión sistólica y diastólica, y de lo contrario se puede registrar solamente la presión media.

## **Características del amaranto**

### **Antecedentes históricos**

El amaranto se cultiva en América desde hace 5000 a 7000 años, probablemente los primeros en utilizarlo como un cultivo altamente productivo fueron los Mayas, de quienes aprendieron posteriormente los Aztecas y los Incas (Segura-Nieto y col., 1994). El consumo de amaranto, huautli o kiwicha estaba muy arraigado entre los Aztecas. Se estima que cuando los españoles llegaron a América, los Aztecas producían de 15 a 20 mil toneladas por año (Schnetzler y Breene, 1994). Era considerado un alimento ritual, que se consumía en ceremonias religiosas; sus granos se los utilizaba en la elaboración de diversos alimentos como: atoles, tamales, pinoles y tortillas, y sus hojas eran consumidas como verdura. Con los granos de amaranto se preparaba una harina que se mezclaba con miel para formar una masa llamada tzoalli, con la que se elaboraban figuras e imágenes de deidades utilizadas en diferentes cultos (algunas contenían sangre de niños o adultos sacrificados). También modelaban imágenes con forma humana y al acabar la fiesta repartían las imágenes y las comían. Los españoles

asociaron estas costumbres con la ceremonia de la eucaristía del cristianismo y el consumo de figuras de tzoalli se prohibió y se persiguió a quienes lo seguían practicando. Este hecho, junto con la sustitución de cultivos nativos preferidos por los españoles, actuaron de manera conjunta para reducir el cultivo y consumo de amaranto (Kigel, 1994).

Afortunadamente el arraigo de las costumbres en los pueblos es muy fuerte y el consumo de este grano se mantuvo durante siglos gracias a la acción de pequeños agricultores que conservaron la tradición de su cultivo en menor escala.

Actualmente la mayoría de la población mundial se nutre de sólo una veintena de especies vegetales como: trigo, arroz, mijo, sorgo, maíz, papa, mandioca, poroto, maní, soja, caña de azúcar, etc. Con el objetivo de diversificar esta base alimentaria, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos realizó en la década de 1970 una investigación a fin de determinar los mejores cultivos para desarrollar y difundir. Así fueron seleccionados los 36 cultivos más prometedores del mundo entre los que se incluyó al amaranto (Schnetzler y Breene, 1994).

### **Generalidades**

El amaranto comenzó a atraer la atención de los investigadores en 1973, cuando se descubrió que su semilla posee 17,9% de proteína de una calidad inusual debido a su altísimo contenido del aminoácido esencial lisina (6,4 % de la proteína), del doble al triple con respecto al maíz, arroz y trigo (Downton, 1973). Según la Organización Mundial de la Salud, la proteína del amaranto es ideal para la dieta humana por su balance de aminoácidos (Kulakow y Hauptli, 1994).

El amaranto (*Amaranthus spp.*) es una planta de rápido crecimiento, con hojas anchas, tallos y flores moradas, rojas o doradas. Sus granos tienen un tamaño de 1 a 1,5 mm de diámetro y aparecen en grandes racimos. En griego su nombre significa “inmortal, que no se marchita” debido a que, a diferencia de otros cereales, cuando se cosechan sus semillas la planta no muere (Pantanelli, 2001).

**Tabla 1:** Clasificación del amaranto

Nombre común	Nombre científico	Clase	Subclase
Amaranto	<i>Amaranthus spp.</i>	Angiospermae	Dicotyledonae
Orden	Familia	Género	Especie
Centrospermale	Amarantaceae	<i>Amaranthus</i>	<i>Hypochondriacus</i> , <i>cruentus</i> , <i>caudatus</i> , <i>etc.</i>

El género *Amaranthus* (tabla 1) comprende plantas anuales o perennes de origen tropical, ampliamente distribuidas en todo el mundo, aún en regiones templadas. Cerca de 50 especies son nativas de América y otras 15 pueden ser encontradas en Europa, Asia, Africa y Australia (Kigel, 1994). Si bien existen varias especies, solo 3 de ellas son las más cultivadas: *A. hypochondriacus* (sinónimos: *leucocarpus*, *leucosperma* y *flavus*), originario de México, *A. cruentus* (sinónimo: *paniculatus*), oriundo de Guatemala y el Sudeste de México y *A. caudatus* (sinónimos: *edulis* y *mantegazzianus*) procedente de América del Sur (Schnetzler y Breene, 1994). Todas las especies pueden destinarse a usos múltiples, pero algunas son consideradas graníferas, hortícolas, tintóreas, medicinales, ornamentales; y otras son consideradas malezas, como *A. quitensis* que es muy común en la región pampeana (Pantanelli, 2001).

Es un cultivo altamente eficiente que puede prosperar en condiciones agroclimáticas adversas, tales como la sequía o altas temperaturas; y es un buen transformador de energía solar. Todo esto gracias a que posee un metabolismo  $C_4$ , mecanismo de fijación de  $CO_2$  que supera en eficiencia al resto de las plantas CAM y  $C_3$  (Bressani, 1994). Las plantas con metabolismo  $C_4$  llevan a cabo una modificación del proceso normal fotosintético que hace eficiente el uso del  $CO_2$  disponible en el aire concentrándolo en los cloroplastos de células especializadas. La pérdida por fotorespiración de  $CO_2$  es suprimida. Por lo tanto las plantas  $C_4$  pueden llevar a cabo una relación de conversión carbono atmosférico a carbohidratos por unidad de pérdida de agua más eficientemente que las plantas  $C_3$ . Aún cuando las plantas  $C_4$  mantienen sus estomas parcialmente cerrados, éstas son capaces de mantener relativamente altas tasas de fijación de  $CO_2$ .

El amaranto por ser un cultivo de ciclo corto, tolerante a la sequía, con un alto valor nutritivo y de múltiples usos y aplicaciones se considera como un cultivo de alternativa para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias y donde incluso se

presentan problemas de abasto de alimentos que dañan la salud poblacional (Kulakow y Hauptli, 1994).

### **Usos del amaranto**

El amaranto puede utilizarse en dos formas fundamentales: como vegetal cocido y como semilla. El uso como vegetal cocido es más característico de los países menos desarrollados de América del Sur y Central, África y Asia (Schnetzler y Breene, 1994). Por el contrario el uso como semilla ha sido el predominante en los países más desarrollados. Este uso dual ha dado lugar a la división de las diversas especies de amaranto en “vegetales” y de “semillas” a pesar de que no se puede hacer una clara distinción entre ellas.

Entre las comidas tradicionales preparadas con amaranto podemos mencionar: el popular dulce alegría preparado en México con semillas explotadas; los tamales y pinoles que se preparan con semillas cocidas, molidas y mezcladas; y el atole y la chicha preparados en México y Perú respectivamente, que son especies de cervezas preparadas a partir de las semillas fermentadas.

El uso de amaranto como semilla se encuentra restringido en la actualidad debido a que la escasa superficie cultivada y la producción limitada tienen como resultado un precio más alto que el de la mayoría de los cereales. Por lo tanto las semillas de amaranto no se encuentran comúnmente en las grandes cadenas de supermercados sino más bien en los comercios dedicados a la venta de alimentos saludables o dietéticos. Este tipo de comercio está dirigido por lo general a consumidores dispuestos a pagar un precio más elevado que el de los cereales comunes.

Las comidas a base de harinas de amaranto son mezcladas con harinas de trigo u otras para hacer cereales, crackers, bollos dulces, panes u otros productos cocidos. Los productos comerciales aparecen como productos de amaranto, pero en realidad lo contienen solamente entre un 10 y 15%. Muchos estudios muestran que el amaranto puede ser mezclado con 50 o 75 % de otras harinas, en productos cocidos sin modificar las propiedades funcionales o de sabor. La harina de la semilla de amaranto (producto de la molienda integral) carece de gluten, ésta particularidad la convierte en un alimento apto para la población celíaca. Entre los preparados comerciales existentes actualmente podemos mencionar: mezclas para hornear y harinas leudantes, cereales para el desayuno, snacks, productos horneados, comidas enlatadas y diversos tipos de pastas (Schnetzler y Breene, 1994).

El amaranto también tiene otros usos, por ejemplo: elaboración de cosméticos, colorantes, plásticos biodegradables (Kulakow y Hauptli, 1994) y como medio de cultivo para la producción de alfa amilasa por *Aspergillus Níger* (Mariani y col., 2000). El almidón de amaranto puede ser utilizado además de sus propiedades nutricionales como: espesante, humectante, para prevenir la cristalización del azúcar, como endulzante y para reemplazar grasas (Lopez y col., 1994).

Otro uso que tiene el concentrado proteico es en la producción de una bebida denominada “leche de amaranto”, debido a las características similares que tiene con la leche. Este producto sirve para personas que tienen intolerancia a la leche, así como para poblaciones infantiles y de bajos recursos debido a su alto valor nutricional (Schnetzler y Breene, 1994).

Con las hojas de amaranto se ha elaborado una bebida de fibra dietética y laxante.

El aceite de amaranto, rico en escualeno, es utilizado en la industria cosmética y farmacéutica (Becker, 1994).

### **Consumo mundial**

En las últimas décadas el cultivo de amaranto se ha difundido de manera exponencial en varios países del mundo, particularmente en el lejano oriente. Aunque el amaranto llegó a China hace más de 100 años, el impulso que el gobierno Chino le ha dado en los últimos años lo ha convertido en un cultivo invaluable. Actualmente los chinos consumen gran cantidad de hojas de amaranto, preparan fideos, dulces con las semillas, utilizan el colorante para salsas y recientemente se ha explotado como forraje para cerdos, pollos, patos, conejos, caballos y peces con excelentes resultados. Se considera que China es actualmente el país en donde se cultiva la mayor extensión de amaranto, y actualmente los chinos cuentan con una importante colección de germoplasma de variedades de amaranto (Becerra, 2000).

India es uno de los países que ha adoptado el amaranto más decididamente. La gran cantidad y variedad de platillos preparados con semillas y con hojas de amaranto que se encuentran en la comida hindú, nos demuestran el arraigo que éste tiene entre la población. Hoy día, India es uno de los principales productores de amaranto en el mundo y se ha convertido en un centro secundario de diversificación. En el National Bureau of Plant Genetic Resources, en Shimla, se encuentra el segundo banco de germoplasma de amaranto más importante del mundo.

En EEUU el interés por el amaranto se incrementó a mediados de la década de los 70 con la creación de la Fundación y el Centro de Investigación Rodale, ambos fundados por Robert Rodale. Aunque la superficie sembrada no alcanzó grandes dimensiones, estabilizándose en cerca de 500 hectáreas, el interés por el producto ha ido en aumento y actualmente EEUU comparte con Japón la vanguardia en la investigación agronómica y en el desarrollo de nuevas tecnologías para el uso del grano en productos novedosos. En Iowa, en el North Central Regional Plant Introduction Station, se encuentra la colección de germoplasma de amaranto más grande del mundo, con más de 3400 registros de variedades provenientes de todas las latitudes.

La producción de amaranto en Perú es una tradición milenaria que decayó durante siglos. Sin embargo, los avances agronómicos en este país han sido muy importantes, contando con dos de las colecciones de germoplasma más importantes del mundo y es el país donde se han alcanzado los mayores rendimientos. En algunos ensayos experimentales se obtuvieron incluso rendimientos muy superiores al promedio mundial que ronda los 1000 a 3000 por hectárea (Becerra, 2000).

En México, su región de origen, el cultivo tomó nuevo impulso en la década de los 80, pero a partir de los 90 se encuentra en retroceso, con superficies inferiores a las 900 hectáreas. El futuro del amaranto en México es aún incierto. Algunas industrias nacionales empiezan a interesarse en comprar las nuevas tecnologías para la elaboración de productos de amaranto, pero la producción en el país no alcanza los niveles suficientes para impulsar una industrialización a gran escala.

Respecto al comercio mundial, no existen datos oficiales de exportaciones, importaciones ni de preferencias arancelarias, debido a que éste grano carece de posición arancelaria propia (Pantanelli, 2001).

### **Potencial productivo en la Argentina**

Dado su alto precio internacional y la relativa facilidad de su producción, el amaranto se presenta como una buena alternativa de cultivo estival en nuestro país, especialmente en suelos pobres que no pueden ingresar al complejo sojero.

Según el Código Alimentario Argentino, se entiende por amaranto a las semillas sanas, limpias y bien conservadas de las siguientes especies: *A. cruentus*, *A. hypochondryacus* y *A. caudatus*. Los granos de amaranto que respondan a las especies mencionadas, serán de color blanco, ámbar pálido, amarillo o castaño muy pálido, opacas o traslúcidas. Deberá contener 12,5% mínimo de proteína, 12% máximo

de humedad, 3,5% máximo de cenizas, 60% mínimo de almidón y un peso hectolítrico mínimo de 77 (Pantanelli, 2001).

En nuestro país el centro de investigación de amaranto se ubica en la Universidad Nacional de La Pampa, que en conjunto con el INTA Anguil puso en marcha el proyecto Amaranto, cuyo objetivo es estudiar las posibilidades de desarrollo en la zona. El grupo publica un boletín llamado "Amaranto" y realizó investigaciones que fueron presentadas en eventos nacionales e internacionales.

El área potencial de cultivo en nuestro país comprende las provincias de Jujuy, Santiago del Estero, Córdoba, el este de la Pampa y el oeste de Buenos Aires.

El cultivo comercial del amaranto en nuestro país es muy pequeño: ocupa aproximadamente 100 hectáreas anuales. La siembra se realiza en forma esporádica y con compromiso de compra previa, generalmente coordinado por la exportación (Pantanelli, 2001).

La comercialización es muy difícil debido a la falta de consumo masivo y la ausencia de un mercado referencial.

### **Características del amaranto utilizado como verdura**

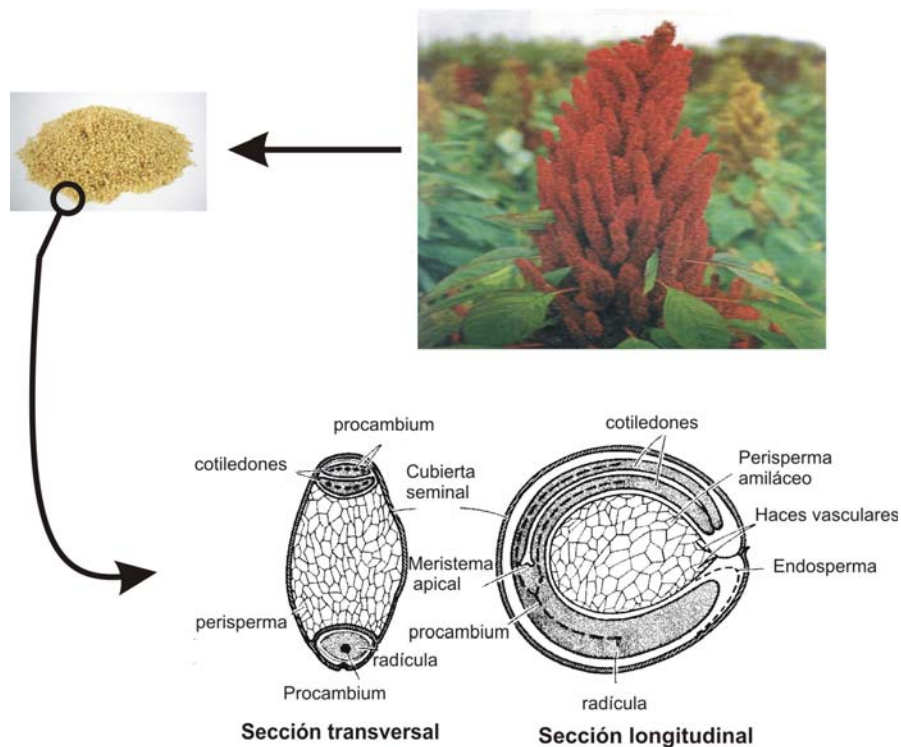
Las especies productoras de verdura (*A. tricolor*, *A. vidris*, *A. blitum*) poseen características similares a la espinaca, como plantas jóvenes de tallos blandos y hojas anchas, y plantas maduras con pequeñas inflorescencias y escasa producción de semillas. Son generalmente malezas, plantas no cultivadas que dedican gran parte de su energía a la producción de follaje, son de menor tamaño que las cultivadas y presentan flores y frutos más pequeños y de color oscuro. Las hojas poseen un alto contenido proteico (28-49%), ácido linoleico (45%), fibra (11-23%) y minerales tales como potasio, hierro, magnesio y calcio (Silva-Sánchez y col., 2008). La proteína tiene alto contenido de aminoácidos tales como el ácido aspártico, glicina, lisina y ácido glutámico.

El cultivo de amaranto para verdura requiere mayor humedad, ya que se ha observado que bajo condiciones de estrés hídrico las hojas contienen altos niveles de oxalatos y nitratos que pueden tener efectos adversos para la nutrición humana. No obstante, al hervir las hojas la concentración de estos compuestos disminuye.



### Características de las semillas de amaranto

Las semillas de amaranto son clasificadas como un pseudocereal, no son consideradas un verdadero cereal debido a que son dicotiledóneas y no monocotiledóneas como en el caso de los cereales (Schnetzler y Breene, 1994). Las especies productoras de semillas ( $10^4$  a  $10^6$  semillas por planta en condiciones óptimas) presentan inflorescencias terminales bien desarrolladas. Se presentan de colores que van del crema al negro, tienen forma lenticular y miden entre 1 y 1,5 mm de diámetro. Mediante microscopía electrónica se ha estudiado la morfología del grano de *A. cruentus* el cual se puede observar en la Figura 15 (Becker, 1994).



**Figura 15:** En la parte superior se observa una plata de amaranto y a su izquierda granos obtenidos de la misma. En la parte inferior se muestra el detalle ampliado de un corte longitudinal y transversal de una semilla de amaranto mostrando las partes que la componen (Becker, 1994).

La Figura 15 muestra al embrión que rodea en un plano al perisperma, tejido de reserva que, a diferencia del endosperma, deriva de células diploides. El embrión se encuentra formado por la radícula y dos cotiledones, teniendo bien diferenciado el meristema apical de la raíz. Como sucede en la mayoría de la dicotiledóneas, el embrión utiliza, durante el desarrollo, la mayor parte de las reservas del endosperma el cual queda reducido a una capa unicelular en muchos lugares encontrándose en mayor espesor en los extremos de radícula y cotiledones. El grano se encuentra rodeado por una cubierta firmemente adherida al endosperma y al perisperma.

Los nutrientes de reserva están, en su mayoría, depositados en estructuras celulares discretas e incluyen lípidos, proteínas, carbohidratos, fosfato orgánico y varios compuestos inorgánicos. Las reservas no están ubicadas uniformemente a través de todos los tejidos. El embrión ocupa gran parte del grano conformando así una buena fuente de lípidos y proteínas.

En la tabla 2 se observa un resumen de la composición química de las semillas de *A. hypochondriacus* y otros granos de uso común (Segura-Nieto y col., 1994).

**Tabla 2:**

Análisis <sup>a</sup>	<i>A.hypochondriacus</i>	Maíz	Arroz	Trigo
Humedad	11,1	13,8	11,7	12,5
Proteína cruda	17,9 <sup>b</sup>	10,3 <sup>c</sup>	8,5 <sup>c</sup>	14,0 <sup>d</sup>
Lípidos	7,7	4,5	2,1	2,1
Fibra	2,2	2,3	0,9	2,6
Cenizas	4,1	1,4	1,4	1,9
Carbohidratos	57,0	67,7	75,4	66,9

<sup>a</sup>(% calculado en base al peso seco); <sup>b</sup> N x 5,85; <sup>c</sup> N x 6,25; <sup>d</sup> N x 5,7.

El contenido de **proteína** en el amaranto está entre 14 y 19%, esta gran variabilidad depende de la composición genética aunque no pueden descartarse como posibles influencias las condiciones ambientales y las prácticas culturales. Su importancia no radica solo en la cantidad sino en la calidad de la proteína, ya que presenta un excelente balance de aminoácidos (aa). Tiene un contenido importante de lisina (3,2 a 6,4 %), aa esencial en la alimentación humana y que comunmente es limitante en otros cereales. También tiene un alto contenido de triptófano y aa azufrados (2,6 a 5,5 %), en el caso de éstos últimos es superior al de las legumbres más importantes (1,4 %) como poroto, mani y soja (Scilingo y col., 2002). El aa más deficiente es la leucina (patrón FAO), también son limitantes los aa valina e isoleucina; pero esto no se considera un problema porque los mismos se encuentran en exceso en los cereales más comunes (Zheleznov y col., 1997). La composición aminoacídica de las proteínas de amaranto no presenta gran variabilidad entre especies (Bressani, 1994).

Mediante el proceso de extrusión-cocción en *A. cruentus* y *A. caudatus* se obtiene una calidad nutricional proteica comparable con la caseína. El grano de amaranto extrudido tiene mejor valor nutricional que el amaranto sin extrudir y el producto no necesita una cocción adicional antes de consumirlo (Chavez-Jáuregui y col., 2000).

Las proteínas de las semillas de amaranto pueden clasificarse, según su solubilidad, en las llamadas “fracciones de Osborne”: albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas concentradas; glutelinas, solubles en soluciones ácidas o básicas; y prolaminas, solubles en etanol 50-80% (Osborne, 1924). De éstas, las más abundantes en el amaranto son albúminas, globulinas y glutelinas. Las dos últimas se encuentran localizadas en el embrión y en el endosperma y son las principales proteínas de reserva del grano. La fracción globulinas, está principalmente constituida por cantidades semejantes de globulina 11S (Segura-Nieto y col., 1994; Chen y Paredes-López, 1997; Martínez y col., 1997) y globulina-P; en mucha menor proporción se encuentra una globulina 7S (Barba de la Rosa y col., 1992; Martínez y col., 1997).

El contenido de **lípidos** es otro componente de mucho interés en el grano de amaranto, ya que representa un alto contenido de energía. Su valor está entre 5,1 % para *A. tricolor* y 7,7 % para *A. cruentus*. De este total 90 a 93 % son lípidos libres (en su mayoría triglicéridos); y el resto fosfolípidos (5%) y glicolípidos (2,6 %) (Becker, 1994). Los ácidos grasos están constituidos principalmente por ácido palmítico (19,1-23,4%), ácido oleico (18,7-38,9%) y ácido linoleico (36,7-55,9%); los restantes ácidos grasos se encuentran en porcentajes menores al 3 %. Estudios recientes han encontrado un contenido relativamente alto de escualeno entre 3,6% para *A. hypochondriacus* y 6,1% para *A. tricolor* (He y col., 2002). El escualeno es un excelente aceite para la piel, lubricante y precursor del colesterol que se obtiene comunmente del hígado de animales como la ballena y el tiburón (Becker, 1994; Martirosyan y col., 2007). Shin y col demostraron que el escualeno de amaranto reduce el nivel de lípidos y colesterol en ratas alimentadas con dieta rica en colesterol (Shin y col., 2004).

En cuanto a los **hidratos de carbono**, el almidón es el más importante dentro de las diversas especies de amaranto, ya que si bien las mismas contienen otros carbohidratos de menor peso molecular, éstos se encuentran en cantidades mínimas (López y col., 1994).

Al igual que los cereales el amaranto contiene cantidades importantes de almidón (50 a 60% de su peso seco), con la diferencia de que éste se encuentra almacenado en los plástidos de las células del perisperma, no encontrándose almidón en el embrión, ni en el endosperma como en el caso de los cereales (Schnetzler y Breene, 1994). Contribuye a la textura, estructura y consistencia de los alimentos, además de ser una buena fuente energética.

El almidón de amaranto posee gránulos de tamaño muy pequeño, con un diámetro entre 1 a 3  $\mu\text{m}$  (aproximadamente un décimo del tamaño del almidón del maíz). Estas reducidas dimensiones del gránulo de almidón facilitan su digestión, que resulta de 2,4 a 5 veces más rápida que el almidón de maíz (Schnetzler y Breene, 1994). A su vez, este tamaño hace que el gránulo tenga un alto poder de hinchamiento, baja solubilidad, una gran capacidad de unirse con el agua y una baja susceptibilidad a la alfa amilasa (Lopez y col., 1994). Los gránulos de almidón poseen además de carbohidratos pequeñas cantidades de lípidos, proteínas y minerales, los cuales pueden influenciar las propiedades funcionales del almidón. El almidón de amaranto posee niveles más elevados de cenizas, proteínas y lípidos que los almidones provenientes de la papa, trigo o maíz. Entre las especies de amaranto el *A. hypochondriacus* posee el nivel de lípidos más elevado en el gránulo de almidón, lo cual le da propiedades funcionales especiales. El almidón de amaranto es de tipo “waxy” debido al alto contenido de amilopectina. Esta característica le confiere aplicaciones útiles y únicas, como la alta viscosidad y gelatinización a temperaturas elevadas (López y col., 1994).

## **Péptidos bioactivos**

Es sabido que en el organismo existen péptidos endógenos con actividad endócrina y neurotransmisora; pero en los últimos 20 años hay evidencia experimental que indica que las proteínas alimentarias también pueden ser una fuente de péptidos bioactivos. Los mismos son liberados por proteólisis en el tracto gastrointestinal, y pueden ejercer en el organismo un efecto favorable y totalmente separado del efecto nutricional. Se han aislado diversos péptidos con actividades muy variadas: antimicrobiana (Lipkin y col., 2005), opioide, quelante, hipocolesterolémica (Guzman-Maldonado y Paredes-López, 1998), antitrombótica, antioxidativa y antihipertensiva. Esta última se manifiesta a través de la inhibición de la ECA. Algunos de éstos péptidos, incluso, pueden ejercer más de un efecto simultáneamente (Meisel, 2004).

Los péptidos bioactivos que derivan de alimentos son por lo general pequeños, con una longitud de 2 a 9 residuos. Los precursores más frecuentes son las proteínas de leche bovina y sus derivados, pero se han identificado péptidos también en otras fuentes: huevo, pescado (Kohama y col., 1991; Yokoyama y col., 1992), arroz, trigo, girasol, algas marinas (Suetsuna y col., 2004), soja (Wu y Ding, 2001; Miguel y Aleixandre,

2006; Wu y Ding, 2002; Megías y col., 2004) y amaranto. En este último se encuentran péptidos como lunasina con actividad preventiva del cáncer que fue demostrado en modelos biológicos, y péptidos con distintas actividades como: antihipertensiva, inhibidor de proteasa, opioide, inmuno moduladora, antitrombótica, antioxidante, etc (Silva-Sánchez y col., 2008). En particular, se ha demostrado que péptidos inhibidores de la ECA aislados a partir de soja (Wu y Ding, 2001; Yang y col., 2004), del alga marina *Undaria pinnatifida* (wakame) (Suetsuna y col., 2004) o de hidrolizados de clara de huevo (Miguel y col., 2005 y 2006) son capaces de disminuir los valores de presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Vermeirssen y col., 2004). Estos efectos se observaron tanto en administraciones agudas de los péptidos como en la ingesta crónica de alimentos suplementados con los mismos. En humanos se vio que los péptidos presentes en leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*, produjeron disminuciones significativas de los valores de presión arterial de pacientes ancianos hipertensos (Hata y col., 1996), y que la ingestión crónica de wakame también tuvo efectos hipotensores (Nakano y col., 1998). A partir de 1999 se dispone de una base de datos de péptidos bioactivos con más de 1500 entradas, la mayoría de ellos con propiedades inhibitoras de ECA (Dziuba y col., 1999).

En cuanto a los mecanismos que permiten liberar péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias, se han identificado 3:

- Por acción hidrolítica de las enzimas gastrointestinales: es la que ocurre naturalmente en el proceso de digestión de los alimentos y se produce en forma rutinaria. Si bien su importancia fisiológica no se conoce claramente, diversos estudios epidemiológicos muestran que las poblaciones con mayor consumo de soja (un conocido precursor de péptidos bioactivos) tienen menores tasas de mortalidad debido a enfermedades oncológicas (Nagata y col., 2002; Wu y Ding, 2002).
- Mediante hidrólisis a partir de microorganismos (fermentaciones): en la producción principalmente de derivados lácteos, la fermentación produce liberación de péptidos bioactivos sobre todo en las leches fermentadas, yogures y quesos. Dichos péptidos son mayoritariamente inhibidores de ECA (Korhonen y Pihlanto, 2006)
- A través de la hidrólisis enzimática *in vitro* utilizando diversas proteasas: este es el procedimiento más utilizado para obtener péptidos con actividad fisiológica a escala de laboratorio. Se han utilizado enzimas de origen vegetal (papaína o bromelina),

animal (tripsina o pepsina) y microbiano (alcalasa, proteinasa P<sub>4</sub>). Estas enzimas pueden usarse solas o en combinación para lograr una mayor degradación proteolítica (Morris Quevedo y col., 2001).

Algunos péptidos bioactivos no necesitan ser absorbidos por el intestino y pasar a la circulación, como por ejemplo los péptidos anorexígenos o los que modulan la inmunidad en mucosas. Sin embargo en el caso de péptidos inhibidores de ECA los mismos deben poder atravesar la barrera intestinal y llegar a la circulación sistémica sin ser degradados. Para eso deben resistir la acción de las enzimas proteolíticas del estómago (pepsina) y el bajo pH del jugo gástrico, de las enzimas proteolíticas pancreáticas y de las proteasas presentes en el epitelio intestinal (secretadas a la luz e intracelulares). Para estudiar si los péptidos inhibidores de ECA resisten a estas enzimas se los somete a una digestión *in vitro* utilizando secuencialmente pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina y pancreatina. El hecho de someter a los hidrolizados proteicos a esta digestión simulada no afecta su valor de EC<sub>50</sub>, e incluso puede incrementarlo (Matsui y col., 1999). Muchos de los péptidos con actividad inhibidora de ECA son muy resistentes a la digestión, atribuyéndose esto a la presencia de un residuo de prolina en su extremo C-terminal (Vermeirssen y col., 2004).

Los di y tri péptidos pueden absorberse por el epitelio intestinal mediante el transportador PepT<sub>1</sub>, incluso en forma más rápida que los aminoácidos libres. Dentro del enterocito los péptidos suelen ser hidrolizados por peptidasas intracelulares. El concepto de que haya cantidades significativas de pequeños péptidos que puedan escapar de la digestión e ingresar a la circulación intactos es bastante nuevo pero está ganando aceptación. Además del transportador mencionado los péptidos pueden ser absorbidos intactos de otras maneras:

- En forma paracelular
- Por difusión pasiva en el caso de los péptidos que sean suficientemente liposolubles
- En forma transcelular

No se conoce la proporción relativa que ocupan estos tres mecanismos pero se asume que en última instancia la estructura de cada péptido determinará la ruta preferida de transporte (Vermeirssen y col., 2004).

La ingesta de diversos alimentos influye sobre las rutas de absorción ya que si se saturan las peptidasas extra e intracelulares con un exceso de péptidos se favorece el transporte de péptidos intactos (Matsui y col., 2002).

La hidrólisis enzimática de proteínas consiste en degradar las mismas hasta péptidos y/o aminoácidos mediante enzimas proteolíticas. En este proceso los enlaces amida entre residuos de aminoácidos se clivan y agregando una molécula de agua se liberan los péptidos o aminoácidos. Ya vimos que las proteasas pueden clasificarse según su origen en animales, vegetales ó microbianas. Por su modo de acción catalítica pueden clasificarse en endo o exo proteasas. Las primeras destruyen enlaces peptídicos internos de las proteínas, mientras que las exo proteasas remueven aminoácidos desde el extremo C-terminal (carboxipeptidasas) o desde el extremo N-terminal (aminopeptidasas). Las proteasas también pueden clasificarse por la naturaleza de su sitio catalítico dependiendo del grupo activo que formará el intermediario covalente enzima-sustrato. Ese grupo activo puede ser un aminoácido (serina, cisteína ó ácido aspártico) o bien un grupo metálico, usualmente zinc. Dependiendo de la naturaleza del grupo activo de las proteasas, las mismas serán más efectivas en medios alcalinos, neutros ó ácidos (Rao y col., 1998).

Para la unión del sustrato a la enzima también son importantes los aminoácidos presentes en la vecindad del sitio catalítico, determinando de esta forma la especificidad enzimática.

Una vez elegida la enzima y el sustrato se deben definir las principales variables del proceso de hidrólisis: la temperatura, el pH, la relación enzima-sustrato y el tiempo de reacción. Los tres primeros determinan la velocidad de reacción, mientras el tiempo de reacción solo tiene efecto en la extensión de la hidrólisis (Adler-Nissen, 1986). Si el proceso de hidrólisis no fuera controlado, el pH de la solución cambiaría por la formación de nuevos grupos amino y carboxilo que son capaces de tomar o aceptar protones del medio en forma pH dependiente. Para evitar esto la reacción se lleva a cabo en un buffer que tenga la suficiente capacidad reguladora o controlando el pH en línea (Adler-Nissen, 1986).

El parámetro que se usa más habitualmente para describir el resultado de una proteólisis es el grado de hidrólisis (GH), que se usa para medir la extensión de la misma. Otro parámetro importante es la distribución de pesos moleculares de los péptidos en el hidrolizado producido. El GH se calcula como la relación porcentual entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados ( $h$ ) y el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína ( $h_{tot}$ ).

$$\text{GH (\%)} = h/h_{tot} \cdot 100$$

Como se ha visto hasta ahora, se ha identificado la producción de péptidos bioactivos que producen disminución de la presión arterial a partir de proteínas de alimentos muy diversos. Con respecto al amaranto, en estudios realizados en el área de Bioquímica de Moléculas del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I), se demostró que las proteínas de *Amaranthus hypochondriacus* L. conocidas como albúmina-I y globulina al ser hidrolizadas por la enzima alcalasa durante 18 y 15 horas respectivamente, tienen capacidad de inhibir a la ECA, debido a la liberación de oligopéptidos de 3 aminoácidos de la globulina y de 4 a 5 aminoácidos de la albúmina. La  $EC_{50}$  (concentración de péptidos necesaria para inhibir el 50% de la actividad de ECA) fue de  $0,35 \pm 0,02$  mg/ml para la fracción de péptidos de albúmina-1 y  $0,15 \pm 0,03$  mg/ml para la fracción de péptidos de globulina. Por lo tanto estos péptidos pueden ser útiles en el diseño de alimentos funcionales para ayudar en la prevención y tratamiento de la hipertensión (Tovar-Pérez y col., 2009). A nivel local estudios realizados en el CIDCA por el Licenciado Bruno Vecchi han demostrado *in-vitro* una actividad inhibidora de la ECA por parte de péptidos derivados del amaranto (Vecchi y Añón, 2009). Sin embargo en búsquedas bibliográficas no hemos encontrado ninguna referencia que documente esta posibilidad *in-vivo*.



## 1) Desarrollo del sistema de toma de presión y de adquisición de datos

Los principales objetivos a alcanzar fueron los siguientes:

- a) Estudio de las condiciones óptimas para la toma de presión, sobre todo temperatura e inmovilización del animal.
- b) Sistemas especiales para controlar la presión en el manguito ocluidor de flujo.
- c) Adaptación del sistema de adquisición para la toma y procesamiento de las señales de presión.
- d) Toma de presión por métodos directos, utilizando catéteres flexibles, implantados mediante un equipamiento que permita el libre movimiento del animal.
- e) Evaluación y comparación de sistemas menos convencionales de detección del pulso arterial, como el fotoeléctrico.

### a- Estudio de las condiciones óptimas para la toma de presión, sobre todo temperatura e inmovilización del animal

Temperatura: Para una adecuada toma de presión es imprescindible una correcta visualización del pulso de la arteria de la cola. Esta arteria corre por un surco delimitado por tendones en la cara ventral de la cola, y se la considera importante en la rata como órgano termorregulador (Rowberg y col., 1969). Es necesario el calentamiento de la rata para provocar una adecuada dilatación de esta arteria y así percibir bien el pulso.

Tradicionalmente se utilizaba en nuestro medio una incubadora calefaccionada con lámparas eléctricas de alta potencia en la cual se colocaban entre 5 y 10 ratas a las cuales se les tomaba la presión después de un cierto tiempo de calentamiento. Este método presentaba la desventaja de la posibilidad de muerte de los animales por hipertermia si se colocaban demasiado cerca de la fuente de calor.

Nosotros propusimos utilizar una incubadora calefaccionada por aire caliente y con control termostático de la temperatura en su interior.

Inmovilización: Para inmovilizar las ratas se han utilizado distintas técnicas consistentes por lo general en envolver al animal de alguna forma (bolsa de tela, paño enrollado, etc.) para evitar sus movimientos y los de la cola durante la toma de presión dado que

los mismos interfieren con la onda de pulso y la deforman. Estos métodos tienen la desventaja de la posibilidad de mordeduras si el animal logra liberarse parcialmente. Existen también inmovilizadores fabricados con diversos materiales que permiten contener a la rata una vez que es colocada en su interior. Si bien son muy efectivos en cuanto a la contención del animal, tienen la desventaja de no adaptarse con facilidad a distintos tamaños de ratas (Amado Cattaneo y col., 1986).

Nosotros propusimos la construcción de un inmovilizador de acrílico que permitiera la fácil adaptación a diferentes tamaños de animales.

### **b- Sistemas especiales para controlar la presión en el manguito oclisor de flujo**

Habitualmente la presión en el manguito oclisor se eleva por medio de una pera manual hasta alcanzar un valor superior al de la presión sistólica, y luego mediante la apertura parcial de un robinete se va descendiendo paulatinamente la presión hasta que la misma es superada por la presión sanguínea y en este momento reaparece el pulso. Este método presenta la desventaja de que la presión en el manguito se eleva de forma intermitente, y habitualmente molesta al animal y dificulta su inmovilización. Además suele introducir artefactos en un tipo de registro de pulso como el que explicaremos más adelante.

En lugar de utilizar el método tradicional, nosotros propusimos recurrir al inflado y desinflado contínuos del manguito recurriendo a un cilindro de reserva de aire comprimido y a un sistema de válvulas que permite el desvío del aire hacia adentro y hacia afuera del mismo.

### **c- Adaptación del sistema de adquisición para la toma y procesamiento de las señales de presión**

A partir del uso generalizado de computadoras surgió la conveniencia de que las señales amplificadas de los transductores pudiesen ser directamente adquiridas por las mismas, pero como éstas “entienden” solamente un lenguaje digital formado por ceros y unos, era necesario convertir previamente un tipo de señal en otro. Así surgieron los circuitos conversores analógico-digitales, que están montados sobre una plaqueta que a su vez es compatible con los formatos más comunes de PC. También es posible producir señales analógicas a partir de valores digitales almacenados, en lo que se llama la conversión digital-analógica. Es evidente que ésta es una forma mucho más conveniente de adquisición de datos, ya que se puede ver “on line” en el monitor sin

consumir papel de registro, y además es muchísimo más flexible y rápido el almacenamiento, copia y transmisión de los datos en formato digital. Nosotros nos propusimos adaptar un sistema de este tipo para la medición de la presión indirecta y directa en ratas.

**d- Toma de presión por métodos directos, utilizando catéteres flexibles, implantados mediante un equipamiento que permita el libre movimiento del animal.**

La toma de presión por métodos directos requiere la inserción de un catéter en la carótida izquierda porque a través de la misma se puede alcanzar con la punta del catéter la aorta descendente, haciendo menos probable la formación de coágulos por el flujo elevado que existe en este vaso (Acland, 1989; Popovic y Popovic, 1960). La toma de presión directa puede hacerse en ratas anestesiadas o conscientes, y en este último caso es necesario utilizar algún medio para impedir que la rata muerda los catéteres y además permitir la libre movilidad del animal dentro de su jaula (Rinaldi y Cingolani, 1994).

Uno de los problemas que presenta la medición directa es la amortiguación de la señal debido al pequeño diámetro del catéter, razón por la cual es necesario efectuar comparaciones con señales adquiridas a través de cánulas rígidas y de gran diámetro y colocadas en un vaso de gran calibre como es la aorta.

**e- Evaluación y comparación de sistemas menos convencionales de detección del pulso arterial, como el fotoeléctrico.**

Para comparar entre distintos métodos de detección del pulso se usará una célula fotoeléctrica (Lee y col., 2002) para comparar su señal con la que emite el detector piezoeléctrico que habitualmente se usa.

**2) Estudio del posible efecto hipotensor de hidrolizados proteicos de amaranto en modelos animales de hipertensión arterial**

Con este objeto se propusieron los siguientes esquemas experimentales:

a- Se ha demostrado que el colesterol tanto ingerido en la dieta como puesto en contacto directo con vasos sanguíneos *in-vitro* aumenta la reactividad vascular a

diversos agonistas (Slowing y col., 2001; O'Rourke y Docherty, 1998; Ghatta Ramarao, 2004; Yang y col., 1998; Wilfert y col., 2000). Por lo tanto supusimos que la alimentación de ratas con dieta rica en colesterol podía elevarles la presión arterial y proporcionar un medio de evaluar el eventual efecto hipotensor del amaranto y estudiar la reactividad vascular a diversos agonistas, medida en la arteria de la cola de la rata y en aorta al final del experimento.

b- Ratas genéticamente hipertensas (SHR) y su control normotenso: este modelo se considera como el más similar a la hipertensión esencial en el ser humano (Okamoto y Aoki, 1963).

c- Ratas hipertensas por constricción de una o ambas arterias renales con o sin extirpación de un riñón (Amado Cattaneo y col., 1986).

d- Hipertensión por administración de Fructosa: Se ha descrito que la administración de fructosa produce en las ratas un cuadro parecido al denominado "síndrome metabólico" en humanos, caracterizado entre otras cosas por elevación moderada de la presión arterial, dislipidemia y obesidad (Storlien y col., 1988 y 1991; Harris y Kor, 1992; Lombardo y col., 1996).

Para administrar los hidrolizados de amaranto nos propusimos recurrir en primer lugar a la sonda orogástrica y abre boca metálico (Alvarez y col., 2002); y para controlar la presión arterial al método indirecto en la cola de la rata. No obstante, y para el caso que este procedimiento produjese mucha agitación en el animal, dejamos abierta la posibilidad de recurrir a la administración de hidrolizado por una sonda intragástrica permanente; y a la toma de presión arterial en forma directa por cateterización carotídea en ratas conscientes (y en algunos casos toma de presión por método indirecto).

Nuestra hipótesis fue que los hidrolizados proteicos de amaranto administrados por vía digestiva iban a liberar péptidos con actividad biológica inhibidora de la enzima convertora de angiotensina. Dichos péptidos una vez absorbidos podían producir un descenso de la presión arterial, y nosotros propusimos adaptar un sistema de adquisición de datos a fin de mejorar las técnicas de medida y hacer que el efecto hipotensor fuese más fácilmente detectable.

Si bien los diferentes métodos utilizados se reúnen todos en esta sección, hay que aclarar que los que se describen a continuación con los números 1 a 4 fueron utilizados principalmente para la parte de la tesis relacionada con metodología de toma de la presión arterial; mientras que los numerados desde 5 a 11 fueron utilizados para determinar los efectos cardiovasculares de los hidrolizados de amaranto.

## **1- Medición de presión arterial en ratas por método indirecto**

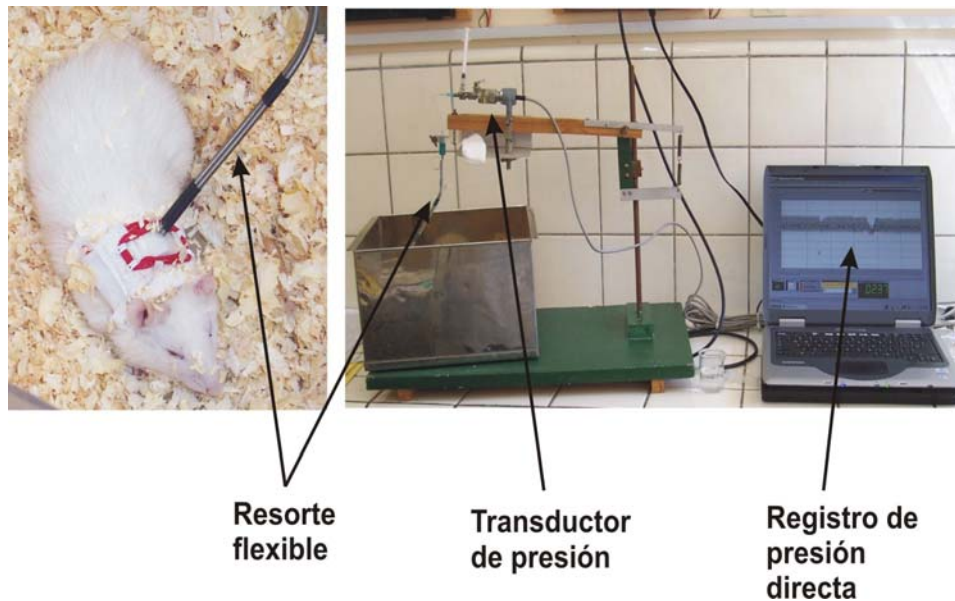
Al comenzar nuestro trabajo disponíamos del equipo que tradicionalmente se había usado en nuestro medio: transductor de pulso piezoeléctrico marca NARCO BIOSYSTEMS (Houston, Texas, USA) y fotoeléctrico marca GRASS INSTRUMENTS (Providence, Rhode Island, USA), manómetro de mercurio adaptado a partir de un modelo para toma de presión en humanos, manguito para compresión de la cola inflado manualmente con una pera de goma, y un osciloscopio para visualizar la señal del transductor de pulso. Previo a la toma de presión arterial las ratas se calentaban en una incubadora de vidrio calefaccionada con 4 lámparas de 150 watts cada una.

## **2- Medición de presión arterial en ratas por método directo**

Para medir presión intravascular directa disponíamos de transductores de presión (Cobbold, 1974; Geddes y Baker, 1975) marca STATHAM modelos Gb y Db (Hato Rey, Puerto Rico), conjuntos de resortes flexibles y chalecos para mantener los catéteres in situ por largos períodos en ratas conscientes (ALICE KING CHATHAM MEDICAL ARTS, Chatsworth, California, USA), catéteres intravasculares de Tygon y Teflón (SMALL PARTS INC, Florida, USA). Para este procedimiento disponíamos de una mesa de operaciones para pequeños animales, con un manto termostatzado, y un equipo completo de instrumentos quirúrgicos acordes al tamaño del animal (Acland, 1989).

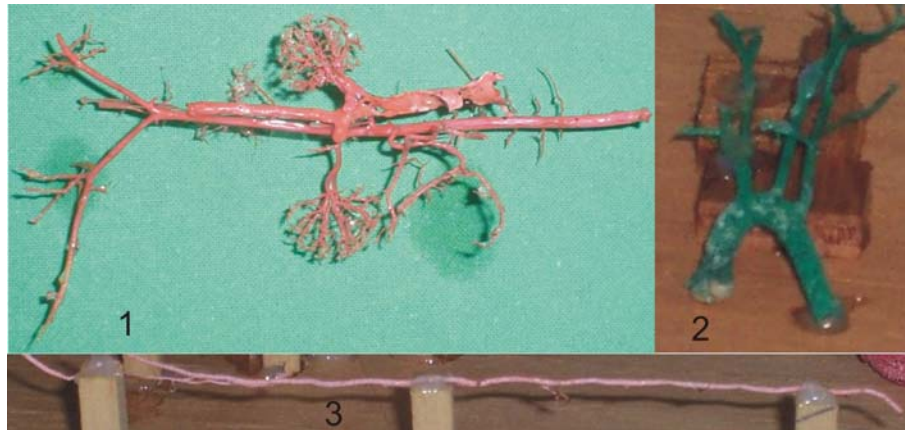
Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla intraperitoneal de pentobarbital sódico 50 mg/kg y diazepam 0,25 mg/kg. Se efectuó una incisión en el cuello a través de la cual se aisló y canuló la arteria carótida izquierda con un cateter de teflón (Acland, 1989). El catéter se tunelizó por el tejido subcutáneo y se exteriorizó a través de una incisión en la nuca. Un conjunto de chaleco con resortes flexibles permitió anclar los

catéteres encima de la jaula, facilitando la movilidad del animal y el registro continuo de presión arterial en estado consciente (Figura 16) (Rinaldi y Cingolani, 1994).



**Figura 16:** En la parte izquierda de la figura se observa la rata consciente con chaleco y resortes flexibles para poder anclar los catéteres de presión directa e intubación intragástrica. A la derecha se observa el catéter de presión directa unido al transductor de presión y en la computadora el registro de presión directa.

La dimensión de los catéteres la determinamos utilizando ratas adultas sacrificadas por anestesia con pentobarbital sódico intraperitoneal 50 mg/kg de peso en las cuales se canuló la aorta torácica o abdominal en sentido retrógrado y/o anterógrado utilizando un catéter de plástico de alta densidad. Se realizó primero un lavado con agua y luego con acetona, y posteriormente se procedió a la inyección de una solución de Rodopax coloreado con entonadores de pintura sintética, con jeringa de vidrio y un sistema para ejercer presión sobre el émbolo durante 24 horas. A continuación se sumergieron los preparados en una solución de ácido clorhídrico al 10% durante 24 horas, procediendo luego a la eliminación de los restos tisulares con agua (Fritz y col., 2007). Se logró en todos los casos obtener moldes del sistema vascular con diversos grados de repleción, en los cuales se pudieron estudiar el calibre de los vasos y se pudo estimar la longitud apropiada de los catéteres para los estudios *in-vivo* mencionados (Figura 17).



**Figura 17:** Inyecciones de rodopax en diversos territorios vasculares de la rata: 1) inyección por la parte superior de la aorta torácica en sentido anterógrado, observándose el tronco celíaco y sus ramas, las dos arterias renales y la bifurcación en arterias ilíacas primitivas, punto donde nace la arteria de la cola. A la derecha se ha llenado por vía anterógrada un segmento de vena cava. 2) cayado aórtico mostrando el tronco común braquiocefálico, la carótida izquierda y braquial izquierda. 3) arteria de la cola llenada desde su origen en la bifurcación de las ilíacas primitivas.

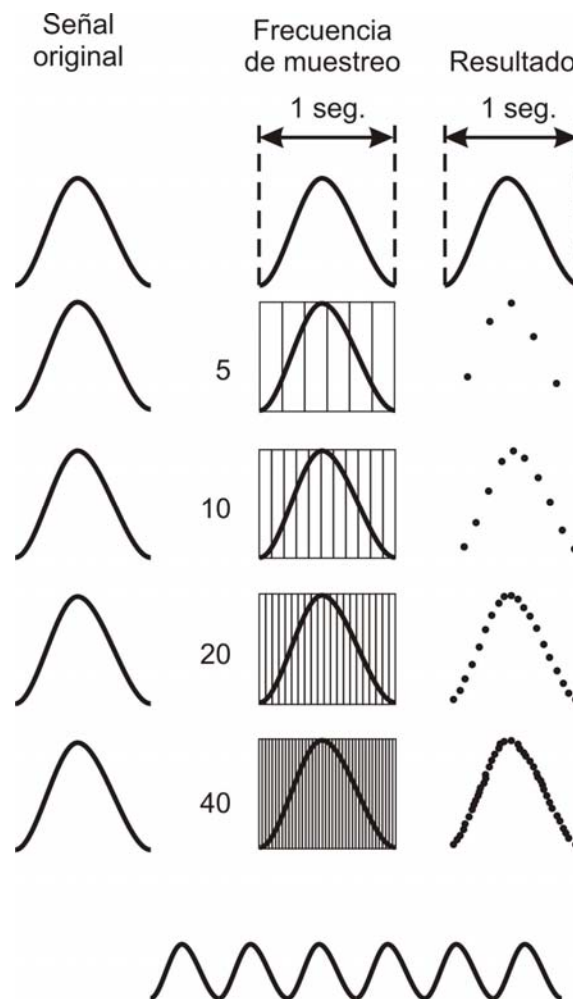
### 3- Sistema de adquisición de datos mediante su conversión analógico digital

Un sistema de conversión analógico-digital comprende, en su versión más elemental, un circuito de adquisición de datos, otro de conversión analógico-digital, y otro de transferencia hacia la memoria del sistema.

#### Adquisición

Este circuito toma lecturas de la señal analógica a intervalos de tiempo prefijados e iguales. Dentro de la unidad de tiempo (generalmente 1 segundo) la señal analógica puede tomar infinitos valores dentro de su amplitud, pero va a quedar representada por un número discreto de puntos dependiente de la frecuencia de muestreo. La Figura 18 muestra el ejemplo de una señal de 1 segundo de duración (que podría representar, por ejemplo, el valor de la presión intraventricular durante un latido cardíaco) recogida primero en forma analógica (trazado superior) y luego muestreada sucesivamente a 5, 10, 20 y 40 veces por segundo (Hz). Es evidente que el parecido de la muestra con la señal original aumenta con la frecuencia de muestreo, y al mismo tiempo el proceso de muestreo se hace más lento (Brown y col., 1982).

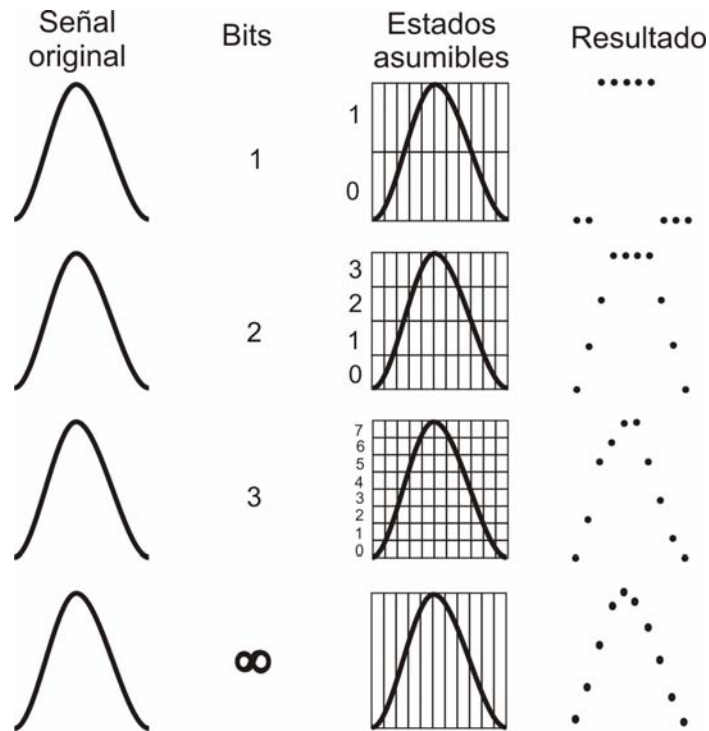




**Figura 18:** En la parte superior de esta figura se muestra una señal de 1 segundo de duración recogida en forma analógica y luego muestreada sucesivamente a 5, 10, 20 y 40 veces por segundo (Hz). Se observa como la fidelidad del registro aumenta a medida que se incrementa la frecuencia de muestreo.

### Conversión analógico-digital

El valor de la señal leído en el momento del muestreo todavía es un valor analógico, y la señal representada por esa serie de valores periódicos se denomina señal analógica de tiempos discretos. Cada valor es almacenado brevemente por el circuito (que por esa razón recibe el nombre de *sample and hold*) para poder ser transmitida al conversor. Este puede recibir cualquier valor analógico dentro de un cierto rango adaptable al valor de la señal, pero debe emitir para cada uno un valor digital en ceros y unos. La fidelidad con que la señal digital represente a la analógica dependerá de la resolución del conversor, que puede medirse en bits. El número de bits del conversor permite saber cuántos estados puede asumir el circuito para representar a la señal (Figura 19) (Brown y col., 1982).



**Figura 19:** Se observa el resultado de adquirir una señal tomando 10 muestras por segundo con plaquetas analógico digitales de 1 bit (2 estados asumibles), 2 bits (4 estados asumibles) y 3 bits (8 estados asumibles). Puede verse que la fidelidad de reproducción se incrementa exponencialmente en función del número de bits. En este trabajo utilizamos una plaqueta de 12 bits que posee por lo tanto 4096 estados asumibles y una resolución porcentual a fondo de escala de  $100/4096$  igual a 2 % de la señal registrada.

Por ejemplo, si un conversor fuera de 1 bit podría asumir solamente 2 estados: on (valor 1) y off (valor 0). El número de estados posibles de asumir está expresado por  $2^n$  ( $n$ = número de bits). Otras dos formas de expresar la resolución son dividir el tope de la escala en volts o en por ciento por el número de estados asumibles, lo cual da por resultado el cambio más pequeño en la señal que es representable digitalmente por ese conversor. Por ejemplo, si el valor máximo de la señal que se acaba de analizar fuera 2 V (= 100%) los valores serían:

**Tabla 3:** Número de bits y resolución de una plaqueta analógico digital.

Conversor		Resolución	
Bits	Estados asumibles	V	%
1	2	1	50
2	4	0,50	25
3	8	0,25	12,50

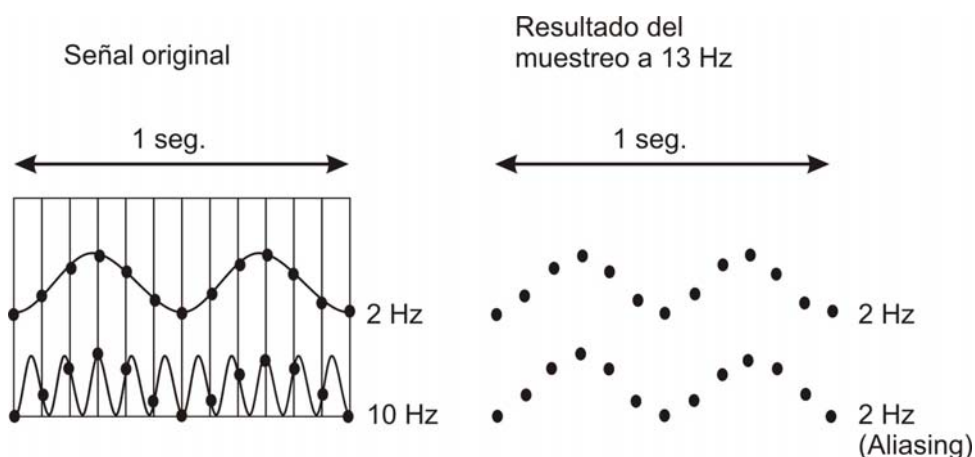
Obviamente, el empleo de mayor número de bits aumenta el parecido de la señal digital con la señal analógica, y también el tiempo consumido en el procesamiento.

### Transferencia hacia la memoria del sistema

Consume un tiempo que depende de la velocidad del microprocesador de la computadora donde está instalada la plaqueta conversora.

El cociente entre la unidad de tiempo y la suma del tiempo consumido por los tres procesos (adquisición, conversión y transferencia) da la verdadera frecuencia máxima de conversión del sistema de punta a punta, valor que en inglés se denomina *throughput* y se mide en Hz. Las características de los tres procesos deben estar acopladas, porque el tope depende del componente más lento. Un adquirente muy rápido acoplado a un conversor lento y/o a una computadora lenta se verá “frenado” por dichos componentes.

El uso de un sistema de conversión muy lento con relación a la frecuencia máxima del fenómeno medido origina un error denominado en inglés *aliasing*, que consiste en la adquisición de una onda de forma muy parecida a la original pero de frecuencia mucho menor, y formada por datos que no pueden distinguirse de los válidos. En la Figura 20 se ve el resultado de muestrear con una frecuencia de 13 Hz dos señales de 2 y 10 Hz. La de 2 Hz se reproduce con mucha exactitud, pero la de 10 Hz se interpretaría con una frecuencia 5 veces menor a la real. Para evitar el aliasing, el sistema de conversión debe tener un throughput de al menos el doble de la frecuencia máxima a registrar (teorema de Nyquist) (Brown y col., 1982).



**Figura 20:** En esta figura se observa como la frecuencia de muestreo debe ser muy superior a la frecuencia de la señal original para que la reproducción sea exacta. En el panel izquierdo se muestran dos señales, la superior de 2 Hz y la inferior de 10 Hz, ambas muestreadas a 13 Hz. En el panel derecho puede verse que la señal de 2 Hz, al estar muestreada a más de 6 veces su propia frecuencia, se reprodujo fielmente. En cambio la señal de 10 Hz muestreada con una frecuencia apenas superior a la propia produjo una señal con una falsa frecuencia de 2 Hz. A este fenómeno se lo denomina “aliasing”.

Las plaquetas analógico-digitales que usamos fueron fabricadas por la firma DATA TRANSLATION, INC, Marlboro, Massachussets, USA y fueron de dos modelos diferentes. Uno de ellos se instalaba de forma fija en el motherboard de una computadora hasta el modelo 586, y era una plaqueta de 12 bits modelo DT 016 EZ; la otra es para uso con computadoras más recientes (Pentium 4 en adelante) y es el modelo DT 9801. Esta última plaqueta es también de 12 bits pero no se instala de forma fija en la computadora sino que se conecta a la misma a través de la entrada USB, lo cual permite conectar una misma plaqueta a diferentes computadoras siempre y cuando posean el software correspondiente.

El software de adquisición para la plaqueta DT 016 EZ fue el LABTECH NOTEBOOK PRO, Marlboro, Massachussets, USA; y para la plaqueta DT 9801 se usó el DT MEASURE FOUNDRY, desarrollado por la empresa DATA TRANSLATION, INC (Data Translation 1995 Product Handbook).

#### **4- Determinación histoquímica de la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOs)**

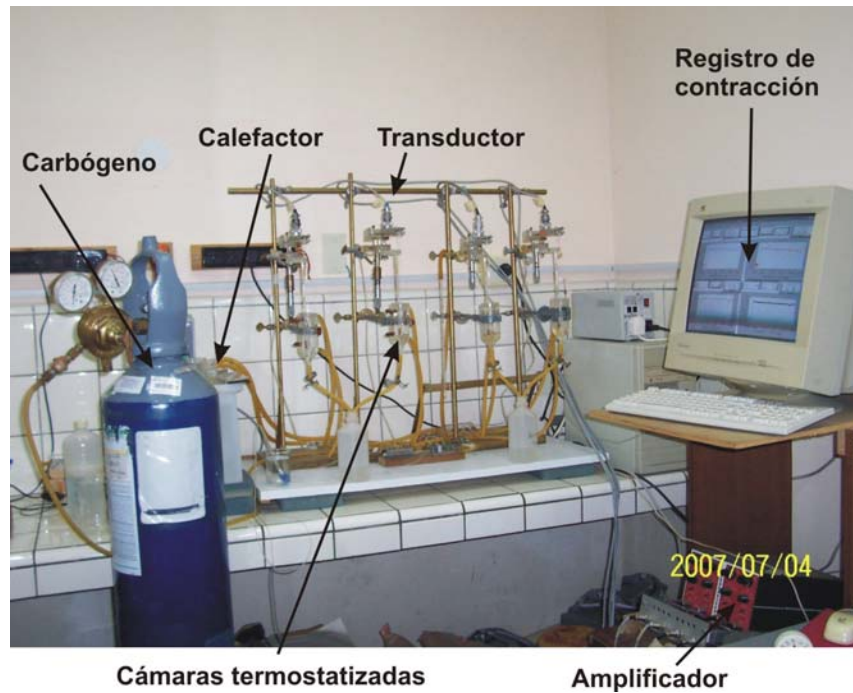
Se usó el ensayo de la NADPH-diaforasa para estimar la actividad total de NOs en arterias de la cola obtenidas en condiciones que simulaban lo mejor posible la respectiva situación experimental. Las arterias controles fueron extirpadas sin hacer oclusión arterial y colocadas en solución salina burbujeada con carbógeno (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono). Las arterias "isquémicas" fueron obtenidas luego de efectuar una oclusión arterial durante 2 minutos, y fueron colocadas en solución salina burbujeada con nitrógeno. Todos los vasos se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,4; fueron crioprotegidos en 15% de sucrosa y congelados. Se obtuvieron cortes de 15  $\mu\text{m}$  que se montaron sobre portaobjetos cubiertos de gelatina e incubados con una mezcla de reacción que contenía 1,2 mM de NADPH y 0,24 mM de nitro azul de tetrazolio en buffer fosfato con agregado de 0,3% de tritón X-100 durante 60 minutos a 37°C. Las actividades de NOs ensayadas por esta técnica son inhibidas por preincubación con difenil difenileniodonio y otros inhibidores de la NOs. Para la observación, determinación de absorción y fotografía se utilizó un microscopio Zeiss Axiophot. Se hizo un análisis computarizado de las imágenes utilizando un analizador (Kontron Zeiss) y los valores de absorción medios fueron

calculados a partir de 5 áreas de cada corte en 10 preparados diferentes. El técnico no conocía el propósito de las mediciones. En experimentos control se agregó 5 mM de L-NAME para tener en cuenta el teñido específico de la NADPH-diaforasa debido a la actividad de la NOs (Fritz y Rinaldi, 2007; Vincent y Kimura, 1992; Stuehr y col., 1991).

## **5- Medición de la contracción del músculo liso vascular aislado**

Para la contracción de las arterias se usó un preparado compuesto por (Figura 21): 4 cámaras de 20 ml aproximadamente, 4 transductores de fuerza (Grass FT. 03C) sostenidos por un micrómetro que permite desplazamientos variables, calefactor circulador para mantener el preparado a 37 °C y carbógeno (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub>) para mantener la oxigenación y el pH. Las arterias fueron colgadas en alambres unidos a los transductores de fuerza y sumergidas en las cámaras con Ringer normal. La composición del Ringer Normal fue (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. El músculo liso se estabilizó durante 1 hora, con una tensión de reposo de 2 gramos para la arteria de la cola y de 2 a 3 gramos para la aorta. Esos valores de tensión se lograron estirando los anillos vasculares con el micrómetro. La señal de los transductores de fuerza fue amplificada y posteriormente adquirida mediante la plaqueta DT 01 EZ y un programa de adquisición de datos Labtech NOTEBOOK PRO (Rinaldi, 2005).

Este preparado se utilizó para medir contractilidad vascular en: 1- modelo de alto colesterol en ratas Wistar, y 2- modelo de ratas SHR (curvas dosis respuesta a noradrenalina y serotonina en presencia y ausencia de L-NAME (Miguel y col., 2007)).

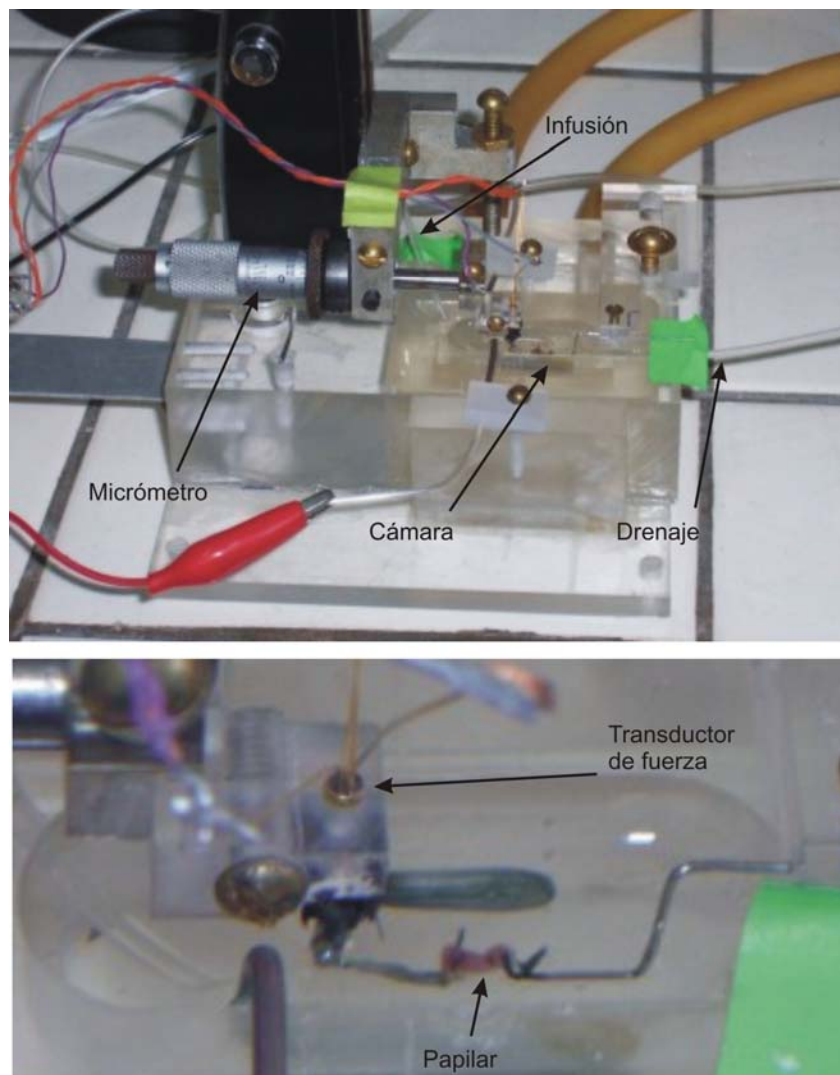


**Figura 21:** Se muestra el aparato para registrar la contracción de un músculo liso aislado. De izquierda a derecha puede verse el cilindro de carbógeno para burbujear la solución y las cámaras, el calefactor para mantener las 4 cámaras a 37°C, los 4 transductores de fuerza, el amplificador de 4 canales, la computadora con la plaqueta analógico digital que permite almacenar los datos y a la vez tener un registro on-line que puede verse a la derecha de la figura.

## 6- Medición de contracción de músculo papilar de corazón de rata

Se extrajo el corazón de ratas anestesiadas y se colocó en una cápsula de Petri llena de solución de Ringer burbujeadada con carbógeno. Se lo fijó con agujas, se extirparon las aurículas y se abrió longitudinalmente el ventrículo izquierdo a partir del orificio auriculo ventricular. Se identificó un músculo papilar apropiado y el extremo de las cuerdas tendinosas se fijó con una ligadura de seda 6-0 construyendo una especie de asa de hilo por donde enganchar el preparado. El extremo opuesto del músculo, por donde 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 termostatazada, y a través de ella circulaba continuamente solución de Ringer a 37°C (aproximadamente 1 ml/minuto) y burbujeadada 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 Hz (Alvarez y col., 1999). Luego de media hora de estabilización en solución de Ringer el preparado era expuesto a una solución con hidrolizado de amaranto 1 mg/ml de Ringer durante una hora. Luego se compararon los valores de fuerza al final de la exposición al hidrolizado de amaranto con respecto a los valores al final del periodo control. Como control se utilizaron preparados en los cuales la solución de amaranto se reemplazó por solución de Ringer (Figura 22).



**Figura 22:** Aparato utilizado para medir la fuerza desarrollada por músculos papilares de corazón de rata. En el panel superior se puede ver la cámara de 3 ml de capacidad que se llena continuamente con solución de Ringer a 37°C proveniente de un reservorio burbujeado con carbógeno, y se drena por la parte derecha con una trompa de vacío. El transductor de fuerza miniatura está montado sobre un micrómetro que permite desplazarlo en forma controlada, y a ambos lados de la cámara hay electrodos de estimulación de plata. En el panel inferior se puede ver en detalle un músculo papilar montado entre el transductor de fuerza y un alambre de apoyo fijo.

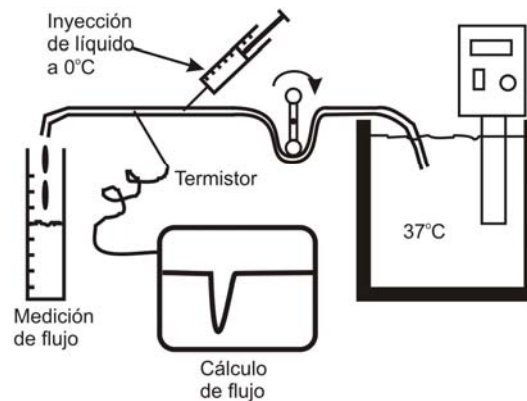
## 7- Medición de volumen minuto

Para esta medida se utilizó el método de la termodilución. A través de una incisión en el cuello se aísla la carótida derecha y se introduce un catéter delgado de teflón hasta la raíz de la aorta. Luego se canula la carótida izquierda y por la misma se introduce un termistor miniatura montado en el extremo de un catéter de teflón de 0,69 mm de diámetro, el cual se hace avanzar hasta el cayado aórtico. Una vez obtenida la línea de base correspondiente a la temperatura corporal, se inyecta por el catéter arterial 0,2 ml de solución fisiológica a 0°C. Cuando la solución fría alcanza al termistor se produce una señal eléctrica que alcanza un valor pico y luego regresa rápidamente al valor basal. El producto de la cantidad inyectada por la diferencia de temperatura con respecto a la de la rata dividido por el área bajo la curva proporciona una medida del volumen minuto de la rata (Tipton y col., 1991).

Para validar el método se utilizó una “circulación” con tubos de tygon de un diámetro interior aproximado similar al de la aorta e impulsada por una bomba peristáltica. Se midió el área bajo la curva a distintos flujos comparando estas estimaciones con el flujo real de la bomba medido con una probeta graduada (Figura 23) (Dyson y col., 1984).

Para las mediciones experimentales se abrió previamente el abdomen de la rata introduciendo un termómetro para medir temperatura corporal y un catéter gástrico similar al utilizado en las ratas conscientes para administrar el hidrolizado de amaranto. El catéter colocado en la carotida derecha se utilizó alternativamente para medir la presión arterial intracarotídea conectándolo a un transductor de presión. De esta forma, se pudieron tomar dos medidas basales de volumen minuto mas una medida de presión arterial, se administró el hidrolizado con una concentración de 1,5 g/kg de rata y se tomaron dos nuevas medidas de volumen minuto y otra de presión arterial a los 30 minutos.





**Figura 23:** En el panel superior se muestra el dispositivo para calibrar el termistor utilizado para medir volúmen minuto. En el panel inferior se lo muestra en forma esquemática. El líquido proveniente de un reservorio a 37°C es impulsado por una bomba y el flujo se puede medir continuamente mediante una probeta. El tubo de silastic por dónde circula el agua tiene un diámetro interior igual al de la aorta de rata, y tiene un sitio de inyección dónde se efectúan infusiones de 1 ml de agua a 0°C. Pocos milímetros corriente abajo del punto de inyección se encuentra insertado el termistor, el cual recoge las variaciones de temperatura subsiguientes a la inyección de líquido helado. La señal del termistor se amplifica y se recoge en una computadora con plaqueta analógico digital que permite calcular el flujo impulsado por la bomba, el cual se comparó con el medido realmente por la probeta.

## 8- Preparación del hidrolizado de amaranto

### Materia prima

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.

### **Preparación de aislados proteicos**

La obtención de aislado nativo a partir de harina desgrasada de amaranto se efectuó según la técnica descrita por Martínez y Añón (1996). 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.

### **Reacción de hidrólisis**

El aislado nativo se suspendió en una concentración de 10 mg/ml 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) o de tripsina (proteasa de tipo III de páncreas bovino, provista por Sigma: actividad expresada en unidades BAEE, fue 10600 U/mg) y se incubó durante 4 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 µl de enzima por mg de aislado para la alcalasa y de 0,1 mg/ml de solución de aislado para tripsina.

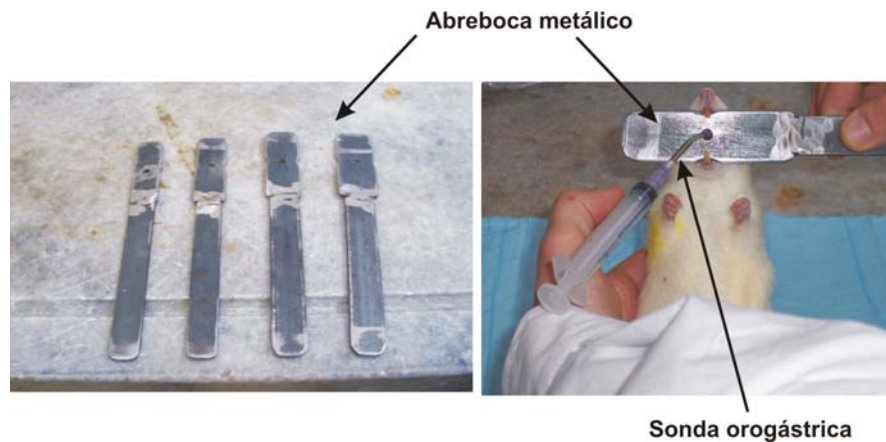
Todas estas muestras fueron preparadas y provistas a nuestro laboratorio por María Cecilia Condés, Bruno Vecchi y Valeria Tironi del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata.

## **9- Formas de administración del hidrolizado de amaranto**

### **- Intubación orogástrica**

En primer lugar se marcaron las ratas, y se les tomó la presión durante 5 días para acostumbrarlas, luego se les dio hidrolizado de amaranto y agua, utilizando una sonda

orogástrica y un abre boca metálico de distintas dimensiones de acuerdo al tamaño de la rata (Figura 24).



**Figura 24:** En el panel de la izquierda se muestran los abrebocas metálicos que se insertan entre los incisivos de la rata para mantener la boca abierta y poder introducir la sonda por el orificio central. En el panel de la derecha se muestra una sonda colocada para efectuar la administración intragástrica de líquido.

Para poner a punto el método de intubación orogástrica, y comprobar que las sustancias administradas se absorbían correctamente, se hicieron experimentos con diltiazem (2,5 ml a una concentración de 2,5 mg/ml) y etilefrina 2 ml con una concentración de 5 mg/ml.

### - Gastrostomía

Con el objeto de evitar el trauma que significa la introducción de la sonda por vía orogástrica, el cual trae aparejada una variabilidad de los valores de presión arterial, cambiamos este método por el de la gastrostomía en ratas con determinación directa de la presión arterial (y en algunos casos con medición de presión indirecta). Se agregó un segundo resorte flexible paralelo al que conduce el catéter arterial y por el mismo se paso un catéter de silastic de 1,5 mm de diámetro que se introdujo por la nuca de la rata y luego se desvió hacia la zona abdominal y a través de un pequeño orificio peritoneal se introdujo en el estómago sujetándolo a la pared mediante una sutura en bolsa de tabaco (Acland, 1989).

Una vez recuperadas las ratas de la anestesia (24 horas) se administró el hidrolizado de *A. mantegazzianus* (alcalasa 4 horas) a través de la sonda gástrica sin provocar ninguna alarma en el animal, y se registro la presión arterial a intervalos regulares.

## 10- Evaluación de la actividad inhibidora de ECA *in-vitro*

La actividad inhibidora de la ECA fue medida utilizando el método de Cushman y Cheung modificado por Kim y col. (1999). Para la realización del ensayo se emplearon los siguientes 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 µM.

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 del ensayo

Se incubaron 2,5 mU de enzima con 150 µL de sustrato sintético y 25 µL de muestra a 37 °C durante 1 hora. La reacción se detuvo con 250 µL 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:

$$\%Inh = 100 \cdot \left( 1 - \frac{A_m - A_{0m}}{A_{MAX} - A_{0MAX}} \right)$$

$A_m$  y  $A_{0m}$  son las absorbancias de los tubos con muestra en presencia y ausencia de ECA, respectivamente.  $A_{MAX}$  y  $A_{0MAX}$  son las absorbancias en ausencia de muestra y en ausencia de muestra y ECA, respectivamente. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

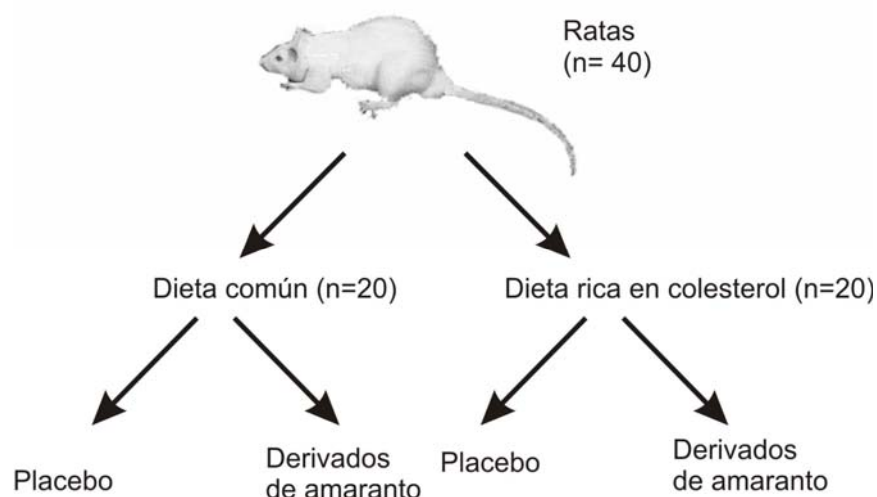
Todas estas determinaciones fueron realizadas por Bruno Vecchi del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata.

## 11- Modelos animales utilizados

### a- Modelo de alto colesterol

Se trabajó con 2 lotes de 10 ratas machos Wistar cada uno. El primer lote fue alimentado con dieta común y el segundo lote con dieta rica en colesterol (1% de colesterol). De acuerdo a los resultados obtenidos, a cada dieta se planificó agregar derivados de amaranto. Las ratas comieron y bebieron a voluntad. Hasta la semana 9 se midió la cantidad de alimento y agua ingeridos por las ratas. Las 10 ratas de cada lote fueron marcadas con sacabocado y tijera (Figura 25).

El alimento con colesterol fue preparado moliendo el alimento común (Tabla 4) y agregando 1% de colesterol, luego se adiciono agua para poder formar una masa compacta, y se preparó un alimento de forma similar al común, el cual fue secado en estufa de 50 °C, durante aproximadamente 24 horas.



**Figura 25:** Se muestra la división en lotes planeada para medir los efectos del colesterol en la dieta.

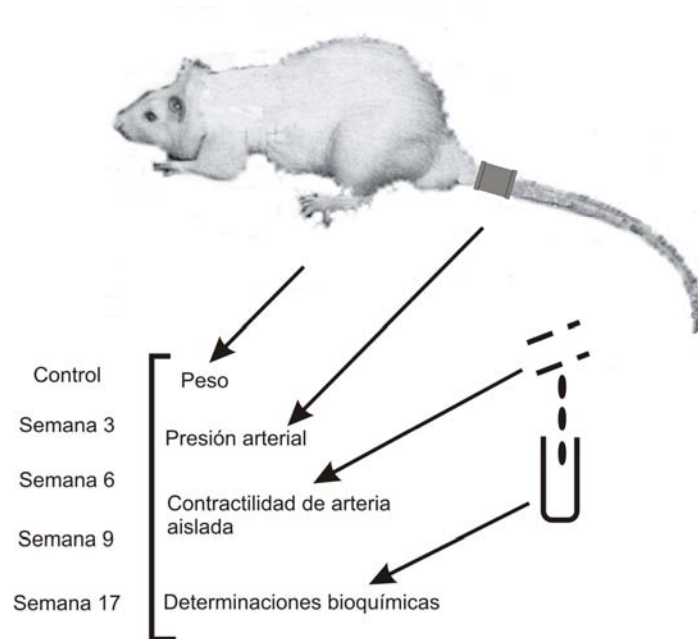
**Tabla 4:** Composición del alimento para ratas

NUTRIENTE	%	NUTRIENTE	%
Humedad	10	Cloro	0,25
Proteína	24,6	TDN (nutrientes digestibles totales)	82
Grasa	7	Ac. Linoleico	2,25
Cenizas	6,4	Ac. Linolénico	0,15
Fibra Cruda	4	Arginina	1,55
FDN (fibra neutra)	12	Cistina	0,42
FDA (fibra ácida)	4,5	Glicina	1,4
Hemicelulosa	7,7	Histidina	0,59
CNF (carbohidratos no fibrosos)	36	Isoleucina	0,97
Calcio	1,1	Leucina	2,25
Fósforo	0,8	Lisina	1,2
Fósforo Inorgánico	0,6	Metionina	0,4
Postasio	1,05	Fenilalanina	1,18
Magnesio	0,2	Serina	0,09
Azufre	0,25	Treonina	0,9
Sodio	0,11	Valina	1,2

A las ratas se las pesó y se les midió la presión sistólica indirecta en las semanas 0, 3, 6, 9 y 17; y también se realizaron determinaciones bioquímicas.

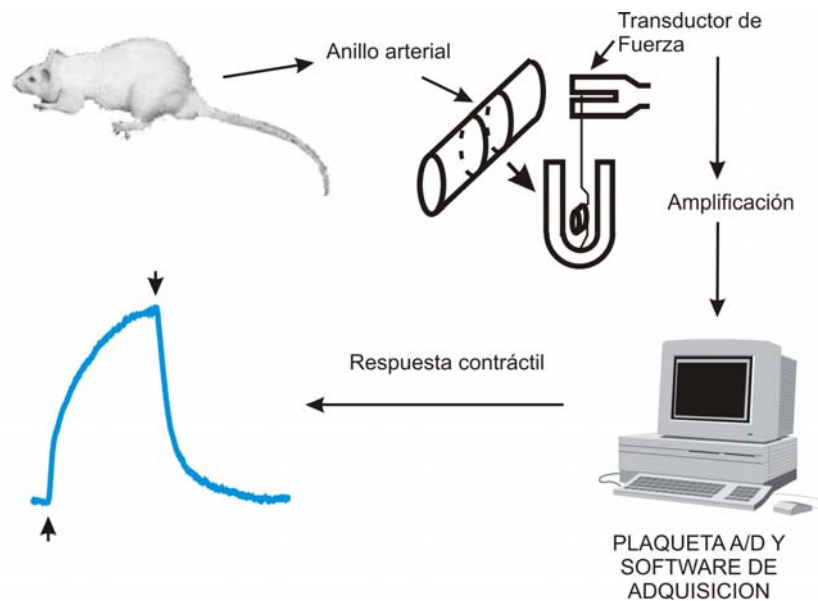
Para determinar colesterol y triglicéridos se extrajo sangre de la cola de la rata, calentándola previamente con calor.

Se juntaron 6 ó 7 gotas de sangre en tubos eppendorf con 10  $\mu$ l de heparina (5000 UI/ml), luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para separar el plasma, el cual fue congelado para realizar todas las determinaciones juntas. Las muestras fueron tomadas a partir de la semana 3. En la última semana se tomó la sangre con pipeta de la rata sacrificada. Un resumen del esquema se muestra en la Figura 26.



**Figura 26:** Se muestra esquemáticamente las determinaciones realizadas cada 3 semanas y al final del experimento (semana 17).

Para la contracción vascular (Figura 27) se usó la arteria de la cola de la rata en todo el experimento y en la última semana también se utilizó la aorta luego de sacrificar la rata.



**Figura 27:** En esta figura se muestra en detalle la obtención de un segmento de arteria de la cola del cual se corta un cilindro que se suspende entre un punto fijo y un transductor de fuerza. La señal obtenida se amplifica y se calibra obteniendo una respuesta contráctil como la que se muestra abajo a la izquierda.

Para separar la arteria, se anestesió la rata, luego se la acostó en una tabla, se la sujetó con hilos, se marcó la parte ventral de la cola y se cortó aproximadamente 1,5 cm de la misma, luego se cauterizó la cola para impedir hemorragia posterior.

La cola separada se colocó en una solución de Ringer normal, y la arteria de la cola se separó con tijera y se la disecó bajo lupa. Para poder colgarla se realizó un preparado enhebrando la arteria con hilo de cobre de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Para separar la aorta al final del experimento se anestesió la rata, se abrió el tórax y se aisló el vaso, el cual fue colocado en Ringer normal y disecado de las estructuras circundantes.

El protocolo utilizado fue:

- Previa estabilización durante 1 hora, contracción con Ringer de alto potasio (80 mM, con disminución equimolar de la cantidad de ClNa) durante 15 minutos.
- Lavado con Ringer normal durante 5 minutos.
- Contracción con Ringer de alto potasio durante 15 minutos.
- Lavado con Ringer normal durante 5 minutos.

Luego de este último lavado a un anillo arterial se le agrego angiotensina II en una concentración de  $10^{-6}$  M y se la dejó actuar durante 15 minutos. A otro anillo arterial se le agregó noradrenalina en concentraciones de  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M cada dos minutos y por último se le agrego Acetilcolina en una concentración de  $10^{-6}$  M y se la dejó actuar durante 15 minutos.

Finalmente todas las muestras fueron lavadas con Ringer normal, dejándolo actuar durante 5 minutos aproximadamente.

Al terminar el experimento las arterias se secaron con papel de filtro y se pesaron en una balanza analítica, expresando los datos mecánicos en g de fuerza/mg de tejido.

### **b- Modelo de ratas genéticamente hipertensas (SHR) y su control normotenso**

En las décadas de 1930 y 1940 Okamoto y posteriormente Aoki, utilizando un pletismógrafo de cola recientemente descrito, midieron por primera vez la presión arterial en forma indirecta en grandes poblaciones de ratas Wistar. Al hacerlo notaron que la distribución de presiones seguía una curva normal, existiendo grupos de ratas con valores extremos (muy altos o muy bajos) de presión arterial. Estos investigadores procedieron entonces a cruzar entre sí machos y hembras dentro de cada uno de estos grupos, obteniendo generaciones sucesivas con presiones muy altas y normales. A las primeras se las conoce como ratas espontáneamente hipertensas ó SHR (iniciales de Spontaneously Hypertensive Rats). Las segundas se denominan WKY (iniciales de Wistar-Kyoto rats), y se consideran generalmente el control normotenso de las SHR. Sin embargo las WKY criadas en nuestro bioterio han resultado con presiones más



elevadas que lo normal, razón por la cual hubo que utilizar ratas de la cepa Wistar (WR) como control normotenso.

En este modelo de rata se practicaron los siguientes protocolos:

- Administración orogástrica de distintas concentraciones de hidrolizado de amaranto con medición indirecta de presión arterial.
- Administración intragástrica de distintas concentraciones de hidrolizado de amaranto y captopril con medición directa de presión arterial media.
- Administración intragástrica de distintas concentraciones de hidrolizado de amaranto con medición indirecta de presión arterial.
- Experimentos de contractilidad miocárdica de músculo papilar.
- Estudios mecánicos en músculo liso vascular de aorta.
- Experimentos de volumen minuto.

### **c- Modelo de hipertensión renal**

Desde muy antiguo se sospechó una relación entre riñón y presión arterial. Ya en el siglo XIX en Inglaterra Bright describió pacientes con presión arterial elevada (que en la época se estimaba a través del denominado “pulso en alambre”) y que en la autopsia presentaban riñones esclerosados y de muy pequeño tamaño. En la primera mitad del siglo XX Goldblatt, trabajando en la Cleveland Clinic, creó un modelo animal de hipertensión en perros producida por estenosis controlada de la arteria renal, que obtenía mediante un clip ajustable que se implantaba quirúrgicamente en el animal. Así se demostró por primera vez en forma concluyente que la isquemia renal producía la liberación de algún compuesto que elevaba la presión arterial (Goldblatt, 1934 y 1937). Estudios posteriores llevados a cabo por dos grupos casi en forma simultánea, el del Dr. Eduardo Braun Menendez en la Universidad de Buenos Aires y el del Dr. Irvine H. Page en la Cleveland Clinic descubrieron que el riñón isquémico libera una sustancia denominada renina que a su vez provoca en el plasma la liberación de un decapeptido denominado AngI a partir de una macromolécula circulante producida en el hígado y llamada Angiotensinógeno. La AngI es degradada a un octapeptido llamado AngII por la enzima convertidora (cuya inhibición se le atribuye a los hidrolizados de amaranto) y la AngII es la que posee una importante acción vasoconstrictora además de efectos descritos más recientemente como la estimulación de factores oncogénicos y de crecimiento. En ratas es usual la creación de modelos de hipertensión arterial por clipado de la arteria renal en forma uni o bilateral, acompañada o no de nefrectomía

unilateral (Kurnjek y col. 1983 y 1989). En los estudios de modelado plástico con inyección de Rodopax se determinó que el calibre óptimo del clip para producir estenosis era de 0,25 mm (Fritz y col., 2007).

En estas ratas se realizó la administración intragástrica de captopril ó de distintas concentraciones de hidrolizado de amaranto con medición directa de presión arterial media.

#### **d- Modelo de hipertensión por administración de fructosa**

La fructosa se administró disuelta al 10% p/v en el agua de bebida durante dos meses. Se midió la presión arterial indirecta en condiciones control y luego en forma periódica hasta la finalización del periodo experimental (Storlien y col., 1988 y 1991; Harris y Kor, 1992; Lombardo y col., 1996).

En estas ratas se intentó administrar en forma intragástrica hidrolizado de amaranto con medición directa de presión arterial media.

## **12- Estadística**

Se utilizó en todos los casos el software Sigma Stat (Jandel Scientific Software, San Rafael, California, USA). El tipo de prueba utilizada en cada caso se indica en resultados.

## 1- Medición de presión arterial y desarrollo del sistema de adquisición de datos

### Estudio de las condiciones óptimas para la toma de presión, sobre todo temperatura e inmovilización del animal

Como se mencionó en los objetivos, pretendimos desarrollar un sistema para elevar la temperatura del animal y lograr de esta forma una mejor señal de pulso, pero que al mismo tiempo no pusiera en riesgo la sobrevivencia de la rata a causa de una eventual hipertermia. La incubadora que desarrollamos puede observarse en la Figura 28.



**Figura 28:** Incubadora utilizada para elevar la temperatura de las ratas previo a la determinación de presión arterial para lograr una óptima visualización del pulso en la arteria de la cola. El sector inferior de madera contiene la fuente de calor y el termostato cuyo panel digital se ve abajo y a la izquierda. El sector superior de acrílico tiene una tapa corrediza por dónde se introduce la rata, y el conjunto es fácilmente desmontable para su limpieza. No se muestra en la figura un enrejado de acrílico que mantiene al animal a una cierta distancia del piso inferior de la incubadora, permitiendo rellenar ese espacio con viruta para su limpieza.

La misma consta de dos partes: un cajón de madera inferior sobre el cual se adapta una caja de acrílico. El cajón de madera contiene el elemento calefactor y un motor para hacer circular el aire caliente (elementos provenientes de un secador de cabello); y además un termostato muy preciso para controlar la temperatura. Un sistema de conductos metálicos permite enviar el aire caliente hacia la caja de acrílico superior, y en la misma hay un deflector metálico que permite distribuir el aire por la caja sin que el mismo se dirija en forma de corriente directa hacia la rata, para evitar posibles lesiones. La caja superior de acrílico tiene una tapa deslizable para introducir a la rata, y un sensor de temperatura conectado al termostato de la caja inferior. A su vez la caja de

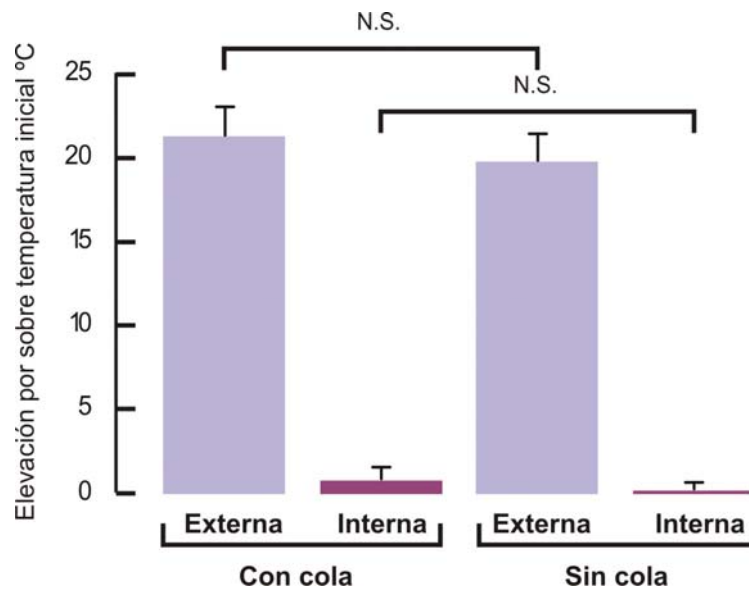
acrílico se encuentra dividida en dos niveles mediante una rejilla del mismo material, permitiendo la colocación de viruta en el nivel inferior para facilitar la limpieza. Con esta incubadora logramos una temperatura bastante constante dentro de la caja de acrílico, sin que la rata corra el riesgo de quemarse por estar muy próxima a un elemento incandescente como son las lámparas. La caja de acrílico se separa fácilmente de la base de madera inferior y facilita el lavado al no contener en sí misma partes eléctricas. No hemos encontrado un modelo similar al descrito en ningún catálogo comercial, y debe destacarse que pudo ser construido con elementos de bajo costo. Por lo general con 10 minutos de calentamiento a 38-39 °C se podía obtener un buen pulso.

Frecuentemente se menciona en trabajos de la especialidad que la cola de la rata es importante como órgano termorregulador. Con el objeto de estudiar si esta afirmación era real diseñamos experimentos en los cuales se implantó quirúrgicamente un sensor de temperatura en el abdomen de la rata, exteriorizando el cable a través de un conjunto de chaleco y resorte como ha sido descrito. Esto permitía obtener la denominada “temperatura interna” del animal, y compararla con la temperatura externa existente dentro de la incubadora la cual podía variarse a voluntad.

Con la rata consciente dentro de la incubadora se registraban la temperatura interna y externa controles y luego se elevaba progresivamente mediante el termostato la temperatura externa, es decir la de la incubadora, llegando hasta aproximadamente 45 °C, punto en el cual se registraba también la temperatura interna después de unos minutos de estabilización. Luego se transfería la rata a una jaula para que la temperatura se normalizara, y al fin de ese periodo se seccionaba la cola bajo anestesia. Una vez despierta la rata se repetía el experimento descrito anteriormente, siendo la hipótesis de trabajo que si la cola realmente se desempeñaba como elemento termorregulador la variación de temperatura interna de la rata debía ser mucho mayor en los animales sin cola.

Como puede verse en la Figura 29 la temperatura interna y externa iniciales no fueron diferentes entre los animales con cola y sin cola. Cuando se aplicó una elevación de la temperatura externa de  $21,6 \pm 1,7$  °C, en los animales con cola (n=6) la temperatura interna varió en promedio  $1,1 \pm 0,7$  °C, es decir que los mecanismos termorreguladores de la rata hicieron que la temperatura interna variase 20 veces menos que la externa. En los animales sin cola (n=6) la temperatura externa varió  $20,1 \pm 1,6$  °C, y la interna varió aún menos que en el caso anterior,  $0,5 \pm 0,4$  °C. Si la cola hubiese desempeñado un papel termorregulador importante, en los animales sin cola la temperatura interna

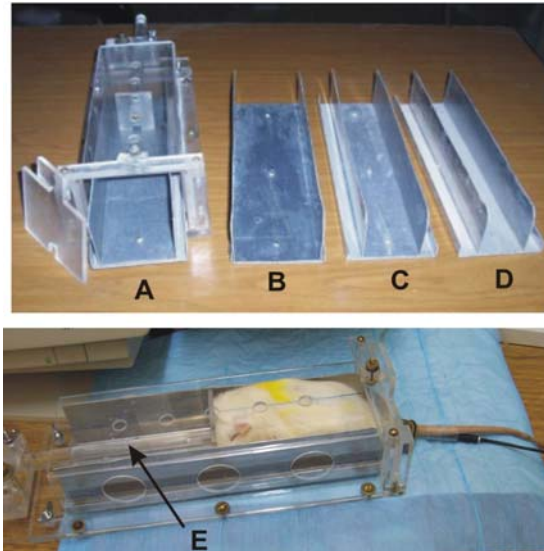
debía haber variado mucho más, pero no ocurrió así. Nuestra conclusión con respecto a este punto es que el calentamiento de la rata es efectivo en cuanto a lograr probablemente un aumento de flujo en la arteria de la cola y una mejor señal de pulso; pero la cola no fue, al menos en nuestra experiencia, un órgano termorregulador importante.



**Figura 29:** Experimentos para estudiar el rol de la arteria de la cola en la regulación de la temperatura corporal. Las ratas estaban colocadas en una incubadora para fijar la temperatura externa y con la cola saliendo de la misma a través de un agujero, y tenían implantado un sensor de temperatura en la cavidad abdominal para medir la temperatura interna. En los animales con la cola intacta (2 barras de la izquierda) un incremento de aproximadamente 20 °C en la temperatura externa significó un incremento de aproximadamente 2 °C en la temperatura interna. En los animales con la cola seccionada (2 barras de la derecha) los resultados fueron prácticamente iguales, demostrando que en nuestras condiciones experimentales la arteria de la cola no fue un factor determinante en la regulación de la temperatura corporal.

Para inmovilizar la rata durante la toma de presión existen comercialmente inmovilizadores construidos por lo general de acrílico, los cuales presentan la desventaja de no adaptarse a tamaños muy diferentes de animales, y eso crea la necesidad de tener varios modelos para usarlos con ratas de distinto peso. En nuestro caso diseñamos un inmovilizador de acrílico de doble entrada (Figura 30) de sección rectangular, que en uno de los extremos se cierra mediante una puerta deslizante que permite introducir la rata y que tiene un orificio para que la cola quede expuesta fuera del inmovilizador. Una vez introducida la rata, en el extremo opuesto hay un cierre móvil sostenido por una barra de acrílico (Figura 30 E) y un clamp ajustable, el cual puede empujarse hacia el extremo opuesto hasta hacer contacto con la cabeza de la rata y delimitando de esta forma un espacio adaptado a la longitud del animal. Para acomodar los distintos anchos del cuerpo de la rata en función del peso, se diseñaron 4

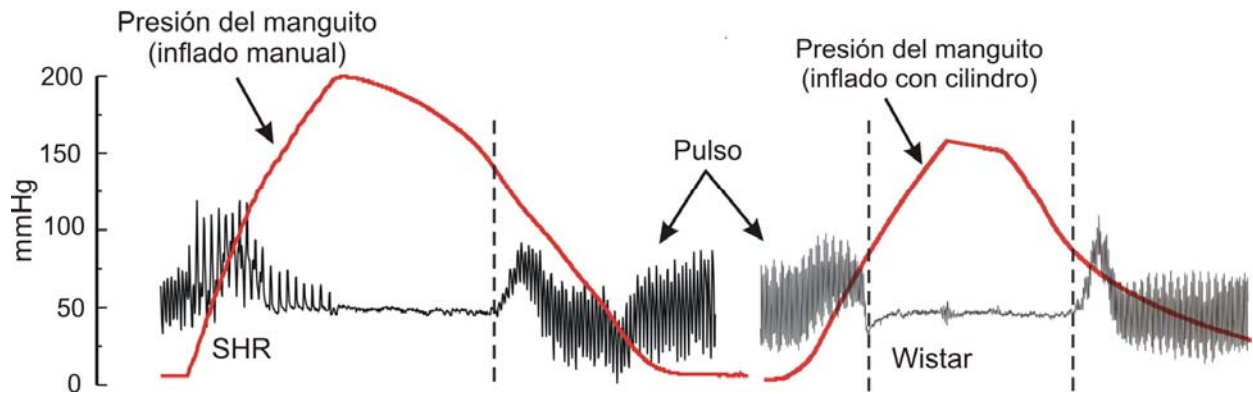
soportes metálicos deslizables (A, B, C y D en la Figura 30) los cuales pueden intercambiarse fácilmente de acuerdo al tamaño de la rata a medir. Este diseño nos permitió utilizar un único inmovilizador para ratas cuyos pesos presentaban notables diferencias entre sí. Para evitar la pérdida de calor al sacar al animal de la incubadora el inmovilizador conteniendo la rata puede colocarse sobre un manto térmico.



**Figura 30:** Dispositivo inmovilizador de ratas diseñado localmente para toma de presión arterial por método indirecto. Las dos innovaciones más importantes son: 1- contenedores deslizables de aluminio de distinto ancho (A, B, C y D en la figura superior) los cuales permiten adaptar una misma estructura de acrílico a distintos tamaños de animales, y 2- un tope deslizable sobre el animal una vez introducido en el inmovilizador (E en la figura inferior) que permite adaptar la longitud del contenedor al tamaño de la rata.

### **Sistemas especiales para controlar la presión en el manguito oclisor de flujo**

Cuando comenzamos las tomas de presión preliminares con el sistema de adquisición de datos y registros en computadora la presión en el manguito oclisor se elevaba manualmente mediante una pera de goma. Con este método notamos que se producía una irregularidad en el registro de pulso durante la oclusión, y que se debía presumiblemente a la compresión de la cola por los movimientos de la pera que se transmitían al manguito (Figura 31, registro izquierdo).



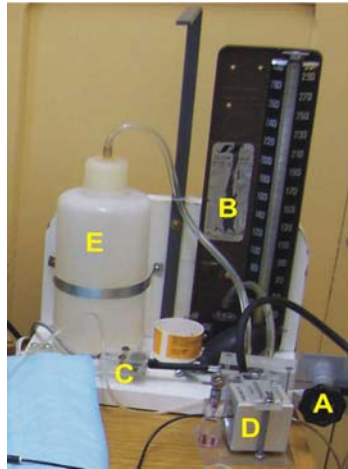
**Figura 31:** Se muestran dos tomas de presión arterial por método indirecto en la cola de una ratita SHR (izquierda) y de una ratita Wistar (derecha). En el registro de la izquierda el manguito compresor de la cola fue insuflado manualmente con pera de goma, y puede observarse que en cada insuflación se introducía un artefacto de movimiento que distorsionaba la onda de pulso e impedía medir la presión durante la insuflación; su valor podía calcularse solamente durante la descompresión. En el registro de la derecha la insuflación se hizo con un cilindro de aire comprimido y puede observarse que de esta forma se pudieron tomar los valores calculados durante la compresión y descompresión de la cola, sin los artefactos distorsivos observados con el método manual.

En las mediciones de presión arterial que se hacían previamente en el laboratorio, la lectura de la presión sistólica era un tanto imprecisa debido a la fracción de tiempo que se perdía entre que el operador detectaba la reaparición del pulso en el osciloscopio y leía el valor de presión en el manómetro de mercurio. De hecho, al revisar tomas de presión hechas en el pasado por personal técnico con este método, encontrábamos que todos los valores de presión sistólica terminaban en cero o en cinco, lo cual hacía que la mínima variación de presión discriminable fueran 5 mmHg. Como última desventaja cabe mencionar el hecho de que no quedaba ningún registro gráfico del valor de presión medido.

Para corregir estos inconvenientes diseñamos un sistema (Figura 32) con las siguientes características: 1- para subir la presión en el manguito ocluidor utilizamos gas proveniente de un tubo de oxígeno comprimido, y además del manómetro que posee el tubo agregamos un juego de válvulas de entrada y salida que permiten el inflado y desinflado del manguito ocluidor a un ritmo uniforme y en un tiempo breve (Figura 31, registro derecho). Adicionalmente el empleo de aire comprimido fatiga menos al operador cuando hay que tomar presión a un número elevado de ratas.

2- en lugar de tomar visualmente el valor de la presión sistólica en el manómetro de mercurio, se agregó un transductor de presión de estado sólido conectado mediante un tubo en T por un lado al sistema de válvulas que regulan el aire del cilindro y por el otro al manómetro de mercurio. La señal del transductor de presión de estado sólido se envía a una plaqueta analógico digital junto con la señal del transductor de pulso, y al

registrarlas en la misma pantalla resulta muy fácil definir el momento de aparición y desaparición del pulso en la arteria de la cola (Figura 31).



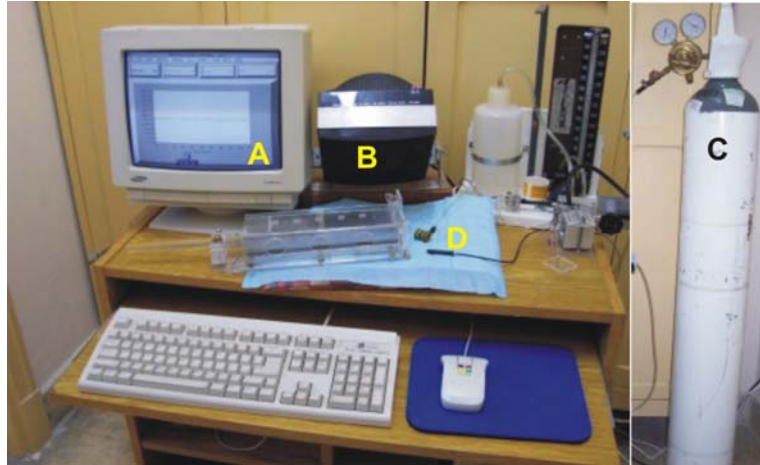
**Figura 32:** Sistema utilizado para inflar y desinflar el manguito oclisor de la arteria de la cola controlando al mismo tiempo la presión en su interior. Un sistema de válvulas (A) permite introducir aire comprimido en el manguito o darle salida al exterior. Un manómetro de mercurio (B) permite ver la presión dentro del manguito, la cual se registra al mismo tiempo mediante un transductor de presión de estado sólido (C) que permite el registro simultáneo de la señal de presión del manguito y de la señal del transductor de pulso (D). Una botella plástica conectada al sistema de tubos de insuflamiento (E) permite hacer más suaves las subidas y bajadas de presión en el manguito.

3- ambas señales, la de presión y la de pulso, se amplificaron y registraron mediante un sistema de adquisición de datos de manera que cada toma de presión se convierte en un archivo que permite leer la presión arterial con precisión de 1mmHg.

### **Adaptación del sistema de adquisición para la toma y procesamiento de las señales de presión**

El conjunto del sistema se montó en una mesa de computación que permite en caso de ser necesario su fácil traslado (Figura 33).





**Figura 33:** Aparato para tomar presión arterial indirecta en forma semi automatizada montado en la mesa que sostiene la computadora para adquisición de datos y los amplificadores que están ocultos por la mesa del teclado. En primer plano puede observarse el inmovilizador de ratas detallado en la figura 30 y atrás y a la derecha el sistema de válvulas para inflar y desinflar el manguito compresor que se mostró en la figura 32. En esta figura se ven además: A, el monitor donde se puede observar el registro on-line de pulso y presión, B, un calorizador para mantener la temperatura de la rata dentro del inmovilizador, C, el cilindro con oxígeno a presión, y D, el manguito compresor de la cola junto al detector de pulso.

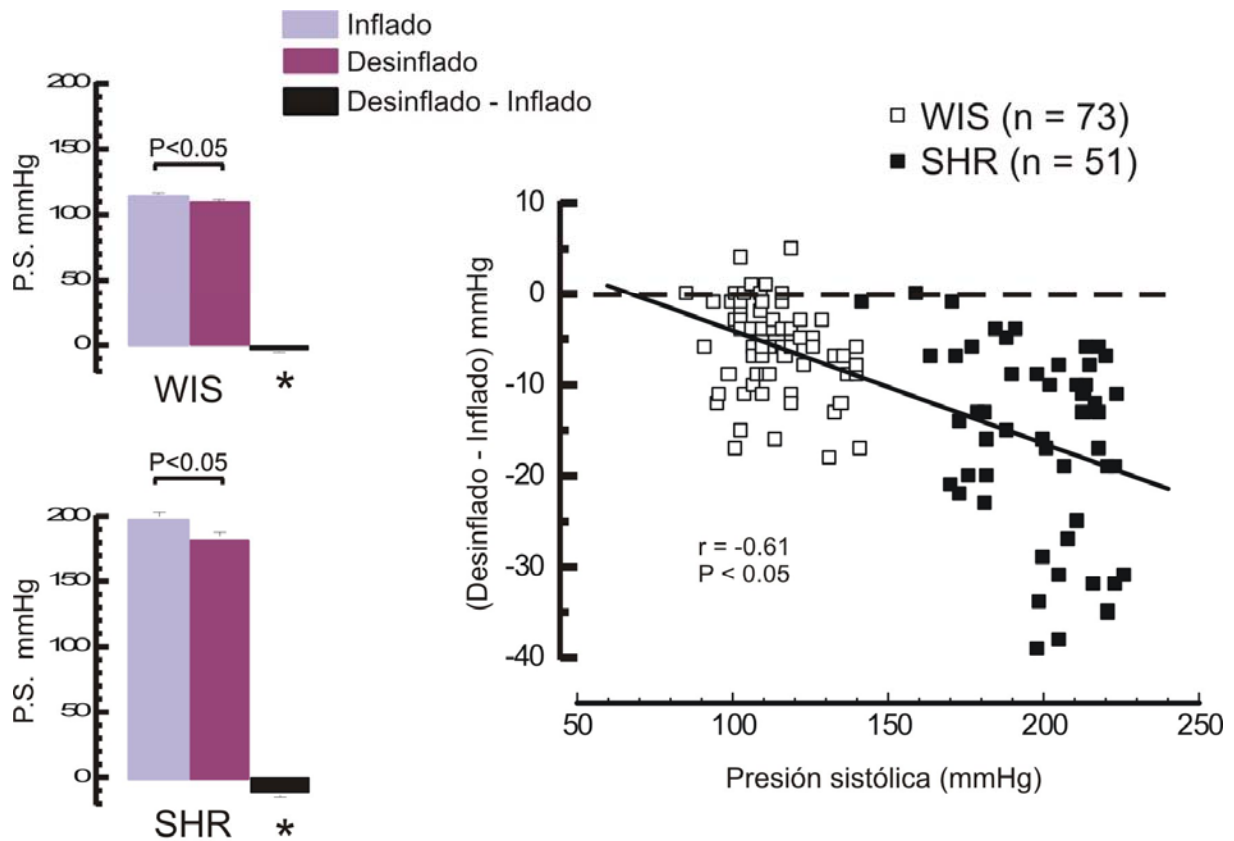
Utilizando la plaqueta DT-01 EZ, y el software Labtech Notebook Pro se configuró un programa de adquisición que adquiere las señales de pulso en la arteria de la cola y presión en el manguito ocluser a una frecuencia de muestreo de 30 Hz. Se introdujo un offset en la señal de pulso como para que se represente en la pantalla a un nivel coincidente con el de la señal de presión, y de esta forma se facilita la lectura posterior de los archivos.

Al disponer del aire comprimido y del sistema de válvulas para inflar y desinflar el manguito pudimos efectuar esa maniobra de manera más controlada y obtener así dos puntos experimentales que permiten estimar la presión arterial sistólica. Cuando la presión del manguito se viene elevando y supera a la presión sistólica el pulso desaparece, a veces precedido por un periodo de disminución de la señal, y posteriormente cuando se comienza a desinflar el manguito el pulso reaparece (Figura 31).

Cuando analizamos estos dos valores en un gran número de registros vimos que ambos no eran coincidentes, siendo por lo general el valor de desinflado algo menor al valor de inflado, y esta diferencia parecía ser tanto más pronunciada cuanto más elevada era la presión de la rata. Por este motivo decidimos estudiar este fenómeno un poco más en profundidad.

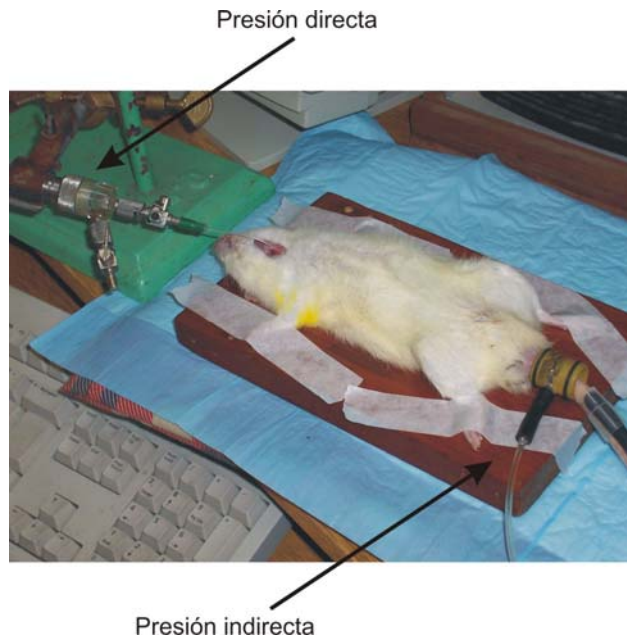
En primer lugar estudiamos la relación entre presión del animal y diferencia entre la presión estimada a través del inflado y del desinflado del manguito. Para ello

empleamos 73 ratas Wistar y 51 SHR en las cuales se tomo presión indirecta utilizando el equipo descrito en la Figura 33. Como puede verse en la Figura 34, barras de la izquierda, la diferencia entre la presión estimada por el desinflado e inflado del manguito fue de  $6 \pm 0,6$  mmHg en ratas Wistar y  $16 \pm 1,4$  mmHg en ratas SHR, es decir que la diferencia entre presión de desinflado e inflado se incrementa en función de la presión previa o basal del animal (Figura 34 grafico de la derecha), existiendo una correlación negativa y significativa entre ambas variables.



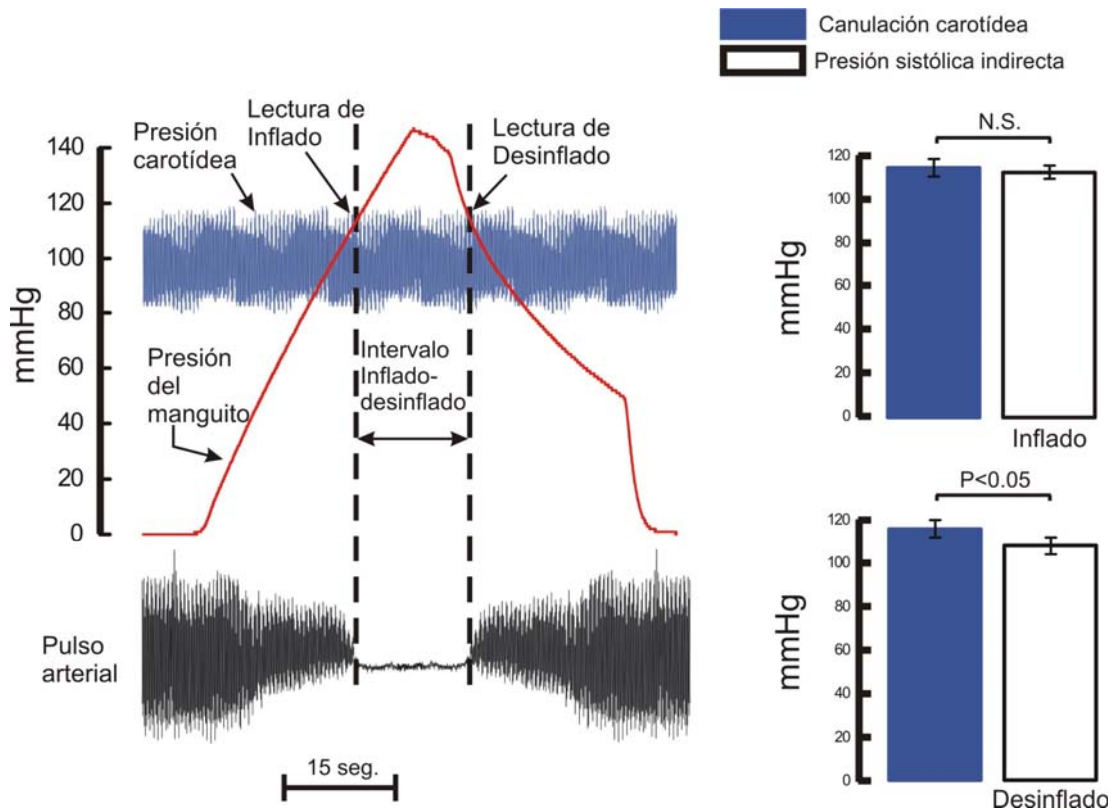
**Figura 34:** Presión arterial tomada utilizando el equipo mostrado en la figura 33 en 73 ratas Wistar y 51 SHR. En el panel de la izquierda se muestra que tanto para ratas Wistar como SHR el valor de presión arterial estimado durante el desinflado del manguito es significativamente inferior al estimado durante el inflado (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En el panel de la derecha se puede ver que esta diferencia entre compresión y descompresión aumenta significativamente (prueba de correlación de Pearson,  $p < 0,05$ ) en función de la presión arterial de la rata, siendo mucho más importante en ratas SHR. P.S.= Presión sistólica (adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2008).

El siguiente paso fue estudiar cuál de estos dos valores era más coincidente con la presión intravascular del animal. Para ello se empleó un preparado en ratas anestesiadas en las cuales se canulaba la arteria carótida izquierda y se unía el catéter a un transductor de presión; y simultáneamente se tomaba la presión indirecta en la cola en el mismo animal (Figura 35).



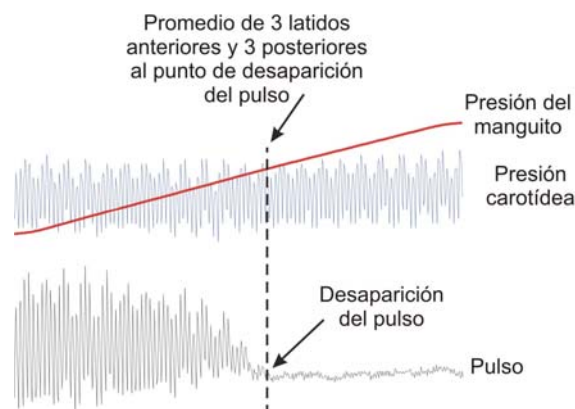
**Figura 35:** Rata anestesiada con pentobarbital sódico en la cual se miden en forma simultánea la presión arterial indirecta con el aparato mostrado en la figura 33, y la presión arterial directa mediante canulación carotídea y un transductor de presión Statham mostrado arriba y a la izquierda. La señal de presión arterial directa se amplifica y convierte a valores digitales los cuales son registrados en el mismo aparato de medición de presión indirecta.

En la Figura 36 parte izquierda se puede ver un registro simultáneo de presión directa e indirecta junto al registro de pulso en el que se observan claramente los valores de presión correspondientes al inflado y desinflado del manguito. Como se puede ver en las barras de la derecha de la Figura 36 el valor de la presión indirecta de inflado fue el que mejor coincidió con la presión directa sistólica.



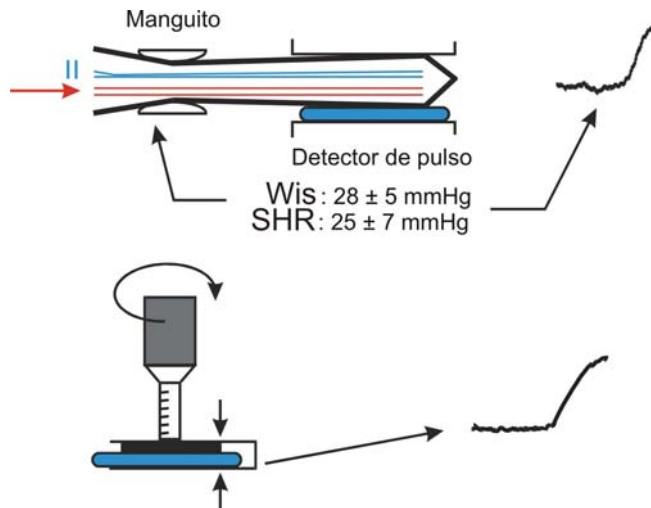
**Figura 36:** En el panel izquierdo se muestra un registro simultáneo de presión arterial directa e indirecta en un preparado como el mostrado en la figura 35. En el panel de la derecha se puede ver que la presión intracarotídea no presenta diferencias significativas con respecto a la presión indirecta tomada durante la compresión del manguito; pero es significativamente mayor a la presión indirecta tomada durante la descompresión del manguito (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ) (adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2008).

Para obtener el valor de la presión directa se promediaban 3 latidos anteriores y 3 latidos posteriores al punto de desaparición del pulso (Figura 37). Esto se hacía para compensar las variaciones principalmente respiratorias que presentaba la onda de presión directa a lo largo del tiempo.



**Figura 37:** En esta figura se muestra en detalle el método para leer la presión directa carotídea correspondiente al momento de desaparición del pulso en la arteria de la cola. Debido a las variaciones de la presión directa provocadas entre otras causas por los movimientos respiratorios y la actividad del centro vasomotor, se hizo necesario promediar los 3 latidos anteriores y los 3 posteriores a la desaparición o reaparición del pulso y tomar ese valor promedio como representativo de la presión directa en ese punto.

Otra cosa que nos llamó la atención fue el desvío de la línea de base que se presentaba tanto en los registros de inflado manual como mediante inflado por aire comprimido (Figura 31). Ese desvío se hacía más evidente en los momentos inmediatos a la desaparición y reaparición del pulso, que es cuando la cola cambia su volumen debido a la desaparición y reaparición del flujo arterial. Para comprobar si el transductor era capaz de responder a variaciones de más largo plazo en el volumen de la cola, se empleó el dispositivo que se muestra en la Figura 38 parte inferior.

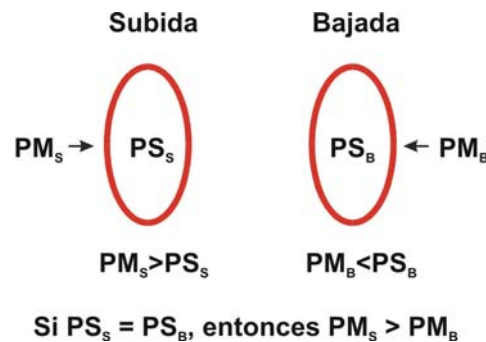


**Figura 38:** Experimento para explicar las desviaciones persistentes de la línea de base del transductor de pulso en los momentos previos a la desaparición y reaparición del pulso. En el panel superior esquematizamos un posible mecanismo que sería desencadenado cuando la presión del manguito es superior a la venosa pero aún inferior a la arterial. En estas condiciones la cola aumenta de volumen y ese aumento es detectado por el transductor de pulso como un desvío de la línea de base. En el panel inferior se observa el mismo transductor de pulso comprimido mediante un micrómetro, y en respuesta a esa compresión produce un desvío similar al esquematizado en el panel superior.

Como puede verse se utilizó un micrómetro unido a una especie de clamp de acrílico con el cual se podía aplicar una pequeña deformación permanente al bulbo de goma ubicado en el extremo del transductor de pulso. En el trazado de la parte derecha de la Figura 38 se puede observar que la compresión mediante el micrómetro logra un desvío aproximadamente similar al que ocurre al comprimir el manguito de la cola tanto en ratas normotensas como hipertensas (Figura 38 parte superior). Como conclusión podemos decir que en las condiciones adecuadas el transductor piezoeléctrico fue capaz de captar no solamente variaciones rápidas como las del pulso sino también cambios más estables en el volumen de la cola.

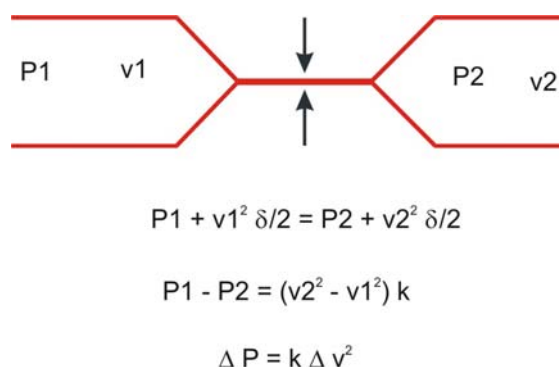
En este momento nos planteamos cuáles podrían ser el o los mecanismos que explicasen las diferencias entre las dos estimaciones de la presión:

- 1- Una posibilidad deriva del hecho de que la presión del manguito por definición debe ser superior a la sistólica para interrumpir el pulso, y levemente inferior a la sistólica para que el pulso reaparezca. Esto de por sí crea una diferencia entre los dos valores, pero probablemente la misma sería muy pequeña como para poder detectarla, aún con nuestro método semiautomatizado (Figura 39).



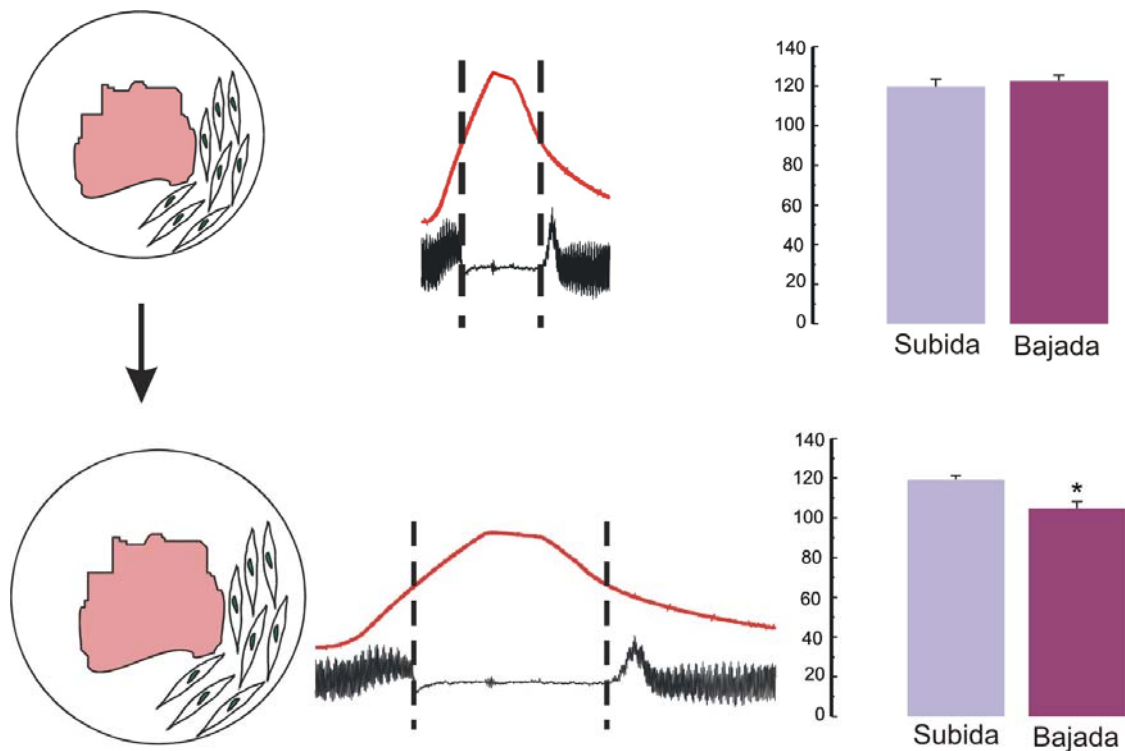
**Figura 39:** Se muestra como si la presión del manguito (PM) debe ser por definición un poco mayor que la de la arteria para que ésta se cierre, y un poco menor para que se abra, esto de por sí explicaría que la presión durante la descompresión sea menor que durante la compresión. Sin embargo la diferencia sería muy pequeña para ser detectada aún con el método descrito. PS=presión sistólica, S=subida, B=bajada.

- 2- Otra explicación deriva del hecho de que la presión arterial tiene un componente cinemático debido a la velocidad del flujo sanguíneo. Cuando la presión del manguito sube y la arteria se comprime la velocidad de flujo decrece hasta cero, aumentando el componente lateral o estático de la presión. Por el contrario, al descomprimir el manguito la sangre comienza a pasar a gran velocidad porque la superficie de sección está muy disminuída, y ese gran componente cinemático resta valor al componente lateral. Esta posibilidad ha sido comprobada en sistemas de circulación con tubos plásticos (Figura 40).



**Figura 40:** Esquema de una arteria ocluida en un segmento por un manguito compresor. En el momento en que la arteria se está cerrando el flujo va decreciendo progresivamente hasta cesar totalmente en la oclusión completa. En cambio cuando la arteria se libera por descompresión el flujo se acelera bruscamente y adquiere un gran componente hemodinámico que hace decrecer el componente lateral sobre las paredes del vaso. Este componente lateral disminuído llevaría a la disminución de la presión necesaria para ocluir la arteria y como consecuencia el valor leído durante la bajada sería menor. P= presión. V= velocidad. d= densidad. K= constante.

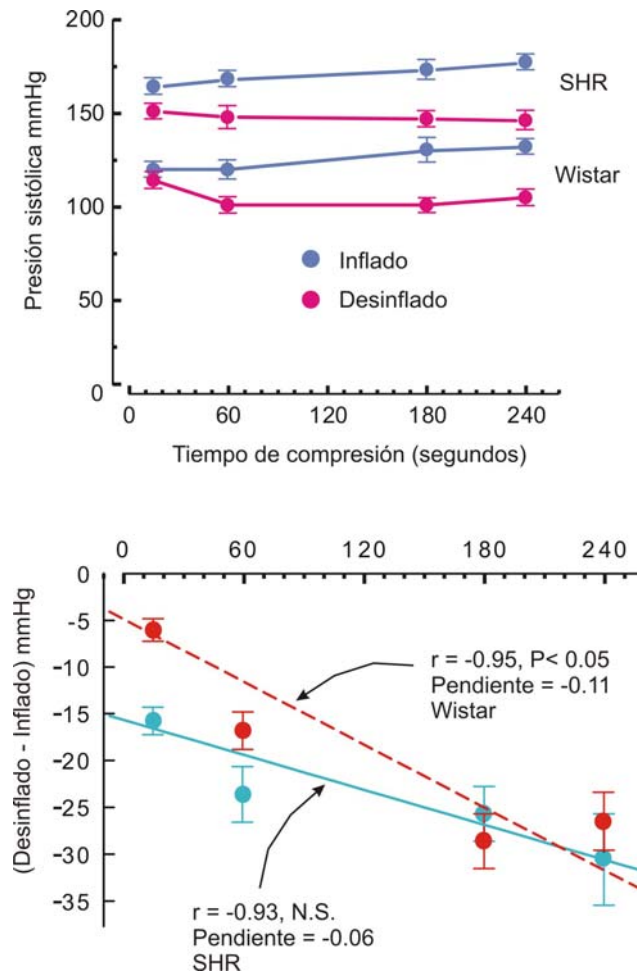
Las dos explicaciones anteriores son de índole puramente física y suponen que la arteria es un conducto inerte; pero en la realidad la misma tiene una pared contráctil formada por músculo liso y otros componentes, y eso permite enunciar una tercera hipótesis basada en la intervención de un vasodilatador de producción local. Cuando se infla el manguito y el flujo arterial se interrumpe habitualmente transcurren unos 15 segundos hasta que se descomprime la arteria y el flujo se restituye. Durante este período de isquemia sería factible que la arteria de la cola y sus tejidos adyacentes liberaran algún agente vasodilatador, que relajaría el músculo liso arterial. Cuando se descomprime el manguito y se restituye el flujo la arteria tendría ahora una resistencia menor y por lo tanto la presión estimada también sería menor (Figura 41).



**Figura 41:** Figura que muestra la hipótesis de la acumulación de un vasodilatador como consecuencia de la compresión de la arteria de la cola. El panel superior muestra una determinación de presión indirecta con un tiempo de compresión corto, con escasa o nula acumulación de vasodilatador; esto hace que la presión de subida y de bajada sean iguales (barras de la derecha). El panel inferior muestra idénticas determinaciones con un tiempo de compresión largo, el cual provoca acumulación de vasodilatador y una presión de bajada significativamente inferior a la de subida, barras de la derecha (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ).

Con el objeto de examinar más en detalle la posibilidad de que un vasodilatador local fuera responsable de la diferencia entre los valores de inflado y desinflado realizamos experimentos de medición de la presión arterial por el método indirecto incrementando el tiempo de oclusión de la arteria de la cola. Como se mostró en la Figura 36 el tiempo usual de compresión es de alrededor de 15 segundos; si la isquemia provoca la

liberación de un vasodilatador podemos suponer que esa liberación debe ser función del tiempo de oclusión arterial. En nuestro experimento comparamos, en 15 ratas Wistar y 16 ratas SHR, tiempos de oclusión de 15, 60, 180 y 240 segundos, siendo este último valor el más elevado que soportaba la rata sin manifestar molestias. En todas las ratas se ensayaron los cuatro tiempos de oclusión en forma alternada y con un descanso de al menos una hora entre dos mediciones cualesquiera. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 42.



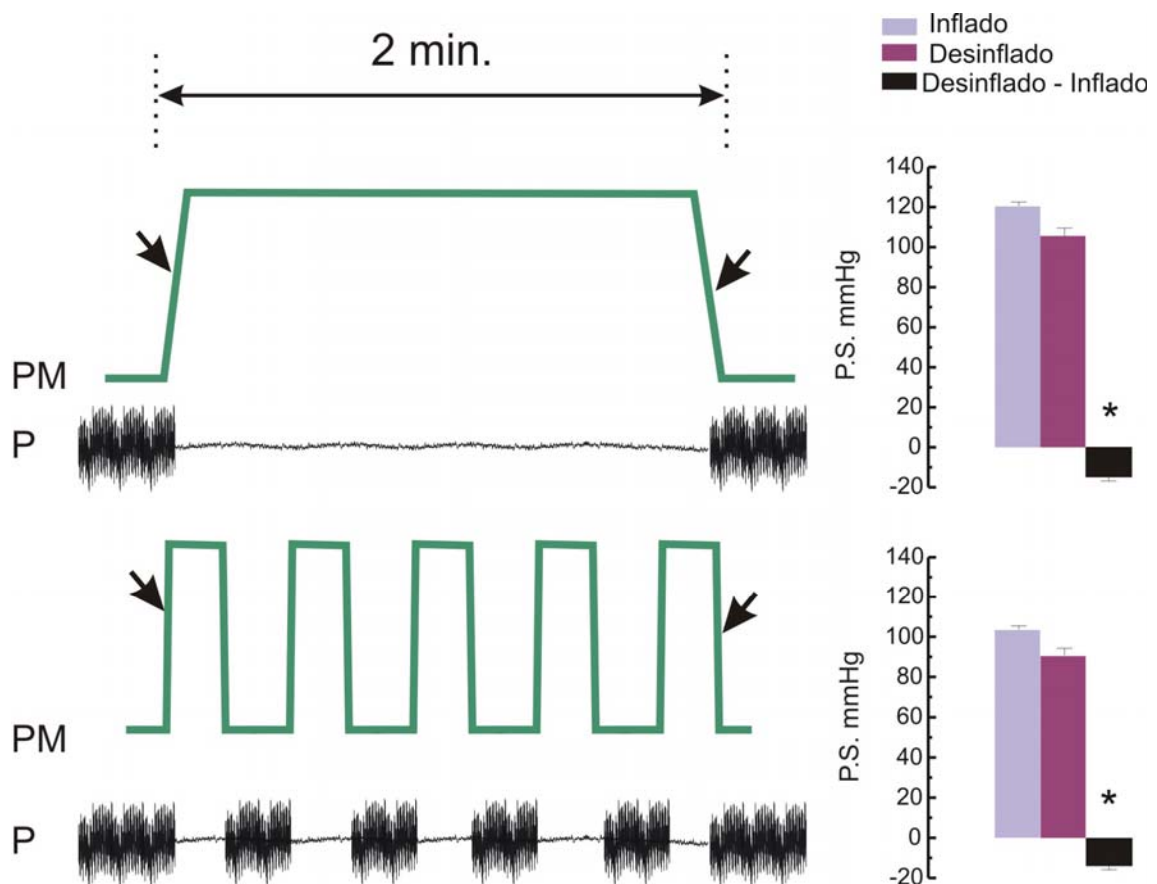
**Figura 42:** Efecto de la duración de la compresión sobre la diferencia entre la presión de subida y de bajada en ratas Wistar ( $n=15$ ) y SHR ( $n=16$ ). En el panel superior se ve como la diferencia entre ambos valores en condiciones basales (15 segundos de compresión) es mayor en SHR que en Wistar, y en ambos tipos de ratas se incrementa progresivamente a medida que el tiempo de compresión aumenta hasta 240 segundos. El panel inferior muestra la correlación negativa existente entre ambos valores en los dos tipos de ratas, alcanzando significación solamente en ratas normotensas (test de correlación de Pearson,  $p < 0,05$ ) (adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2008).

Como puede verse, tanto en ratas SHR como Wistar la diferencia entre los valores de inflado y desinflado se fue haciendo más pronunciada a medida que aumentaba el tiempo de oclusión. No obstante, los valores hallados con el menor tiempo de oclusión (15 segundos) fueron mayores en SHR que en Wistar; por lo tanto si lo expresamos



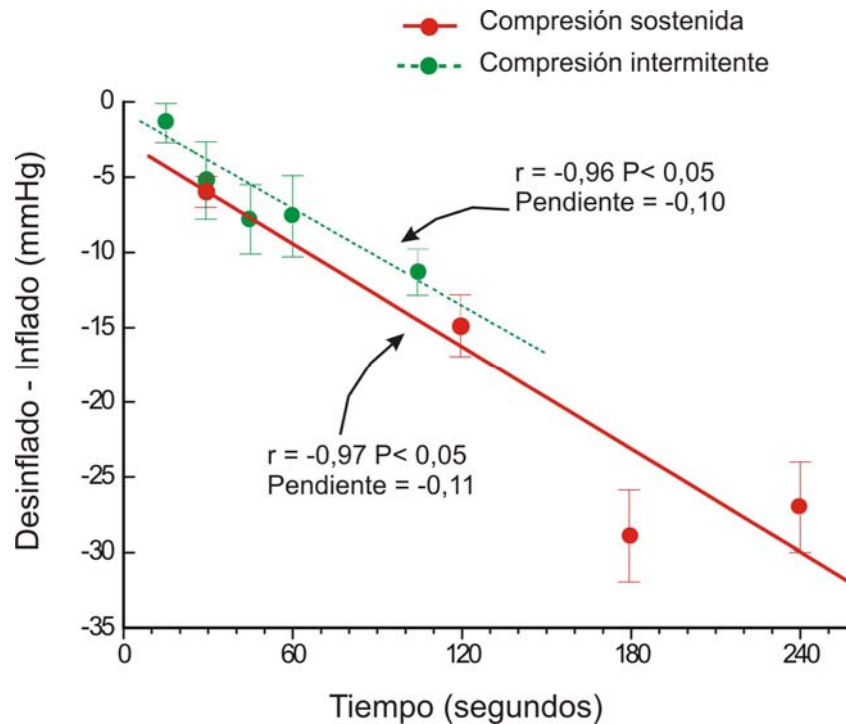
como por ciento de incremento con respecto a este valor, a los 240 segundos la diferencia entre presión de inflado y desinflado se incrementó el doble en las Wistar con respecto a las SHR.

A los resultados que se acaban de describir se les podría criticar el hecho de haber empleado oclusiones continuadas de la arteria de la cola, situación que raramente se va a dar en la práctica. Por el contrario, lo más común que podría ocurrir es que un operador no experto deba reiterar varias veces una toma con un tiempo de oclusión corto en cada una de las oportunidades. Por lo tanto diseñamos un experimento para analizar si una oclusión de corta duración (15 segundos) repetida reiteradas veces tiene el mismo efecto que una oclusión sostenida. Un esquema del protocolo experimental se puede ver en la Figura 43.



**Figura 43:** Comparación entre distintas modalidades de compresión en la arteria de la cola y su efecto sobre la diferencia entre presión de subida y de bajada. En el panel superior se muestra una determinación de presión con 2 minutos de compresión sostenida, y en el gráfico de barras de la derecha se muestra un descenso significativo de la presión de bajada con respecto a la de subida (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En el panel inferior se ve que 5 compresiones parciales durante un período de 2 minutos produjeron un efecto igual que en el caso anterior sobre la diferencia entre presión de subida y bajada, como se muestra en las barras de la derecha (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). P.S.=presión sistólica. PM= presión del manguito. P= pulso.

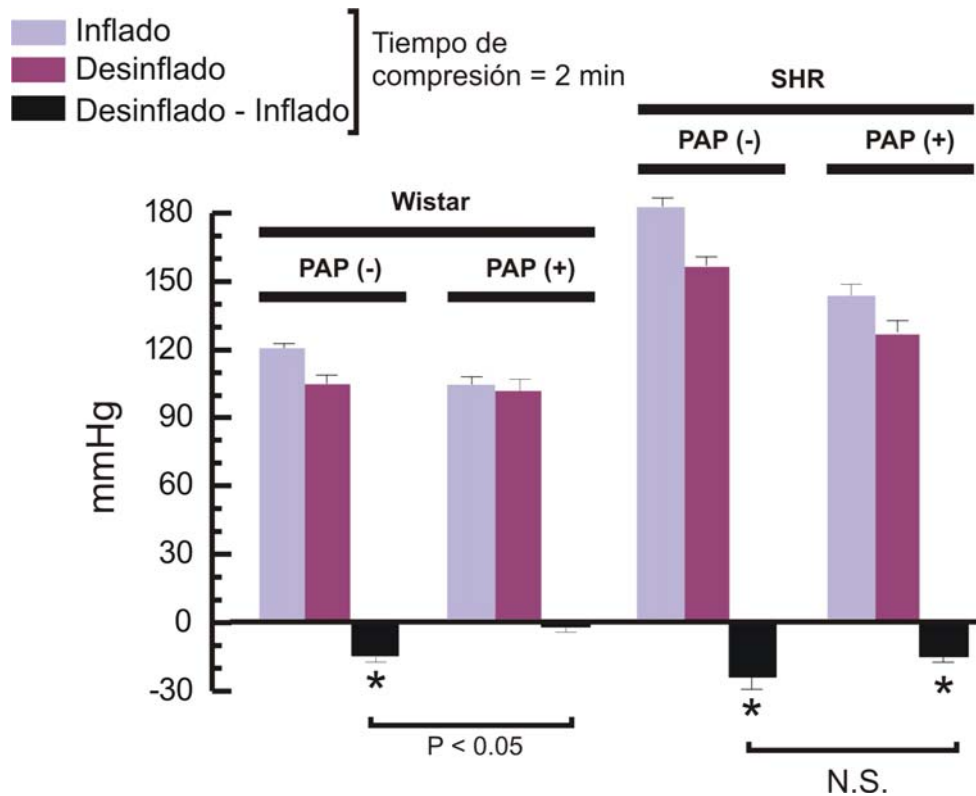
Como muestra la Figura 44, tanto varias oclusiones intermitentes como una oclusión sostenida por un tiempo equivalente produjeron un incremento comparable de la diferencia entre la presión de inflado y de desinflado.



**Figura 44:** Se muestra que la correlación negativa entre presión de subida menos presión de bajada y tiempo de compresión no cambia en forma significativa ya sea que la compresión de la cola sea sostenida como se mostró en la figuras 42 y 43, o intermitente como se mostró en la figura 43. En ambos casos las correlaciones son significativas (test de correlación de Pearson,  $p < 0,05$ ). (adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2007).

En vista de que estos experimentos sugerían realmente la posibilidad de la participación de un vasodilatador local, decidimos efectuar una comprobación adicional dilatando el músculo liso al máximo por administración de papaverina. Nuestra hipótesis era que si eliminábamos la respuesta contráctil del músculo liso la efectividad del vasodilatador liberado localmente iba a disminuir y por lo tanto la diferencia entre el valor de inflado y desinflado podría atenuarse o desaparecer.

Los resultados de estos experimentos pueden verse en la Figura 45. Se administró 75 mg/ Kg de papaverina por vía intraperitoneal en 12 ratas Wistar y 7 SHR y en cada rata se determinó dos veces la presión indirecta empleando un tiempo de oclusión de 2 minutos como para hacer bien evidente el fenómeno estudiado.



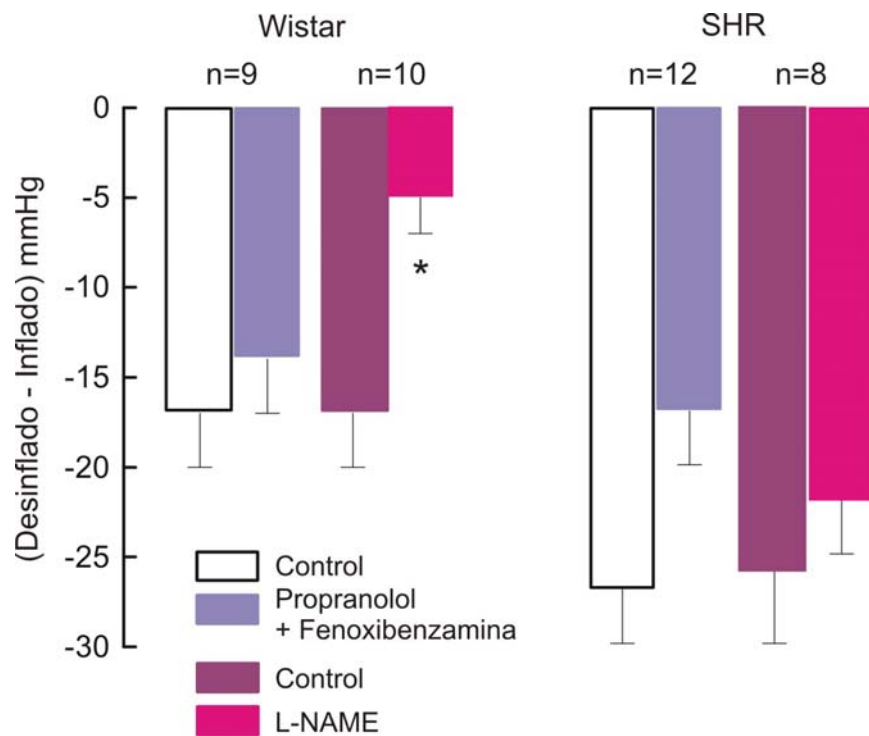
**Figura 45:** Efecto de la administración de papaverina (PAP, dilatador inespecífico) sobre la diferencia entre presión de subida y de bajada en ratas Wistar ( $n=12$ ) y SHR ( $n=7$ ). A la izquierda se muestra que en ratas Wistar la administración de papaverina hizo desaparecer la diferencia significativa que existía entre ambas presiones (test de  $t$  por apareadas,  $p < 0,05$ ). A la derecha se muestra que en ratas SHR la administración de papaverina hizo disminuir la diferencia entre presión de subida y bajada pero no en forma significativa, ya que aún persistió una diferencia parcial en presencia del vasodilatador (test de  $t$  por apareadas,  $p < 0,05$ ). (Adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2008).

Como muestra la Figura 45 en las ratas Wistar la diferencia entre presión de desinflado e inflado prácticamente desapareció como consecuencia de la administración de papaverina. Por el contrario en las ratas SHR esta diferencia solamente se atenuó como consecuencia de la inyección de papaverina, pero continuó existiendo con valores significativos. Nuestra interpretación de estos resultados es que en las ratas Wistar al ser menor el valor de presión arterial predomina el componente vasodilatador local por sobre el efecto físico *per se*, pero en las SHR donde el valor de presión es mucho mayor también crece la importancia relativa del efecto físico y el efecto vasodilatador se hace proporcionalmente menos importante (Figura 40).

Con el objeto de identificar cual vasodilatador local podía ser responsable del fenómeno que estábamos estudiando hicimos una nueva serie de experimentos ensayando bloqueantes de los receptores alfa y beta adrenérgicos (propranolol y fenoxibenzamina) y de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME). La razón para usar estos bloqueantes y no otros fue por un lado que el sistema simpático es el principal

controlador del tono vascular a través del centro vasomotor, y por otro que el óxido nítrico es un importante vasodilatador local elaborado por el endotelio vascular; ambos podían estar participando en nuestras condiciones experimentales.

Como se observa en la Figura 46 en un grupo de 9 ratas Wistar y 12 SHR se practicaron tomas sucesivas de presión indirecta, la primera como control y la segunda previa inyección intraperitoneal de 4 mg/kg de fenoxibenzamina y 10 mg/kg de propranolol. En otro grupo de 10 ratas Wistar y 8 SHR también se hizo una doble toma de presión inyectando previo a la segunda toma una dosis intraperitoneal de 100 mg/kg de L-NAME (Moncada y Higgs, 2006). En todos los experimentos se utilizó un tiempo de oclusión de 2 minutos para magnificar la diferencia entre los valores de inflado y desinflado.



**Figura 46:** Efecto del bloqueo de: a- los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos con fenoxibenzamina y propranolol respectivamente, y b- la óxido nítrico sintetasa con L-NAME, sobre la diferencia entre la presión de subida y bajada en ratas Wistar y SHR. En ratas Wistar (panel izquierdo) el bloqueo de los receptores adrenérgicos no provocó cambios significativos, mientras que el bloqueo de la óxido nítrico sintetasa disminuyó significativamente dicha diferencia (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En ratas SHR (panel derecho) ni el bloqueo adrenérgico ni el de la óxido nítrico sintetasa disminuyeron significativamente la diferencia entre presión de subida y bajada, si bien el bloqueo adrenérgico tuvo un efecto cuantitativamente mayor. (Adaptado de: Fritz y Rinaldi, 2008).

En las ratas Wistar observamos que la inyección de los bloqueantes adrenérgicos no suprimió la diferencia entre los valores de inflado y desinflado; pero en las SHR el efecto de estos bloqueantes, aunque no alcanzó valores significativos, fue mucho mayor que en las ratas Wistar. Por el contrario en las ratas Wistar la inyección de L-

NAME disminuyó significativamente la diferencia entre presión de desinflado e inflado, pero en las SHR la inyección de L-NAME no tuvo efecto. Nuestra interpretación de estos resultados es que en ratas normotensas el fenómeno de la diferencia entre los valores de inflado y desinflado se debe en su mayor parte a la liberación local de óxido nítrico y su efecto supera totalmente a la participación simpática. En las SHR la liberación de óxido nítrico, por el contrario, no tiene mayor influencia, pero sí adquiere una mayor importancia el control del sistema simpático. Esto último podría deberse a la conocida depresión de la función endotelial que existe en las ratas SHR lo cual llevaría al predominio de otros factores de control vascular (Panza y col., 1993).

Como comprobación adicional de la participación de la óxido nítrico sintetasa (NOS), en 12 ratas Wistar estimamos la actividad total de la NOs por el método de la NADPH-diaforasa en 12 arterias de la cola extraídas luego de 2 minutos de oclusión arterial. El análisis histoquímico mostró un incremento significativo en los valores de absorción desde  $0,1210 \pm 0,0042$  en arterias control hasta  $0,1539 \pm 0,0081$  en arterias ocluidas durante 2 minutos.

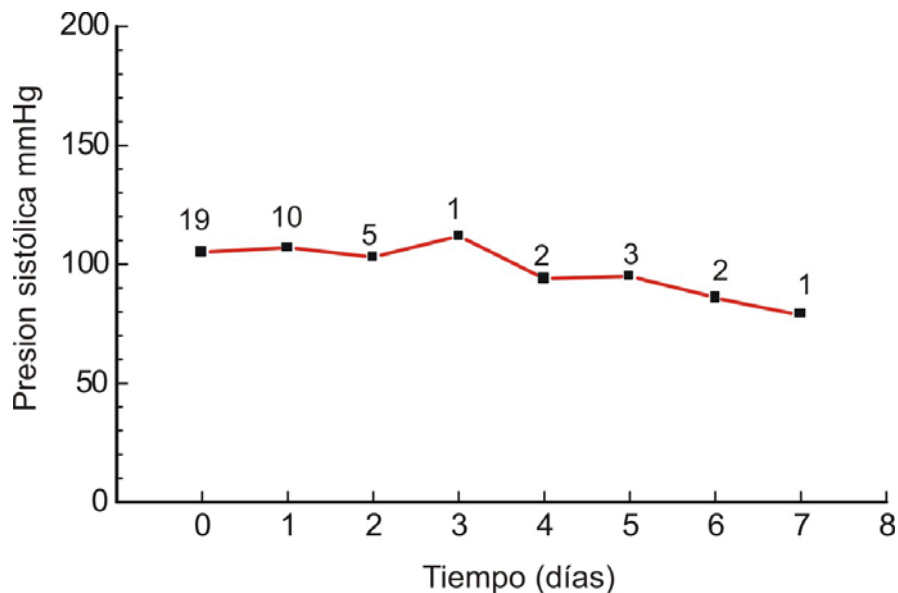
Como conclusión aplicable a la práctica, en la toma indirecta de presión arterial la oclusión de la arteria de la cola se debe hacer tan breve como sea posible y utilizar de preferencia la lectura obtenida durante el inflado del manguito como mejor estimación de la presión sistólica.

### **Toma de presión por métodos directos, utilizando catéteres flexibles, implantados mediante un equipamiento que permita el libre movimiento del animal**

En los experimentos con administración de amaranto por sonda orogástrica en animales conscientes observamos que tanto este procedimiento como la toma indirecta de presión arterial eran bastante molestos para el animal, causaban una variabilidad muy grande en los valores de presión y no nos permitía ver el efecto hipotensor del hidrolizado de amaranto salvo a dosis muy elevadas.

Por esta razón buscamos implementar un método que permitiera 1- la toma directa intravascular de la presión arterial, y 2- la administración intragástrica directa del hidrolizado de amaranto a través de una gastrostomía. Esta última no debía ser del tipo tradicional con salida a la pared abdominal adyacente sino que pretendíamos un recorrido de la sonda que permitiese administrar el hidrolizado sin que la rata lo pudiera percibir. Con esta finalidad, como se describió en materiales y métodos, agregamos

una sonda gástrica en paralelo con el catéter arterial y exteriorizamos a ambos mediante un doble resorte (Figura 16). Para comprobar si este equipo permitía obtener tomas de presión durante un tiempo más o menos prolongado efectuamos los experimentos que se describen en la Figura 47.

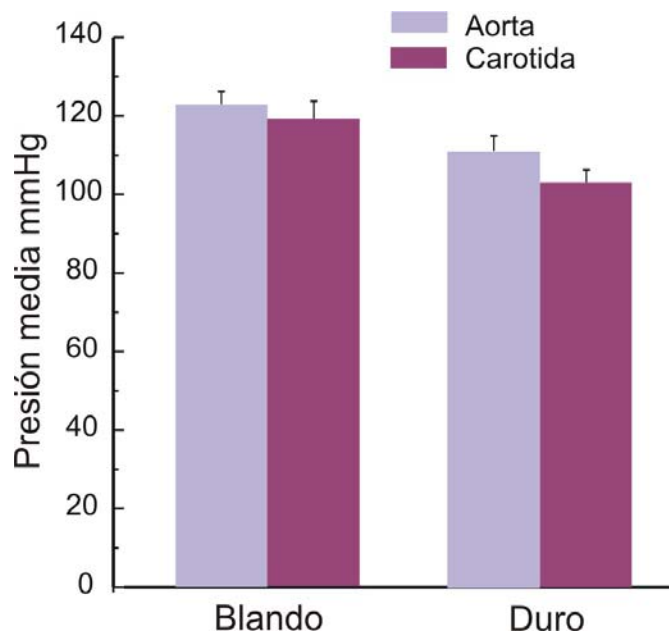


**Figura 47:** Ratas normotensas conscientes con canulación carotídea usando el equipo de registro descrito en la Figura 16. En estas ratas simplemente se midió la presión arterial media cada 24 hs sin inyectar ninguna droga ya que solamente se buscaba comprobar la duración del preparado. Como puede verse durante los primeros 3 días la presión no se modifica con respecto al control. Los números encima de los símbolos indican el número de mediciones.

Como se puede observar en esta figura los valores de presión directa son medibles sin decaimiento con respecto al control (tomado como el primer valor de presión directa luego de colocar el catéter) hasta 48 horas posteriores a la operación. En todos los experimentos en los cuales empleamos esta técnica, las mediciones las efectuamos a las 24 horas garantizando así estar dentro de un período confiable en cuanto a la reproducibilidad de las lecturas.

Como el catéter empleado para la medición de presión directa era de una longitud bastante importante (38 cm) y con una luz de dimensiones reducidas (0,5 mm) quisimos verificar con que fidelidad se transmitía la onda de presión arterial. Asimismo quisimos comparar entre sí las propiedades de los catéteres de teflón, que son más rígidos y más manejables durante la cateterización, con respecto a los catéteres de tygon de iguales dimensiones que son menos manejables pero tienen menor riesgo de lesionar el vaso. Con este objeto diseñamos experimentos en 19 ratas anestesiadas en las cuales se exteriorizaba el catéter carotídeo de la misma forma que en los animales

conscientes y luego se abría el abdomen y se canulaba la aorta descendente con una aguja metálica del mayor calibre posible (1,75 mm). El transductor de presión se conectaba alternativamente a ambos vasos, obteniendo así un trazado de presión aórtica y otro de presión carotídea casi simultáneos en el mismo animal. En 11 experimentos el catéter intracarotídeo era de tygon (blando) y en los 8 restantes de teflón (duro) (Figura 48).

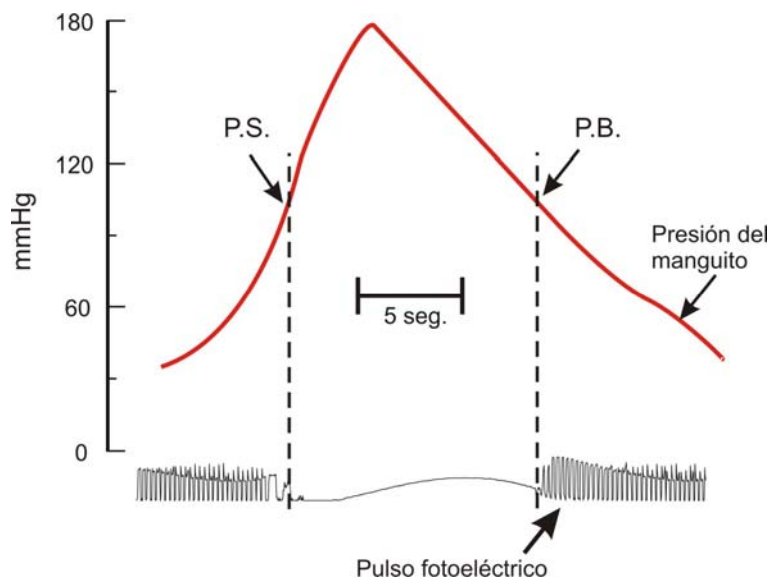


**Figura 48:** Comparación entre las presiones medias obtenidas con dos catéteres de 0,75 mm de diámetro exterior, uno blando (de tygon) y otro duro (de teflón), ambos insertados en la carótida mediante un procedimiento similar al descrito en la Figura 16. En ambos casos las presiones medias carotídeas se compararon con las presiones medias aórticas obtenidas a través de una aguja de acero inoxidable de 1,75 mm de diámetro insertada en la aorta abdominal. Como puede verse con ambos tipos de catéteres la presión media carotídea fue levemente inferior a la aórtica pero esa diferencia no fue significativa en ninguno de los casos.

En esta Figura podemos ver que el valor medio de presión aórtica obtenido con la aguja metálica, que al ser muy rígida y de gran calibre interior podría considerarse como el más representativo de la presión arterial, no fue significativamente diferente del valor medio obtenido con ambos tipos de catéteres. Lo que sí presentó diferencias importantes fue la presión diferencial, que en el caso de los catéteres carotídeos se redujo entre un 50 y 60 % con respecto a la medida con la aguja aórtica (datos no ilustrados). Este resultado era previsible y a la vez inevitable en función de los catéteres delgados que había que utilizar, y determinó que en todos los experimentos de presión directa utilizáramos la presión media como mejor estimación de la presión de la rata.

### Evaluación y comparación de sistemas menos convencionales de detección del pulso arterial, como el fotoeléctrico

En 3 experimentos en ratas Wistar tomamos la presión en la cola por método indirecto detectando el pulso en forma simultánea con un transductor piezoeléctrico y otro fotoeléctrico, obteniendo  $110 \pm 5,3$  mmHg en el primer caso y  $99 \pm 7,7$  mmHg en el segundo caso. En general se vió que la señal del transductor fotoeléctrico era de menor voltaje y se obtenía en forma más irregular que la del transductor piezoeléctrico. Si bien fue posible obtener algunas medidas satisfactorias de presión arterial (Figura 49) por el método fotoeléctrico, en general ha resultado más práctico y confiable el método piezoeléctrico, por lo cual fue el que usamos en la mayoría de los experimentos de este trabajo.



**Figura 49:** Medición de presión sistólica por método indirecto utilizando un detector fotoeléctrico de pulso en lugar del detector piezoeléctrico tradicional. Puede observarse la desaparición del pulso cuando la presión del manguito supera a la arterial y su reaparición al desinflar el manguito. En general la señal de pulso obtenida con este método fue de menor intensidad y más irregular que la del transductor piezoeléctrico. P.S: presión de subida. P.B: presión de bajada.

## 2- Actividad inhibidora de la ECA por hidrolizados proteicos de amaranto. Ensayos *in Vitro*

Los aislados proteicos de *A. mantegazzianus* mostraron una actividad inhibidora de la ECA *in Vitro* mayor de 0 % ( $p < 0,01$ ); por lo tanto puede concluirse que el aislado proteico contiene especies solubles a pH 8,3 y a elevada fuerza iónica capaces de inhibir a la ECA, sugiriendo la presencia de péptidos inhibidores preexistentes. Sin embargo la administración de estos aislados *in vivo* no tuvo efecto sobre la presión



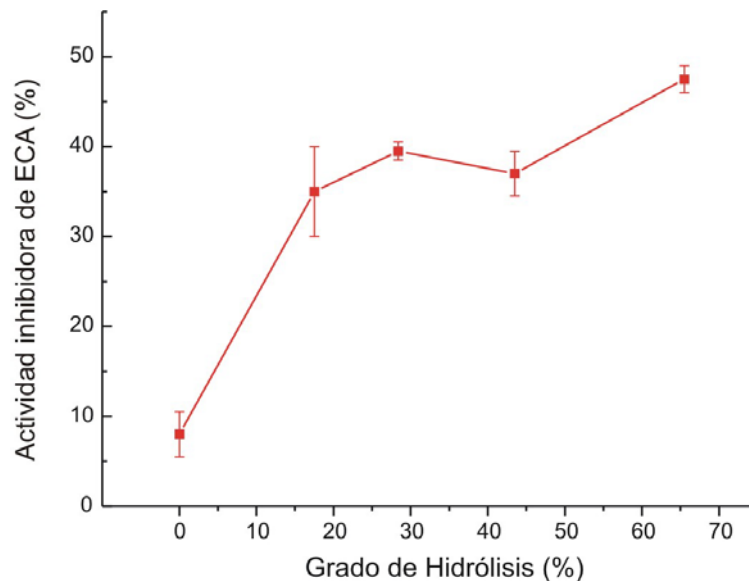
arterial (datos no ilustrados). En la mayoría de los casos el tratamiento proteolítico del aislado permitió obtener hidrolizados con actividad inhibidora de la ECA mas elevada (Tabla 5). Las excepciones fueron el hidrolizado de quimotripsina 0,1 mg/ml durante 4 horas y el hidrolizado de tripsina 0,05 mg/ml durante 4 horas, los cuales mostraron una actividad inhibidora menor que la del aislado no hidrolizado. El hidrolizado con la actividad inhibidora más alta fue el obtenido con alcalasa 0,08 % durante 4 horas y éste fue el que se utilizó en la mayoría de los experimentos en ratas *in vivo* e *in Vitro* (Tabla 5).

**Tabla 5:** Actividad inhibidora de ECA por los hidrolizados proteicos de amaranto obtenidos con diferentes proteasas y en distintas condiciones. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al aislado sin hidrolizar se muestran con: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) y \*\*\* ( $p < 0,0001$ ). La tercer columna muestra el número de preparados ensayados (Fritz y col., 2009).

Hidrolizado	% de inhibición de ECA	n
Aislado sin hidrolizar	10,8 ± 2,1	7
Pronasa 0,1 mg/mL 4 hs	23,9 ± 4,2 **	6
Papaina 4 hs.	44,0 ± 5,2 ***	4
Tripsina 3180 U/mL 4 hs	16,3 ± 1,5 *	7
Quimotripsina 0,3 mg/mL 4 hs	53,9	1
Quimotripsina 0,1 mg/mL 4 hs	0,2 ± 4,1 *	2
Tripsina 0,3 mg/mL 4 hs	37,3 ± 11,5 **	2
Tripsina 0,2 mg/mL 4 hs	34,0 ± 6,4 **	7
Tripsina 0,1 mg/mL 4 hs	43,2 ± 2,4 ***	4
Tripsina 0,05 mg/mL 4 hs	3,8 ± 2,5 *	3
Alcalasa 0,08 % 4 hs	74,5 ± 2,0 ***	2

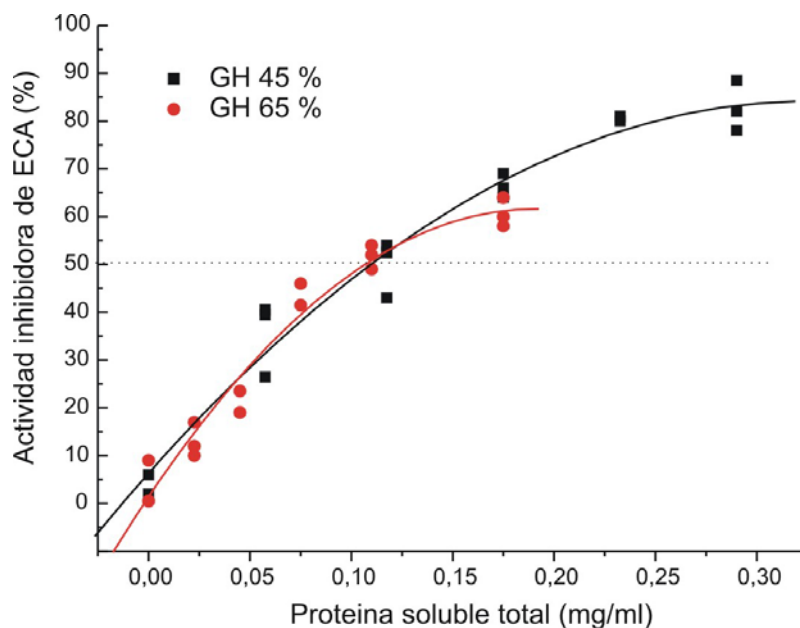
Para obtener un hidrolizado con la máxima actividad inhibidora de ECA *in vitro*, se analizó el efecto del grado de hidrólisis sobre la actividad biológica utilizando alcalasa ya que como vimos fue la proteasa más efectiva. La Figura 50 muestra la inhibición de ECA por los hidrolizados proteicos de *A. mantegazzianus* en función del grado de hidrólisis con alcalasa, expresando los resultados como porcentaje de inhibición cada 0,1 mg/ml de proteína soluble. Todos los hidrolizados mostraron una actividad inhibidora sustancialmente mayor que la del aislado no hidrolizado, siendo el aislado con 65 % de grado de hidrólisis el que mostró la mayor actividad. No se encontró

diferencia estadísticamente significativa entre los hidrolizados de 17, 28 y 45 % de grado de hidrólisis. Estos resultados confirman la utilidad del tratamiento proteolítico para la obtención de péptidos inhibidores de ECA.



**Figura 50:** Actividad inhibidora de ECA de un hidrolizado obtenido con alcalasa en función del grado de hidrólisis (Fritz y col., 2009).

En la Figura 51 se ven las curvas dosis-respuesta para los hidrolizados de 45 y 65 % de grado de hidrólisis, siendo los valores de  $EC_{50}$  indistinguibles entre ellos ( $0,12 \pm 0,02$  mg/ml de proteína soluble, con límite de confianza del 95 %). Teniendo en cuenta el peso molecular promedio de los péptidos del hidrolizado, los valores de  $EC_{50}$  en base molar para los hidrolizados de 45 y 65 % son de 415 y 600  $\mu$ m respectivamente.



**Figura 51:** determinación de la concentración inhibidora 50% ( $EC_{50}$ ) de hidrolizados obtenidos con alcalasa con 45 y 65 % de grado de hidrólisis. (Fritz y col., 2009).

### **3- Estudio del posible efecto hipotensor de hidrolizados proteicos de amaranto en modelos animales de hipertensión arterial**

Como se detalló en objetivos, se planeó evaluar el posible efecto hipotensor del amaranto en cuatro modelos experimentales en ratas:

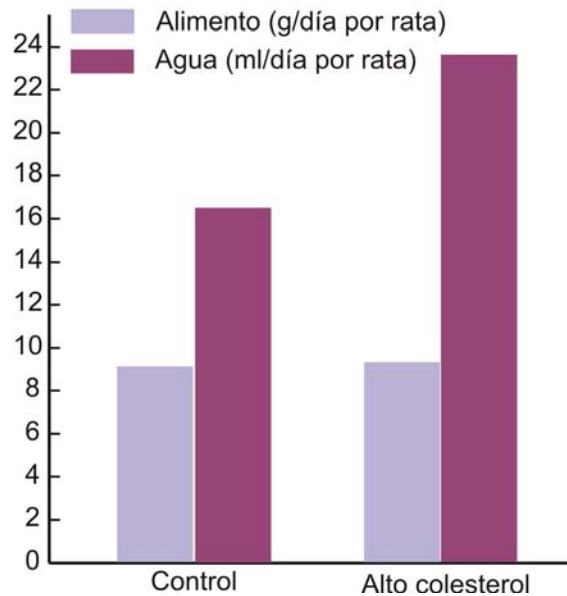
- a- modelo de alto colesterol
- b- modelo de ratas genéticamente hipertensas y sus controles normotensos.
- c- modelo de ratas hipertensas renales
- d- modelo de ratas hipertensas por administración de fructosa

#### **a- Modelo de alto colesterol**

Como se vió en métodos, se trabajó con un lote de 10 ratas Wistar con alimentación normal y otras 10 alimentadas con una dieta con el agregado de 1% de colesterol. Se detallan a continuación los resultados obtenidos en los principales parámetros medidos.

#### Consumo de Alimento y Agua

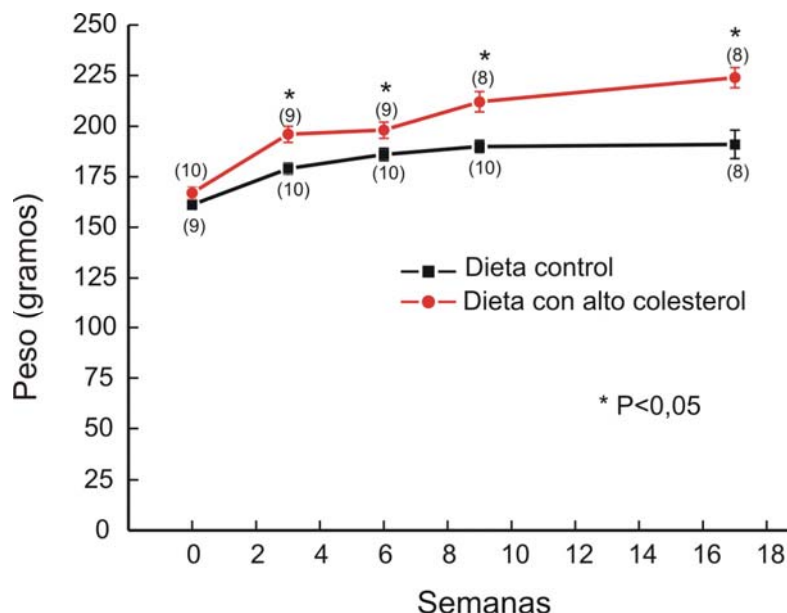
Debido a la carencia de jaulas individuales y de personal técnico para poder medir estos parámetros rata por rata, se midió el consumo total de la jaula y luego se dividió por el número de días y el número de animales. Como puede observarse en la Figura 52 el consumo de alimento promedio fue prácticamente igual entre la dieta control y la dieta con alto colesterol; en cambio el consumo de agua fue en promedio notoriamente superior con la dieta rica en colesterol. No obstante por no haber medido datos individuales no pudimos hacer pruebas estadísticas y la figura refleja solamente los valores promedios y no tiene valores de dispersión.



**Figura 52:** Consumo promedio de agua y alimento en ratas con dieta control (n=10) y con dieta rica en colesterol (n=10). Como puede verse frente a un consumo de alimento prácticamente igual con ambas dietas el consumo de agua fue aproximadamente un 40 % mayor con la dieta rica en colesterol.

### Peso

Como puede observarse en la Figura 53, partiendo de un peso promedio muy similar (control  $161 \pm 2$  g, alto colesterol  $167 \pm 3$  g), el incremento a partir de la semana 3 del protocolo fue significativamente superior en las ratas con dieta rica en colesterol. El aumento de peso con respecto al basal llega en la semana 17 a un  $17 \pm 4$  % en las ratas con dieta normal y a un  $33 \pm 2$  % en las ratas con dieta rica en colesterol.

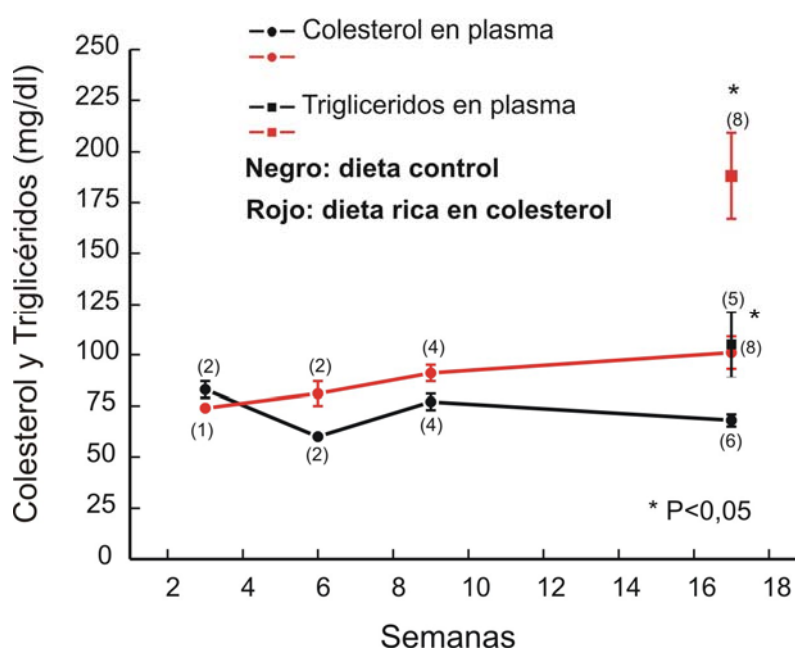


**Figura 53:** Peso corporal a lo largo de 17 semanas en ratas alimentadas con dieta control y dieta con alto colesterol. Los números cercanos a cada símbolo representan el número de animales. Como puede observarse el peso de las ratas con dieta rica en colesterol fue significativamente superior con respecto a la dieta control a partir de la tercera semana (test de t por independientes,  $p < 0,05$ ).

## Determinaciones Bioquímicas

### Colesterol y Triglicéridos

Ambos parámetros fueron determinados cada tres semanas en sangre extraída de la arteria de la cola a continuación del corte del segmento que se iba a usar para medición de reactividad vascular; y en la última semana al sacrificar la rata se obtuvo sangre de la aorta. Como puede verse en la Figura 54, a partir de la tercera semana del experimento los valores de colesterol plasmático fueron superiores en las ratas alimentadas con alto colesterol, y se obtuvieron diferencias significativas tanto en el colesterol como en los triglicéridos en la semana 17, momento en que se sacrificó la rata. Puede observarse que las determinaciones de triglicéridos se informan solamente en la semana 17 porque fueron muy escasas en las semanas previas; esto fue así por la escasa cantidad de muestra de sangre obtenida de la arteria de la cola en dichas semanas. En la semana 17 en cambio la sangre se obtuvo directamente de la aorta al sacrificar el animal y por esta razón la muestra era más abundante y se pudieron obtener ambas determinaciones en mayor número.

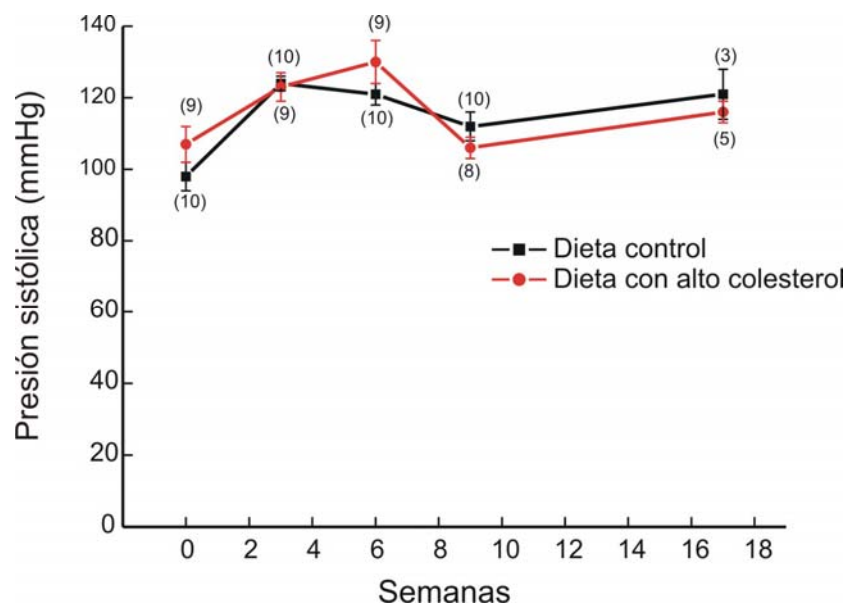


**Figura 54:** Concentración plasmática de colesterol y triglicéridos en ratas con dieta control y dieta rica en colesterol. El número vecino a los símbolos indica la cantidad de determinaciones (test de t por independientes,  $p < 0,05$ ).

### Presión

La presión arterial se midió cada tres semanas y al final del experimento (semana 17) en los dos grupos de ratas, empleando el método indirecto en la cola. En la Figura 55

se observa que en las ratas con dieta normal la presión arterial aumentó significativamente a lo largo del tiempo desde  $98 \pm 4$  en la semana 0 hasta  $121 \pm 7$  mmHg en la semana 17 (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ), y la dieta rica en colesterol no produjo un cambio significativo en ninguna de las semanas con respecto a los valores obtenidos con dieta normal (test de t por independientes,  $p > 0,05$ ). Por lo tanto podemos concluir que la dieta rica en colesterol, que tuvo un efecto manifiesto sobre el peso y sobre la concentración de colesterol y triglicéridos plasmáticos, no produjo en cambio ninguna variación sobre la presión arterial, y nos privó de la herramienta que pretendíamos tener para estudiar el posible efecto hipotensor de los hidrolizados de amaranto.

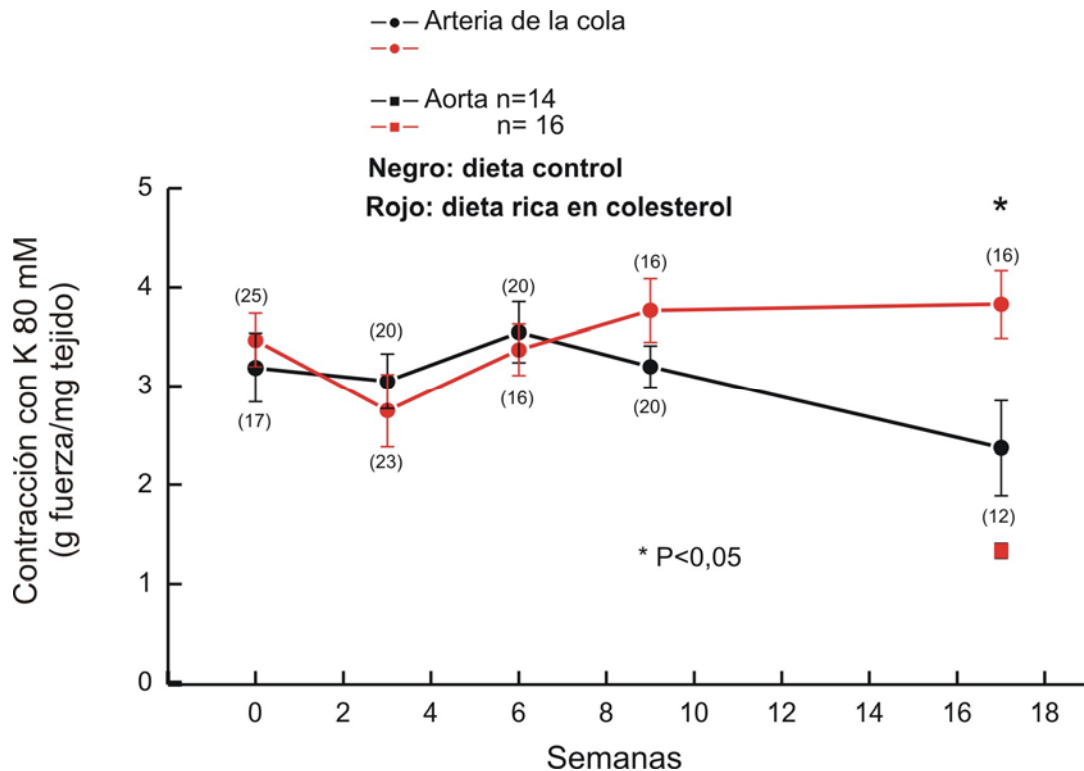


**Figura 55:** Presión sistólica indirecta durante 17 semanas en ratas con dieta control y dieta con alto colesterol. Los valores de presión en cada medición no presentaron diferencias significativas entre ambas dietas (test de t por independientes,  $p > 0,05$ ). Los números vecinos a los símbolos indican el número de ratas.

### Contracción Vascular

Como se explicó en métodos, la reactividad vascular fue estudiada a lo largo del experimento cada tres semanas en muestras de arteria de la cola y al finalizar el protocolo en dicha arteria y además en un anillo de aorta. Se emplearon como estímulos una alta concentración de potasio para actuar sobre los canales voltaje-operados, Ang II y noradrenalina como dos agonistas fisiológicos que actúan sobre canales receptor-operados, y acetilcolina como relajante endotelio dependiente por su efecto sobre la producción de óxido nítrico. En todos los casos se compararon anillos vasculares de ratas con dieta normal y de ratas con dieta rica en colesterol.

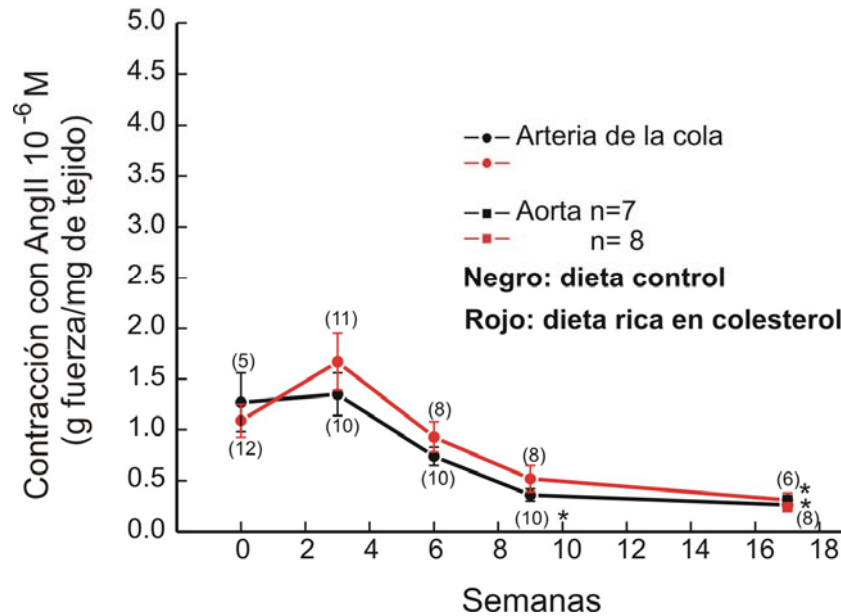
En la arteria de la cola, la contracción con KCl= 80 mM no produjo diferencias significativas entre ambos preparados en las primeras 9 semanas del protocolo (Figura 56), pero en la semana 17 la respuesta contráctil en los anillos de ratas con alto colesterol fue significativamente superior a los de ratas con dieta normal (test de t por independientes,  $p < 0,05$ ). En la aorta, sin embargo, no se observaron cambios inducidos por la dieta rica en colesterol en la semana 17. No se observaron cambios en la fuerza en función del tiempo para ninguna de las dos dietas (Figura 56).



**Figura 56:** Respuesta contráctil al ClK 80 mM en arteria de la cola a lo largo de 17 semanas, y en aorta solamente en la semana 17. Los números vecinos a los símbolos indican el número de preparados. Para la aorta, el símbolo negro y rojo se superponen.

En los experimentos con Ang II  $10^{-6}$  M que se muestran en la Figura 57, puede verse que tanto en arteria de la cola como en aorta no se observaron diferencias significativas entre las dietas control y rica en colesterol en ninguna de las semanas del protocolo (test de t por independientes,  $p > 0,05$ ). En la semana 17 se observa con las dos dietas una caída significativa de la fuerza con respecto a la semana 0, y en la semana 9 la diferencia es significativa solamente en la dieta normal (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ). Esto estaría indicando un cambio dependiente del tiempo en que se toma la muestra, lo cual implica diferentes sectores de la arteria de la cola. La fuerza desarrollada por los segmentos en respuesta a Ang II decrece a medida que los mismos provienen de zonas más proximales de la cola. Esto es en principio contradictorio ya que los

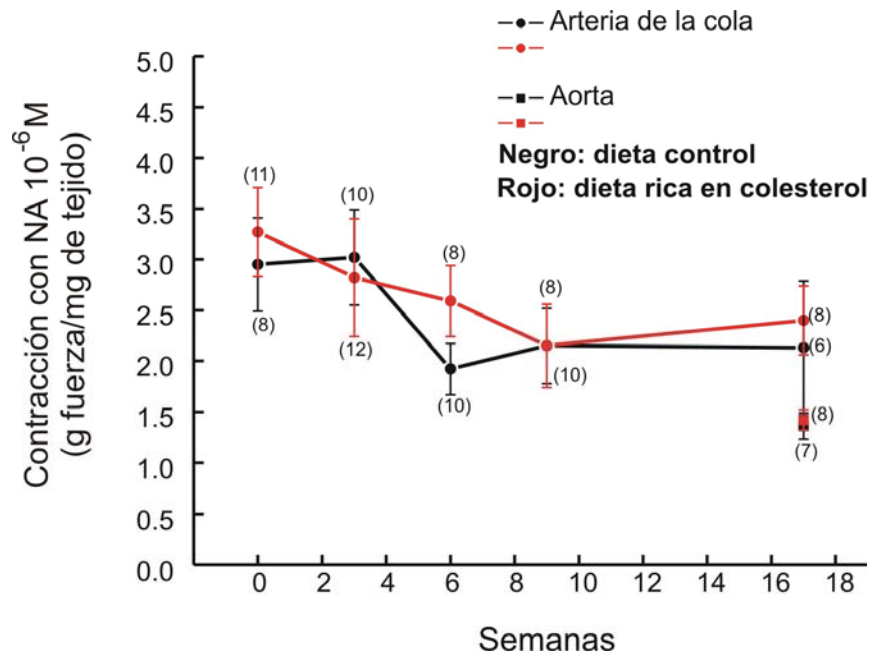
segmentos proximales tienen más músculo que los distales; por lo tanto podemos suponer que la diferencia podría deberse a una menor cantidad de receptores para Ang II en los segmentos proximales (Figura 57).



**Figura 57:** Respuesta contractil a la angiotensina II (AngII) en la arteria de la cola en las semanas 0 a 17, y en la aorta solamente en la semana 17. Los números vecinos a cada símbolo indican el número de preparados. Para la aorta, los símbolos negro y rojo se superponen y están debajo de los de la arteria de la cola.

En los experimentos con noradrenalina  $10^{-6}$  M (NA), y al igual que en el caso de la Ang II, ni en arteria de la cola ni en aorta existieron diferencias significativas entre las dietas normal y rica en colesterol en ninguna de las semanas del protocolo (test de t por independientes,  $p > 0,05$ ). A diferencia de los experimentos con Ang II aquí no hubo diferencias significativas de la fuerza en función del tiempo (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ) (Figura 58).



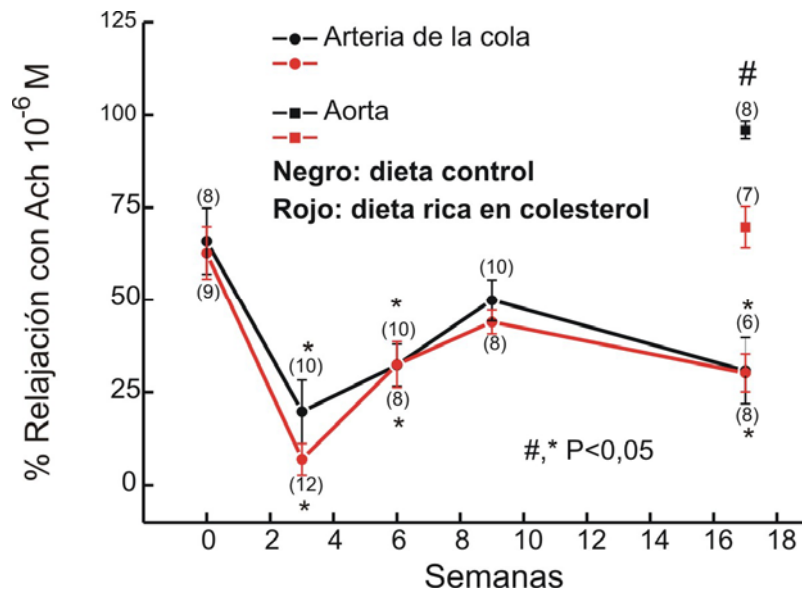


**Figura 58:** Respuesta contráctil a noradrenalina (NA)  $10^{-6}$  M en arteria de la cola a lo largo de 17 semanas y en aorta solamente en la semana 17. Los números vecinos a cada símbolo indican el número de preparados.

En la Figura 59 se muestra la relajación inducida por Ach  $10^{-6}$  M por sobre una contracción estable producida por NA  $10^{-6}$  M. En lo que respecta a modificaciones inducidas por la dieta rica en colesterol, solamente se observaron diferencias entre los anillos de aorta en la semana 17 del protocolo, donde la dieta rica en colesterol deprimió la relajación de  $96 \pm 2\%$  a  $70 \pm 6\%$  (test de t por independientes,  $p < 0,05$ ); mientras que en la arteria de la cola no se observaron diferencias en ninguna semana del protocolo (test de t por independientes,  $p > 0,05$ ).

En la arteria de la cola sí se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo, ya que el porcentaje de relajación inducido por Ach, independientemente de la dieta, fue significativamente menor en las semanas 3, 6 y 17 con respecto a la semana 0 (ANOVA por una vía,  $p < 0,05$ ). Esto probablemente pueda atribuirse al hecho de que a medida que avanzaban las semanas del protocolo el segmento de arteria de la cola utilizado era cada vez más proximal. Los segmentos proximales eran de mayores dimensiones y probablemente con mayor contenido de músculo liso con respecto a los distales, y esto quizás pudiera explicar las diferencias, ya que el óxido nítrico producido localmente en el endotelio debería distribuirse entre una mayor masa de músculo y resultaría en una menor relajación porcentual. Una explicación similar podría ser aplicable en el caso de la aorta, ya que aquí la cantidad de endotelio es mayor, y por tratarse de una arteria elástica la cantidad de músculo liso presente en la pared es

menor. Esto resultaría en una mayor concentración relativa de óxido nítrico con respecto a la que existe en la arteria de la cola (Figura 59).



**Figura 59:** Relajación inducida por acetilcolina (ACh)  $10^{-6}$  M en la arteria de la cola a lo largo de 17 semanas y en aorta solamente en la semana 17. Los números vecinos a los símbolos indican el número de preparados.

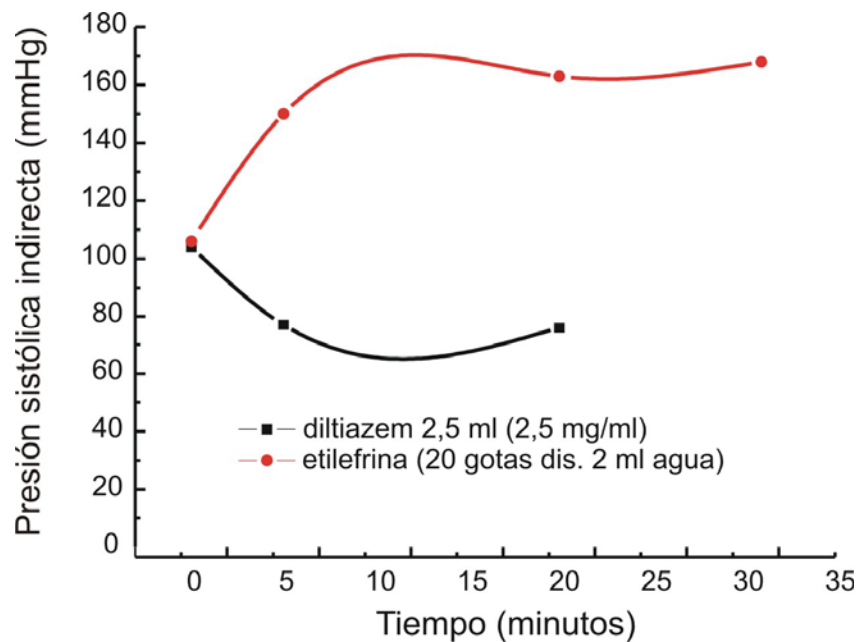
Nuestro propósito original era ver si el colesterol generaba hipertensión en las ratas normotensas; y alguna modificación en la respuesta a los agonistas (esta descrita la respuesta aumentada a noradrenalina, potasio y Ang II) (Yang y col., 1998; Wilfert y col., 2000) y si el amaranto la podía corregir. Debido a la falta de modificaciones producidas por el colesterol en la respuesta a los agonistas empleados en el músculo liso vascular y sobre la presión arterial, no tenía sentido realizar un modelo de 10 semanas con una dieta rica en colesterol y amaranto.

### **b- Modelo de ratas genéticamente hipertensas y sus controles normotensos**

#### Intubación orogástrica y registro indirecto de la presión arterial en ratas Wistar y SHR.

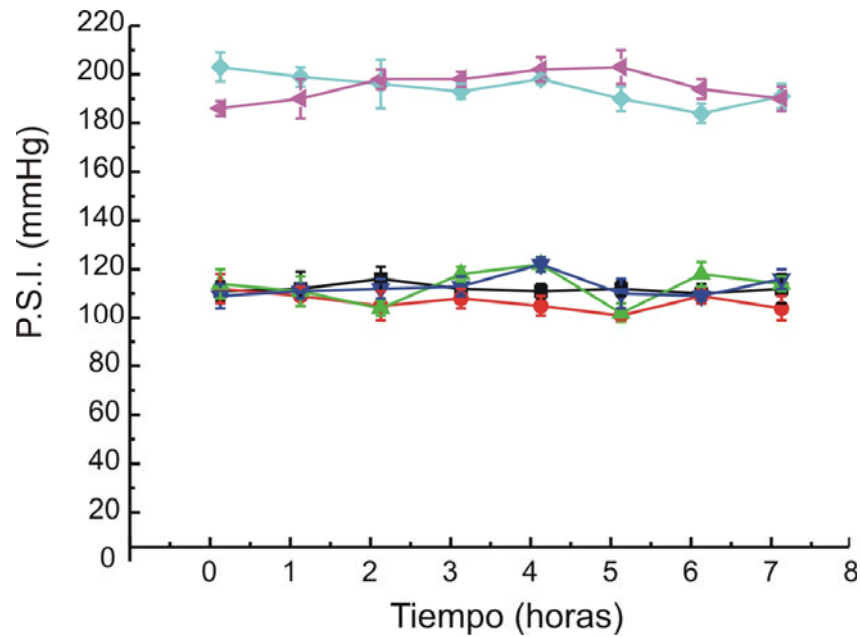
En la Figura 60 se observa un experimento para comprobar la efectividad del método de intubación orogástrica. Se determinó la presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (minutos), luego de administrar diltiazem 2,5 ml (2,5 mg/ml) y etilefrina 2 ml con una concentración de 5 mg/ml, mediante intubación orogástrica. Como era de esperar en base a la acción farmacológica conocida de ambas drogas, la etilefrina produjo un aumento pronunciado de la presión arterial y el diltiazem un descenso

considerable de la misma; comprobando así la correcta ubicación de la sonda y la rapidez de absorción de los preparados administrados por esa vía.



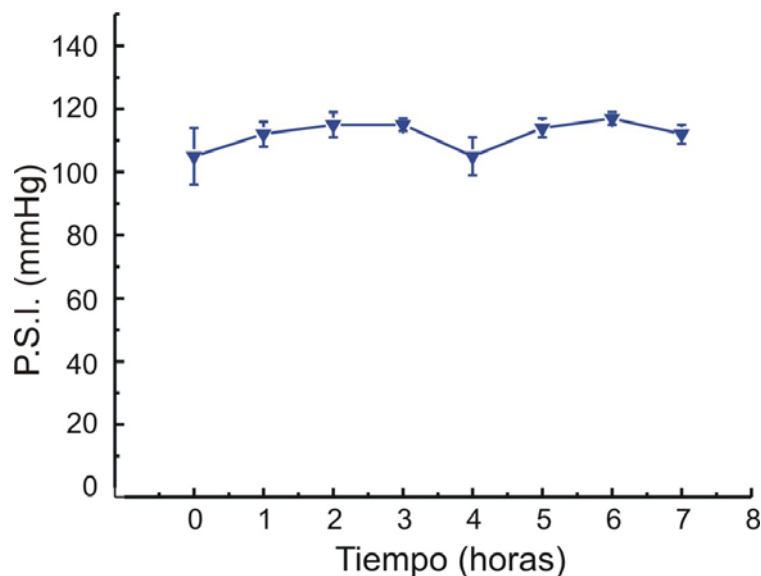
**Figura 60:** Presión sistólica indirecta en función del tiempo en dos ratas a la primera de las cuales se administró 2,5 ml de diltiazem (2,5 mg/ml), y a la segunda etilefrina (5mg/ml) disuelta en 2 ml de agua, todo por intubación orogástrica.

En la Figura 61 se presentan experimentos donde se midieron los valores de presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (horas) en 6 ratas Wistar y 6 ratas SHR a las cuales se les administró en días diferentes 2 ml de agua mediante intubación orogástrica. Los experimentos se repitieron 4 días en las ratas Wistar y 2 días en las ratas SHR, y los resultados promedios obtenidos en cada uno de esos días se representan como curvas de distintos colores en la Figura 61. Como puede observarse no se ven diferencias significativas entre los distintos días ni a lo largo del tiempo en ninguno de los dos lotes de ratas día (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).



**Figura 61:** Presión sistólica indirecta medida a lo largo de 7 horas en 6 ratas SHR y 6 Wistar a las cuales se les administró 2 ml de agua por intubación orogástrica. P.S.I. = Presión Sistólica Indirecta.

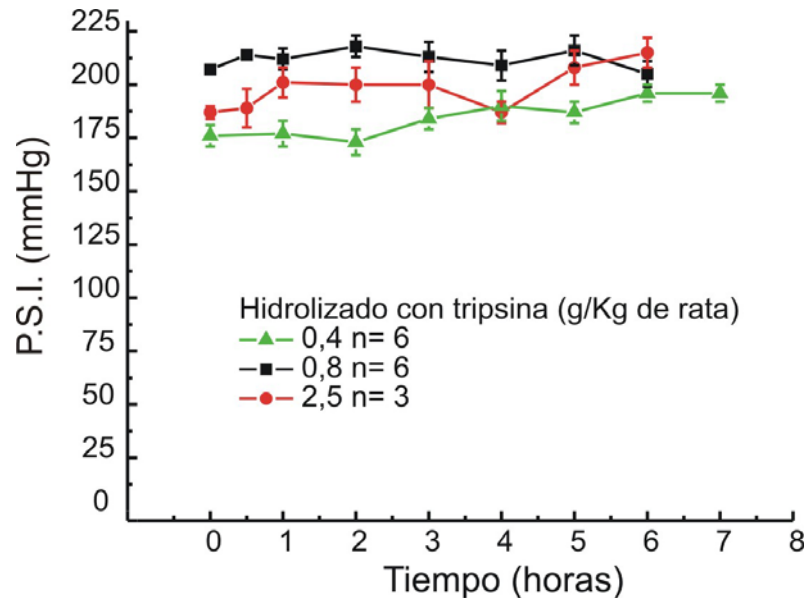
En la Figura 62 se observan los valores promedio de presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (horas), para un lote de 6 ratas wistar a las cuales se les dio por intubación orogástrica 0,4 g de hidrolizado de amaranto (alcalasa 4horas) por kg de rata, los cuales fueron disueltos en 2 ml de agua. Como puede observarse no se vieron diferencias significativas en ninguno de los tiempos (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).



**Figura 62:** Presión sistólica indirecta a lo largo de 7 horas en 6 ratas Wistar a las que se administró por intubación orogástrica hidrolizado (alcalasa 4hs) 0,4 g/Kg de rata disueltos en 2 ml de agua. P.S.I.= Presión sistólica indirecta.

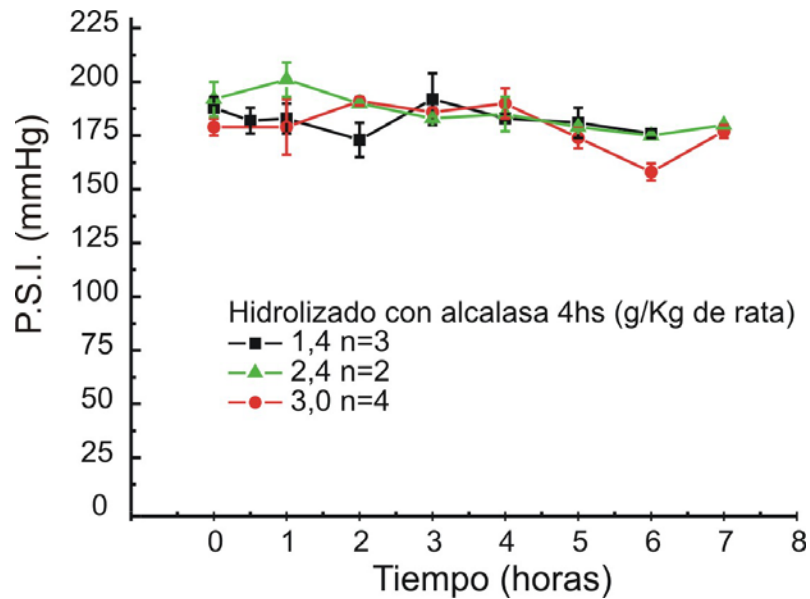
En la Figura 63 se observan los valores promedio de presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (horas), para un lote de ratas SHR a las cuales se les dieron en

días diferentes y mediante intubación orogástrica las siguientes dosis: 0,4 g, 0,8 g y 2,5 g de hidrolizado de amaranto por kg de rata, los cuales fueron disueltos en 2 ml de agua. Con ninguna de las dosis se ven diferencias significativas con respecto a la presión a tiempo cero (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).



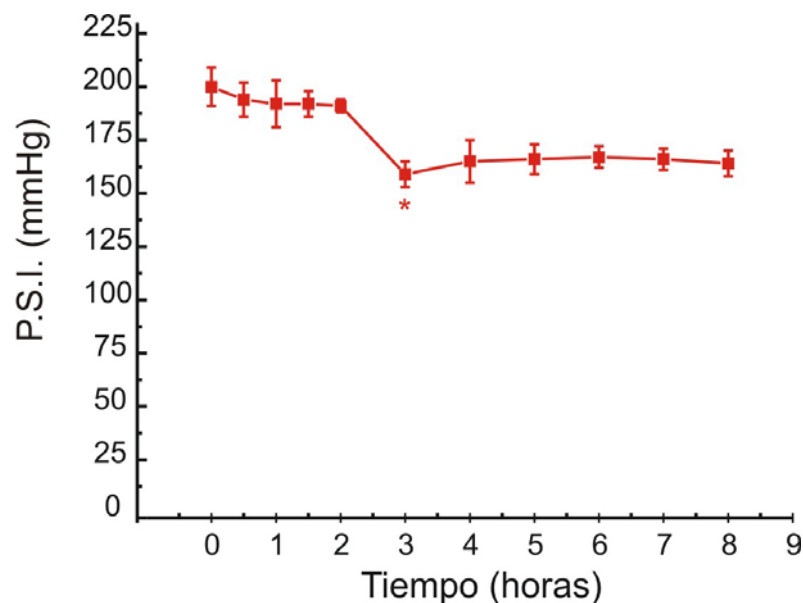
**Figura 63:** Presión sistólica indirecta en un lote de ratas SHR a las cuales se les administró por intubación orogástrica y en días diferentes las dosis de hidrolizado indicadas en cada curva. P.S.I.= Presión Sistólica Indirecta.

En la Figura 64 se observan los valores promedio de presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (horas), para un lote de ratas SHR a las cuales se les dieron en días diferentes y mediante intubación orogástrica las siguientes dosis: 1,4 g, 2,4 g y 3 g de hidrolizado de amaranto por kg de rata, los cuales fueron disueltos en 2 ml de agua. Con ninguna de las dosis se ven diferencias significativas con respecto a la presión a tiempo cero (ANOVA de una vía,  $p > 0,05$ ).



**Figura 64:** Presión sistólica indirecta en ratas SHR a las cuales se les administró por intubación orogástrica y en días diferentes las dosis de hidrolizado indicadas en cada curva. P.S.I.= Presión sistólica indirecta.

En la Figura 65 se observan los valores promedio de presión sistólica indirecta (mmHg) en función del tiempo (horas), para un lote de 6 ratas SHR a las que se les dio mediante intubación orogástrica 2,4 g de hidrolizado de amaranto por kg de rata, los cuales fueron disueltos en 2 ml de agua. Con esta concentración se vió un descenso significativo en la presión sistólica indirecta de 30 mmHg a la tercer hora de administrar el hidrolizado (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ).



**Figura 65:** Presión sistólica indirecta en 6 ratas SHR a las cuales se administró por intubación orogástrica hidrolizado con alcalasa durante 5 hs en una dosis de 2,4 g/kg de rata disueltos en 2 ml de agua. P.S.I. = presión sistólica indirecta.

Como conclusión de lo realizado hasta aquí con hidrolizado de amaranto podemos decir que:

- En las ratas Wistar no se vieron cambios significativos en la presión sistólica, durante 7 horas, ni con la administración de hidrolizado de amaranto, ni con la administración de agua, utilizando la intubación orogástrica como vía de administración.
- En las ratas SHR, se vio un descenso en la presión sistólica indirecta de 30 mmHg a la tercer hora de administrar 2,4g/kg rata de hidrolizado de amaranto (alcalasa 5 horas). No se vieron cambios significativos con concentraciones menores.
- Debido a la variabilidad que presenta el método de toma de presión indirecta y el estrés que provoca el método de intubación orogástrica en la rata consciente comenzamos a utilizar un nuevo diseño experimental.

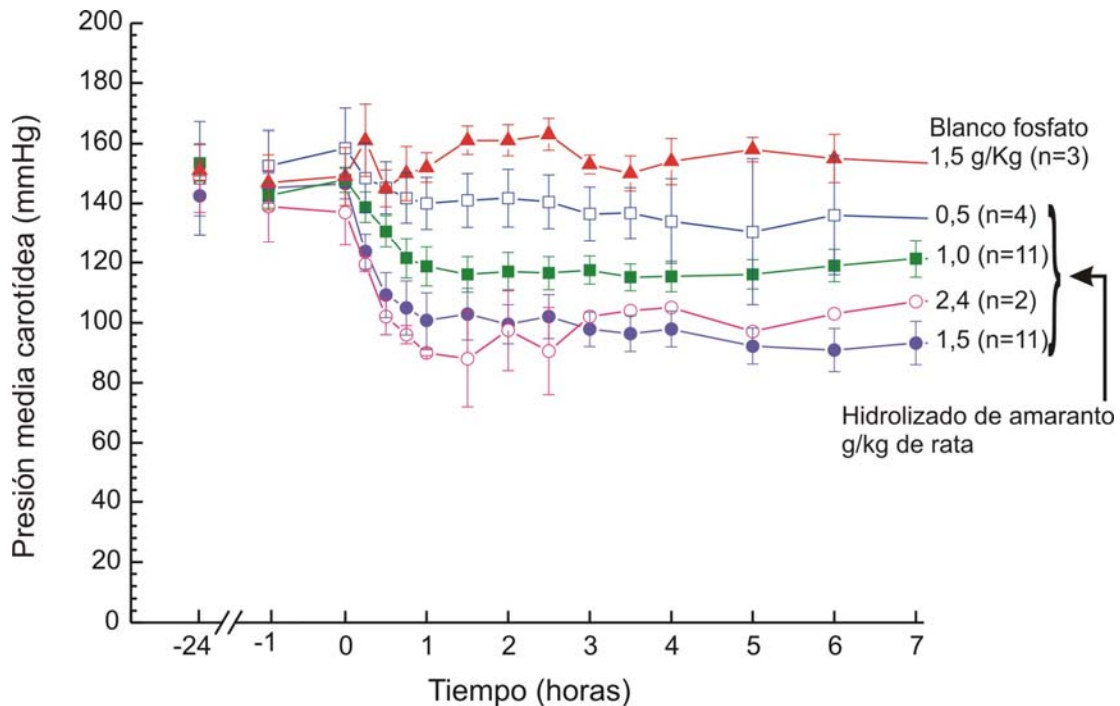
#### Gastrostomía y registro de presión directa en ratas SHR y normotensas

Los experimentos que siguen fueron realizados en ratas espontáneamente hipertensas y normotensas siguiendo la técnica descrita en materiales y métodos, que tiene dos ventajas principales: 1- permite el registro directo de la presión carotídea, y 2- permite la administración intragástrica directa del hidrolizado de amaranto. En ambos casos el procedimiento no es detectable por parte del animal, asegurando así un registro libre de interferencias causadas por los movimientos de resistencia que se producen al introducir la sonda orogástrica y al tomar la presión en la cola.

En la Figura 66 se observan los datos de presión media carotídea en función del tiempo el mismo día de la cirugía con el animal consciente, en condiciones control y luego de administrar distintas concentraciones de hidrolizado de amaranto alcalasa 4 horas, y un blanco fosfato sin amaranto, como control.

Como puede observarse el blanco fosfato no tuvo ningún efecto consistente sobre la presión arterial, mientras que las diversas concentraciones de hidrolizado produjeron un descenso notorio. A la concentración de 0,5 g/kg de rata de hidrolizado la presión descendió pero sin alcanzar significación estadística. A la concentración de 1 g/kg de hidrolizado el descenso fue significativo a partir de los 45 minutos de la administración, y el efecto fue persistente hasta la sexta hora de la medición; a la séptima hora ya la caída de presión se había vuelto no significativa. Con una concentración de 1,5 g/kg de hidrolizado el descenso fue aún más pronunciado y se alcanzó significación a partir de los 45 minutos de administración y persistió siete horas. Finalmente la concentración de 2,4 g/kg de hidrolizado produjo un descenso apreciable de la presión a los 90 minutos

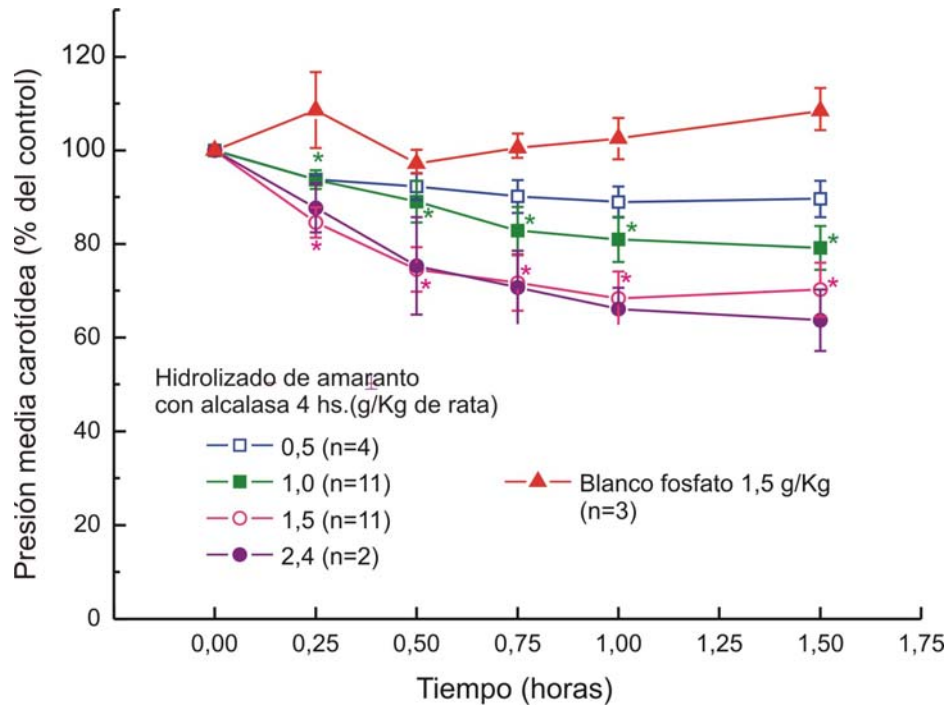
de la administración de hidrolizado, pero el escaso número de ratas impidió alcanzar significación estadística.



**Figura 66:** 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. Para mayor claridad de la figura no se colocaron los asteriscos indicativos, ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ). (Fritz y col., 2009).

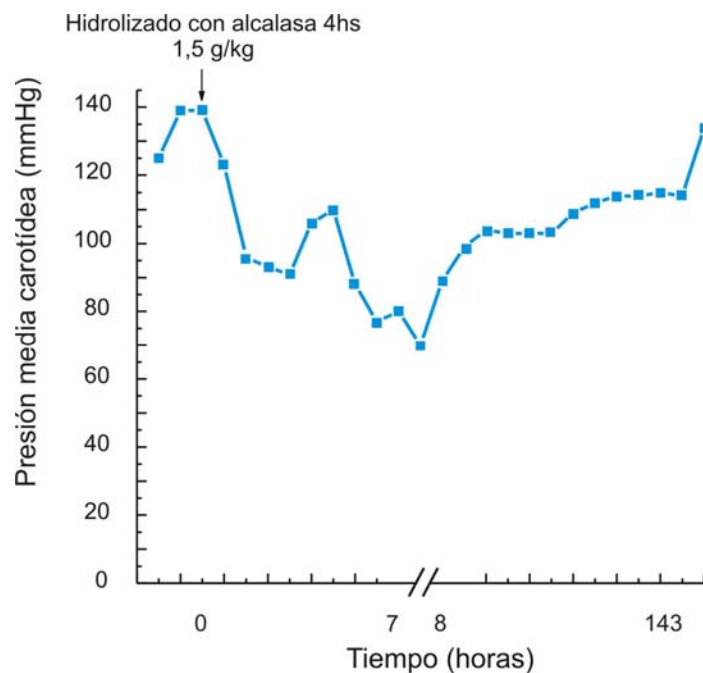
En la Figura 67 se presentan los mismos datos de la Figura 66 pero limitados a los primeros 90 minutos luego de la administración del hidrolizado, y además expresados como porcentaje con respecto a la presión previa a la administración del hidrolizado. Como puede observarse las concentraciones de 1 y 1,5 g/kg de hidrolizado produjeron un descenso significativo de la presión en todos los tiempos de medición, pero el blanco fosfato y las dosis de 0,5 y 2,4 g/kg de hidrolizado no alcanzaron significación estadística.





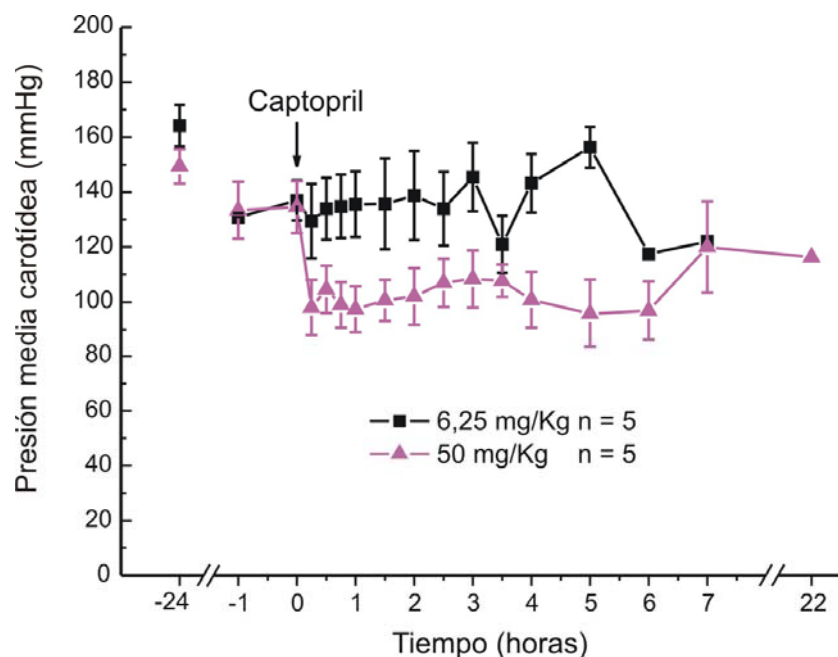
**Figura 67:** Evolución de la presión media carotídea de las ratas SHR mostradas en la figura 66 durante los primeros 90 minutos y expresadas como porcentaje de la presión control previa al hidrolizado. ANOVA de una vía, \*  $p < 0,05$ .

En la Figura 68 se muestra un experimento representativo en el cual el catéter arterial se dejó colocado más tiempo y permitió comprobar que la presión media recuperaba los valores controles y que el descenso de presión obtenido en los experimentos reflejaba un efecto real del hidrolizado y no un artefacto debido a la oclusión del catéter.



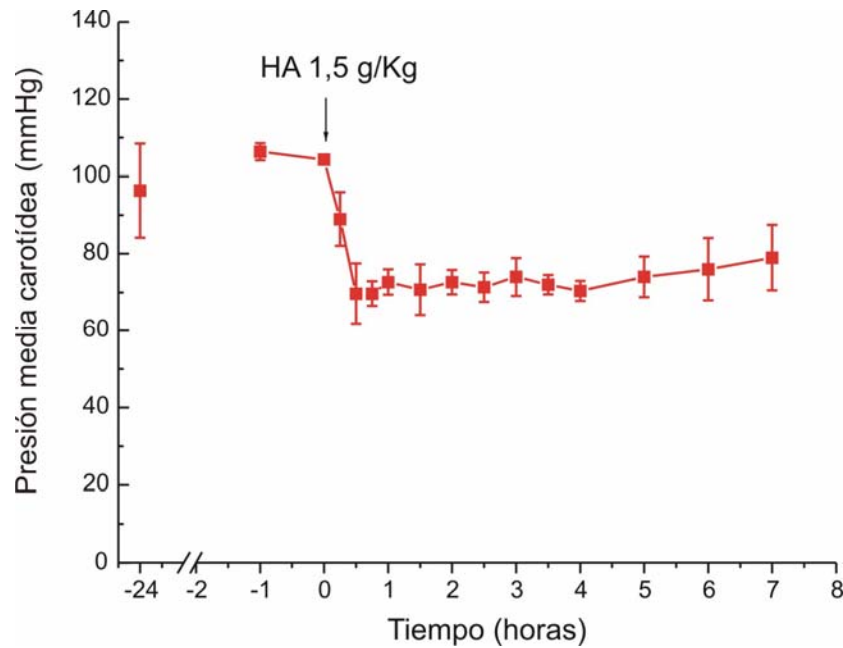
**Figura 68:** Evolución de la presión media carotídea en una rata SHR luego de administrar hidrolizado de amaranto 1,5 g/Kg. En este caso el registro se siguió durante 143 horas, permitiendo comprobar el regreso de la presión arterial a los valores control.

Adicionalmente se estudió en ratas SHR el efecto del captopril, que es un inhibidor conocido de la enzima convertora de angiotensina para comparar sus efectos con los del hidrolizado. En la Figura 69 se pueden ver los efectos de dos dosis diferentes de la droga, de las cuales la menor (6,25 mg/kg) no tuvo efecto. La dosis de 50 mg/kg (Miguel y col., 2005), por el contrario, provocó un descenso rápido de la presión arterial de aproximadamente un 30 %, que se mantuvo durante 6 horas, alcanzando valores significativos a todos los tiempos a excepción de 2,5; 3; 3,5; 7 y 22 horas (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ).



**Figura 69:** Efecto del captopril administrado por vía intragástrica en 10 ratas SHR a la dosis de 6,25 mg/Kg (n=5) y 50 mg/Kg (n=5).

En la Figura 70 se observan los resultados obtenidos con una concentración de hidrolizado de amaranto de 1,5 g/kg en 3 ratas normotensas, en las cuales provocó un descenso rápido de la presión arterial que llegó al máximo (33 %) a los 30 minutos de administrar el hidrolizado y persistió con valores significativos hasta la sexta hora. Los descensos de presión obtenidos fueron significativos con excepción de los puntos de 15 minutos y 7 horas (ANOVA de una vía,  $p < 0,05$ ).



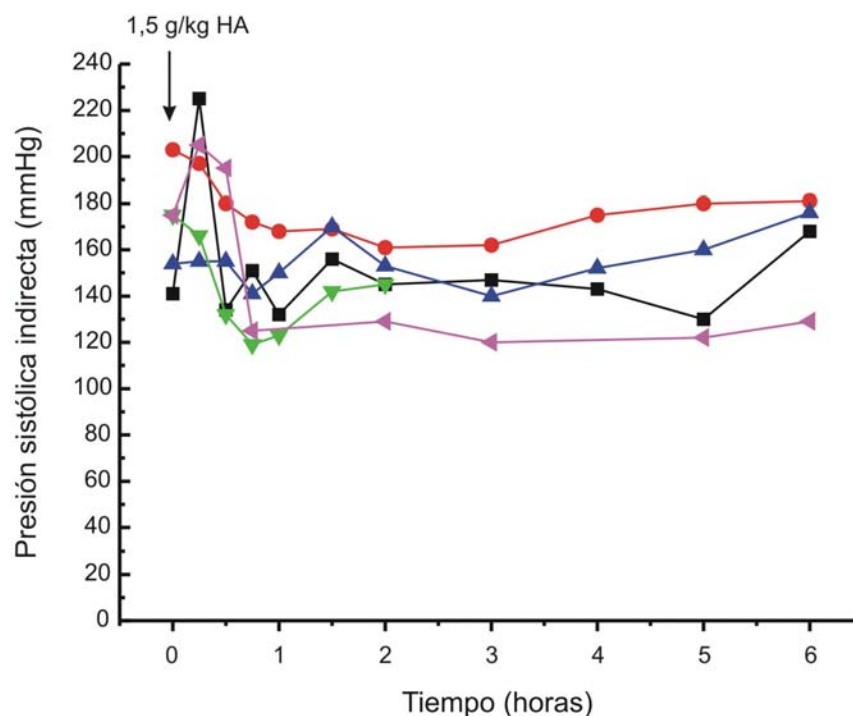
**Figura 70:** Efecto del hidrolizado de amaranto (HA), alcalasa 4 hs con una concentración de 1,5 g/Kg administrado por gastrostomía en 3 ratas normotensas conscientes.

Como conclusión de los experimentos en ratas SHR y normotensas podemos decir que el diseño experimental utilizado permitió detectar un efecto del hidrolizado de amaranto sobre la presión arterial que con la técnica previa había sido imposible de detectar, o bien se había hecho evidente solamente a concentraciones mayores que las empleadas aquí. El efecto hipotensor fue cuantitativamente semejante al del captopril, inhibidor clásico de la enzima convertora de angiotensina. Si bien el efecto del hidrolizado de amaranto es indiscutible, faltaría definir una relación cuantitativa entre la cantidad que recibió la rata en forma intragástrica directa y la que podría incorporar al organismo luego de la ingesta de un alimento que contenga amaranto.

#### Gastrostomía y registro de presión indirecta en ratas SHR

Como comprobación adicional del efecto del hidrolizado de amaranto sobre la presión arterial, diseñamos experimentos en los cuales se administró el hidrolizado (1,5 g/kg) por una sonda intragástrica pero la presión arterial se midió de manera indirecta y no a través de un catéter en la carótida. Como puede observarse en la Figura 71, esta dosis de hidrolizado que había tenido un efecto hipotensor máximo en las mediciones a través de la carótida, en este caso provocó hipotensión en 3 de los experimentos pero no hizo ningún efecto en los 2 restantes. Dado que el catéter gástrico estuvo correctamente colocado en todos los casos, podría suponerse que el mayor estrés al

que se somete a la rata con la toma del método indirecto introduce artefactos que pueden llegar a impedir la correcta apreciación del efecto sobre la presión arterial.

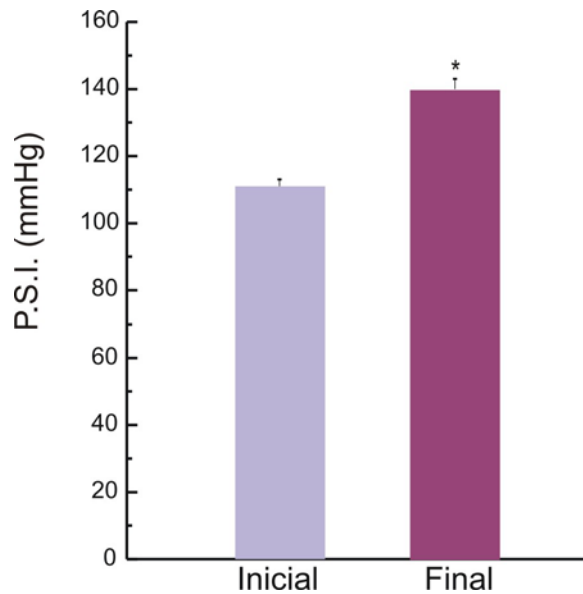


**Figura 71:** Presión sistólica indirecta (mmHg) en 5 ratas SHR conscientes a las que se les administró 1,5 g/kg de hidrolizado de amaranto (HA) a través de una sonda intragástrica.

### c- Modelo de ratas hipertensas renales

En este modelo se intenta lograr una elevación persistente de la presión arterial provocando isquemia renal mediante la colocación de un clip en la arteria renal para restringir el flujo a dicho órgano. En distintas variedades de este modelo el clipado de la arteria puede acompañarse de extirpación del riñón contralateral. Inicialmente comenzamos a trabajar con este último modelo, habitualmente denominado de 1 riñón-1 clip. Se operaron 17 ratas normotensas colocando un clip de plata con una luz de 0,27 mm, pero no se obtuvieron elevaciones consistentes y sostenidas de la presión arterial. En vista de esto cambiamos al modelo denominado 2 riñones-2 clips, en el cual no se hace nefrectomía y se colocan 2 clips de una luz de 0,25 mm. Los clips fueron en su mayoría de plata y en el resto de las ratas se construyeron de acrílico en el cual se tallaba una ranura de 0,25 mm.

En la Figura 72 se muestran los valores de presión pre y post operatorios en las 53 ratas que sobrevivieron a la intervención. Como puede verse se logró una suba de presión sistólica de  $29 \pm 3$  mmHg en promedio, en un intervalo de tiempo de  $22 \pm 2$  días (test de t por apareadas,  $p < 0,001$ ).



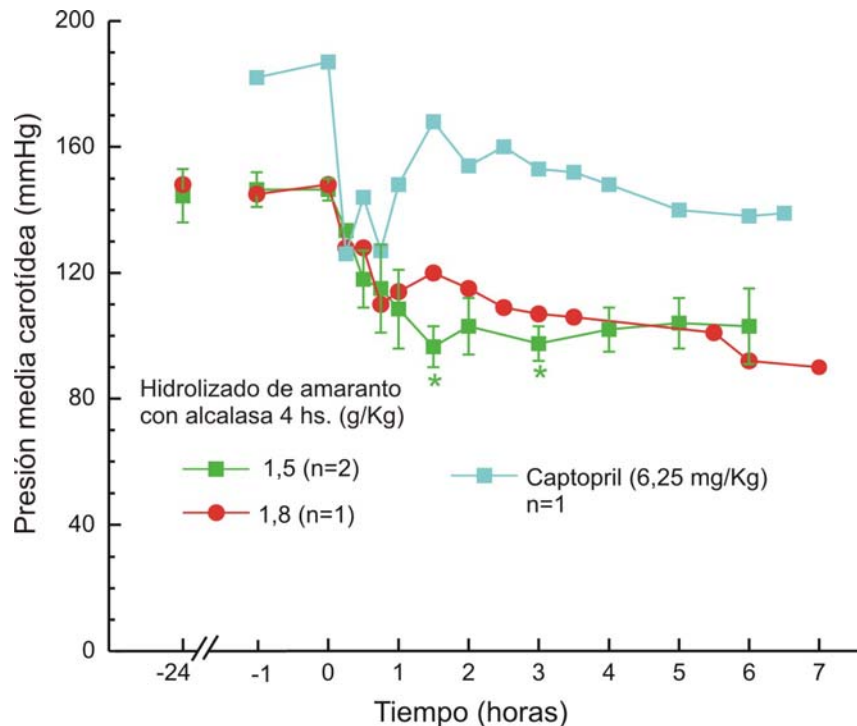
**Figura 72:** Presión sistólica indirecta en 53 ratas normotensas en las cuales se colocaron un clip de 0,25 mm de luz en cada arteria renal (modelo 2riñones-2clips). P.S.I. = Presión Sistólica Indirecta.

A pesar de la buena suba de presión obtenida en gran parte de las ratas operadas, hubo varios problemas que limitaron el número final de ratas disponibles para la administración intragástrica de hidrolizado de amaranto con medición directa de la presión arterial:

1- en 9 ratas la presión no subió, y en otras 9 se obtuvo una suba de presión inferior a 20 mmHg por lo cual no se las tuvo en cuenta para la administración del hidrolizado de amaranto a fin de no desperdiciarlo.

2- las restantes 34 ratas tuvieron una suba de presión superior a 20 mmHg y se les practicó la cateterización carotídea y la colocación del catéter intragástrico. Sin embargo, algunas murieron en la operación o el post operatorio inmediato, y muchas otras sobrevivieron a la operación pero nunca llegaron a presentar valores correspondientes a hipertensión arterial, razón por la cual tampoco se les administró hidrolizado.

Finalmente llegamos a obtener 4 preparados exitosos en uno de los cuales administramos captopril en una concentración de 6,25 mg/kg de rata y en las 3 restantes hidrolizado de amaranto (Figura 73).

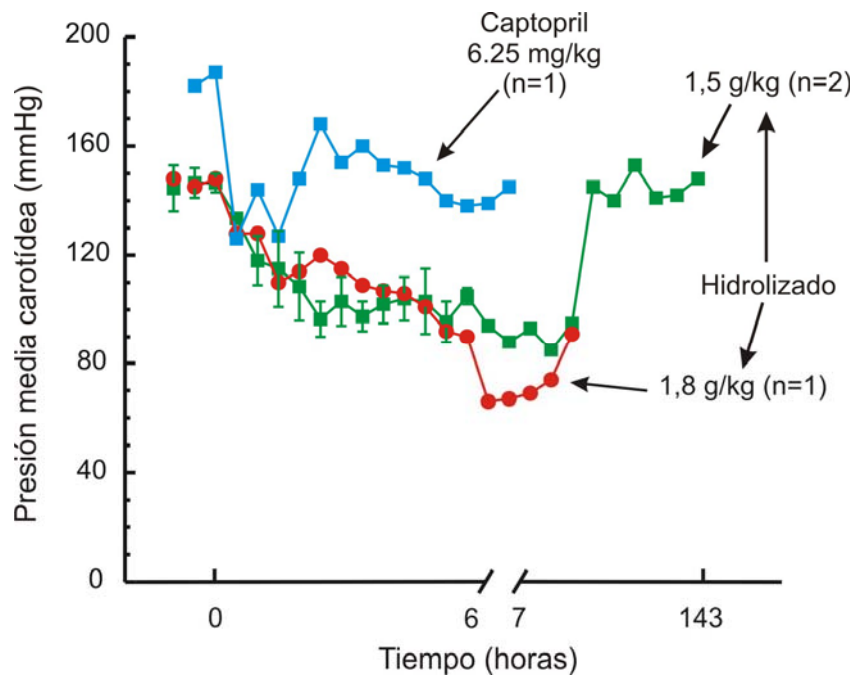


**Figura 73:** Evolución de la presión media carotídea en 4 ratas hipertensas renales con el modelo indicado en la figura anterior.

En la Figura 73 se observa la evolución de la presión media carotídea en 2 ratas a las cuales se les administró 1,5 g/kg de hidrolizado de amaranto (alcalasa 4 horas) y en una rata a la cual se le administro 1,8 g/kg. Como puede verse, ambas concentraciones produjeron un efecto similar logrando un descenso progresivo de unos 40 mmHg con respecto al control, pero solamente se alcanzó significación en la dosis de 1,5 g/kg a la 1,5 y 3 horas de administrar el hidrolizado (t por muestras apareadas,  $p < 0,05$ ), pero no se obtuvo significación estadística con ANOVA de una vía en ninguno de los tiempos medidos. En la misma figura puede verse el resultado de administrar a otra rata 6,25 mg/kg de captopril con la finalidad de comparar el efecto del hidrolizado de amaranto con el de un inhibidor conocido de la enzima convertidora de angiotensina. Hay que destacar el mayor efecto del captopril en este modelo de hipertensión, ya que aquí la dosis de 6,25 mg/kg fue efectiva mientras que no tuvo ningún efecto en ratas SHR (Figura 69). Esto probablemente se deba a que la rata hipertensa renal es un modelo de renina alta, mientras que la SHR es un modelo de renina baja (Dzau, 1986; Asaad y Antonaccio, 1982; Riegger y col., 1977).

En la Figura 74, se muestran los mismos datos de la Figura 73 pero extendiendo la escala de tiempo hasta 143 horas. Como puede observarse, el efecto del hidrolizado de amaranto fue persistente en el tiempo hasta aproximadamente unas 50 horas de la

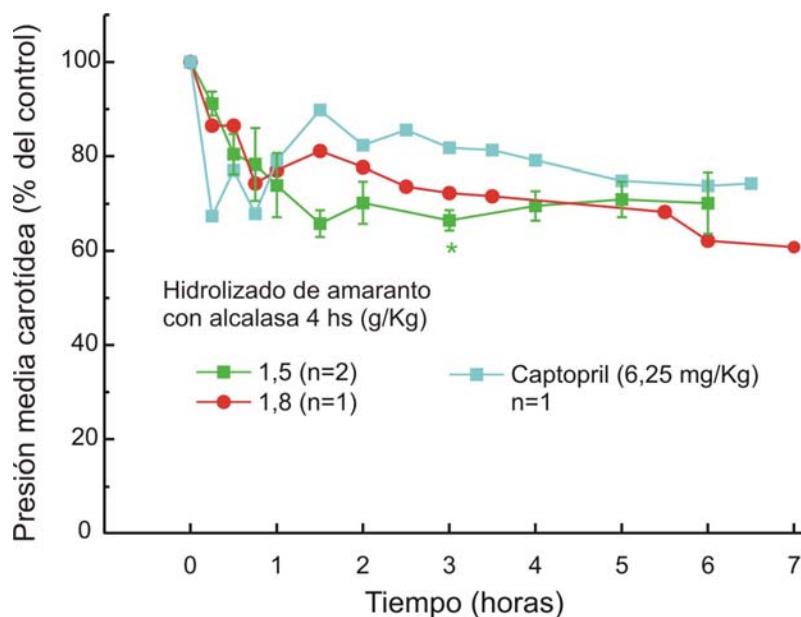
administración y se logró recuperación casi completa de la presión arterial aproximadamente a las 120 horas.



**Figura 74:** Presión media carotídea en ratas hipertensas renales hasta 143 horas después de la administración de captopril e hidrolizado de amaranto en las concentraciones indicadas en cada curva.

En la Figura 75 se muestran las caídas porcentuales de presión en las 4 ratas hipertensas renales durante las primeras 7 horas del experimento. Puede verse que la caída obtenida con captopril fue mucho más rápida que la obtenida con hidrolizado de amaranto pero no fue sostenida en el tiempo y se recuperó parcialmente a partir de una hora y media quedando luego en valores aproximadamente 20 % por debajo del control. El hidrolizado de amaranto produjo una caída mucho más lenta que el captopril y al final de la séptima hora estaba en valores de aproximadamente 30 % por debajo del control. Puede observarse que con la administración de hidrolizado 1,5 g/Kg se alcanza un descenso significativo en la tercer hora (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ), pero no por ANOVA de una vía.

Podemos concluir que a pesar de los problemas surgidos en la preparación del modelo que resultaron en un número escaso de animales útiles, el hidrolizado de amaranto también fue efectivo para descender la presión arterial en ratas hipertensas renales cuando se administró por vía intragástrica. Comparando una misma dosis administrada en los dos modelos (1,5 g/kg) la misma produjo una caída similar (32 % en SHR y un 34 % en la hipertensa renal).



**Figura 75:** Evolución de la presión media carotídea de las ratas mostradas en la Figura 73 pero expresada como porcentaje del control.

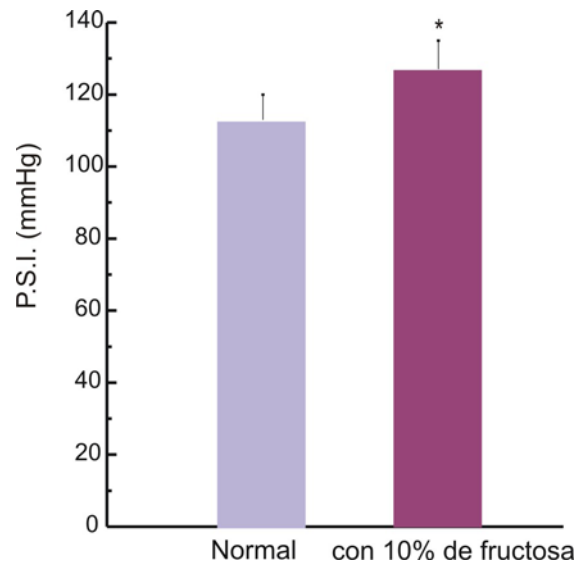
#### **d- Modelo de ratas hipertensas por administración de fructosa**

Como último modelo a utilizar en esta tesis se había propuesto a las ratas hipertensas por administración de fructosa. La fructosa administrada al 10 % en el agua de bebida provoca en los animales la aparición de elementos que caracterizan en el humano al “síndrome metabólico”: hipertensión arterial leve, hiperglucemia, dislipidemia, obesidad y aumento de la resistencia periférica a la insulina (Storlien y col., 1988 y 1991; Harris y Kor, 1992; Lombardo y col., 1996). Los trastornos metabólicos ya se hacen evidentes a los 21 días y la presión arterial demora unos dos meses en elevarse.

Con esta finalidad se prepararon dos lotes de ratas con libre acceso al agua y en uno de los lotes se agregó 10 % p/v de fructosa en el agua de bebida manteniéndolos con la misma durante dos meses.

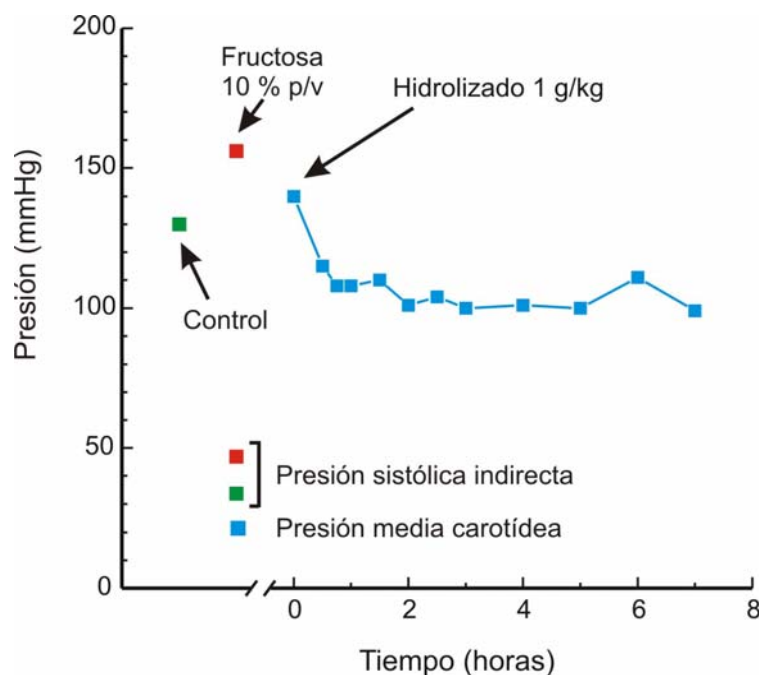
En la Figura 76 pueden verse los valores de presión arterial sistólica indirecta de ambos lotes de ratas, y se observa que las alimentadas con fructosa tuvieron una subida discreta pero significativa de la presión arterial, desde  $113 \pm 7$  mmHg hasta  $127 \pm 8$  mmHg (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). Sin embargo hubo numerosas dificultades en la preparación de este modelo: comenzamos con 2 lotes de 7 ratas cada uno y al poco tiempo murieron 2 de las ratas alimentadas con fructosa.





**Figura 76:** Presión sistólica indirecta en 7 ratas normotensas en condiciones control (barra izquierda) y luego de la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida durante 2 meses (barra derecha). P.S.I.= Presión Sistólica Indirecta.

Al llegar el momento de la operación para implantar los catéteres solamente uno de los animales soportó el procedimiento quirúrgico y se le pudo administrar hidrolizado, y los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 77.



**Figura 77:** Experimento individual mostrando la presión arterial indirecta en condiciones basales (cuadrado verde), luego de la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida durante 2 meses (cuadrado rojo), y la evolución de la presión media carotídea durante 7 horas luego de la administración intragástrica de 1g/Kg de hidrolizado de amaranto. Aunque por ser un solo experimento no se puede calcular significación estadística la magnitud de la caída es similar a la ocurrida en SHR.

Al igual que en los otros modelos, en este caso se vió un descenso lento de la presión arterial que persistió hasta la séptima hora después de la administración del hidrolizado.

Como conclusión de lo hecho hasta aquí se puede decir que el hidrolizado de amaranto fue efectivo para descender la presión arterial en forma sostenida en tres modelos diferentes de hipertensión arterial en la rata. En aquel que obtuvimos mayor cantidad de resultados fue en el modelo de ratas genéticamente hipertensas, pero aún con un número de animales más escaso por las dificultades comentadas también pudimos comprobar el efecto hipotensor en los otros dos modelos (hipertensión renal y por administración de fructosa).

#### **4- Estudios para determinar el mecanismo de acción principal del efecto hipotensor de los hidrolizados de amaranto.**

Como se vió en la introducción, la presión arterial es el producto del volumen minuto (mantenido por la contracción cardíaca) por la resistencia periférica (mantenida por la contracción de los vasos de resistencia). Como lo que aquí comprobamos es el efecto del hidrolizado sobre la presión arterial, no podemos afirmar si el mismo se debió exclusivamente a un efecto vasodilatador o si también hubo alguna acción depresora sobre la contracción miocárdica. Si el hidrolizado de amaranto tuviese la acción que se le ha atribuído de inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina cabría esperar un efecto predominantemente vascular. No obstante, la existencia de sistemas renina angiotensina locales en diversos tejidos, entre ellos el miocardio, nos obliga a comprobar un posible efecto sobre la contracción cardíaca.

Para dilucidar el principal órgano blanco del efecto del hidrolizado de amaranto planeamos tres tipos de experimentos:

- Experimentos en anillos de aorta aislada de ratas SHR en los cuales se efectuaron curvas dosis respuesta a Noradrenalina y Serotonina en condiciones control y en presencia de hidrolizado de amaranto (alcalasa 4 horas). En un grupo de experimentos se ensayó la influencia de la exposición a L-NAME para inhibir la óxido nítrico sintetasa.

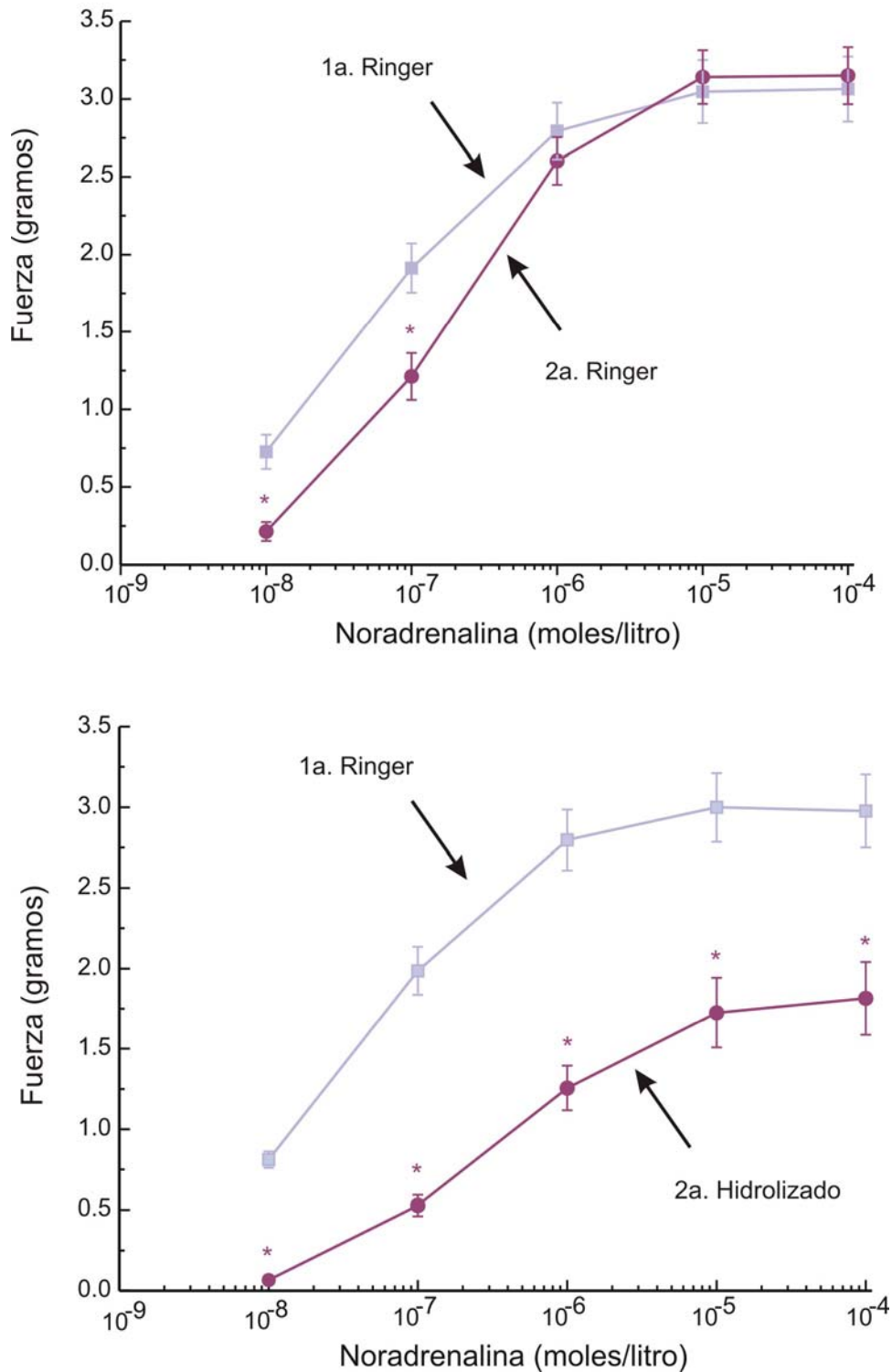
- Experimentos en músculo papilar aislado de corazones de ratas SHR y normotensas estimulados eléctricamente en condiciones control y en presencia de hidrolizado de amaranto.
- Mediciones de volumen minuto y presión arterial en ratas SHR anestesiadas en condiciones control y luego de la administración de hidrolizado de amaranto.

Con el primero de estos protocolos obviamente procuramos evaluar su efecto sobre la resistencia periférica, y con los dos restantes el posible efecto cardiaco.

### **Experimentos en anillos de aorta aislada**

En la Figura 78 podemos observar curvas dosis respuesta a la noradrenalina. Tanto en este caso como en el de la serotonina que se describe luego, los preparados se estabilizaron durante una hora a tensión de reposo de 2 gramos y luego se expusieron a concentraciones crecientes del agonista, dejando estabilizar la fuerza antes de agregar la dosis siguiente (5 a 10 minutos en promedio). Completada una curva se lavaba 6 veces con solución de Ringer hasta recuperar la línea de base, luego se incubaba media hora 2 cámaras con Ringer (control) y 2 cámaras con hidrolizado (1mg/ml) y por último se repetían las curvas.

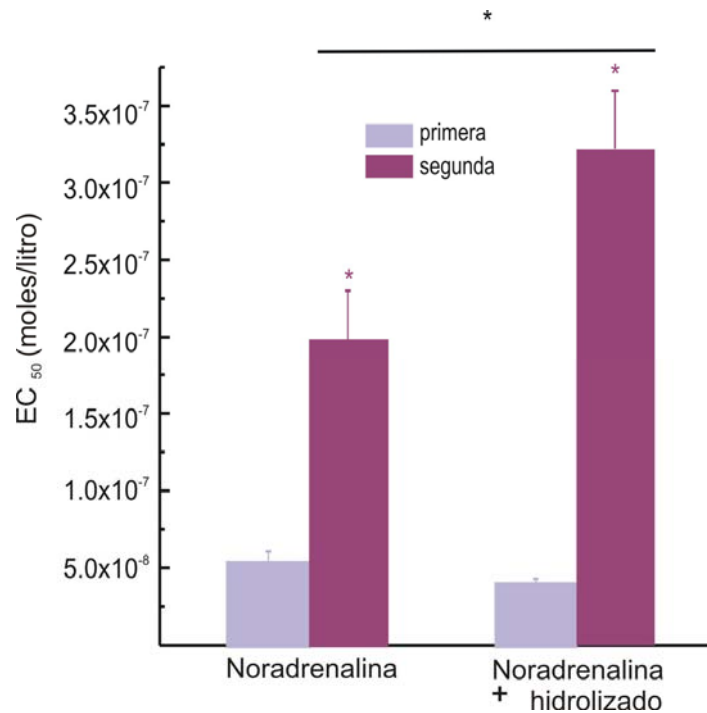
En el panel superior de la Figura 78 se observa la fuerza (gramos) en función de la concentración de noradrenalina (moles/litro) en dos curvas sucesivas realizadas en solución de Ringer como control. Como puede observarse la respuesta máxima no cambió en ambos casos, pero a las dosis de  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M de noradrenalina la fuerza obtenida en la segunda curva disminuyó significativamente con respecto a la primera (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En el panel inferior de la misma figura se observan otras dos curvas a la noradrenalina pero la segunda de ellas efectuada luego de incubar media hora con 1 mg/ml de hidrolizado de amaranto (alcalasa 4 horas), y como puede verse se produjo una disminución significativa de la fuerza en todas las concentraciones ensayadas (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En experimentos adicionales en los cuales se repitió este protocolo efectuando la segunda curva en presencia de L-NAME 100 mM, el efecto depresor del hidrolizado sobre la contracción vascular se continuó manifestando (experimentos no ilustrados).



**Figura 78:** 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 inferior la segunda curva fue realizada previa incubación con hidrolizado de amaranto (1 mg/ml). (Fritz y col., 2009).

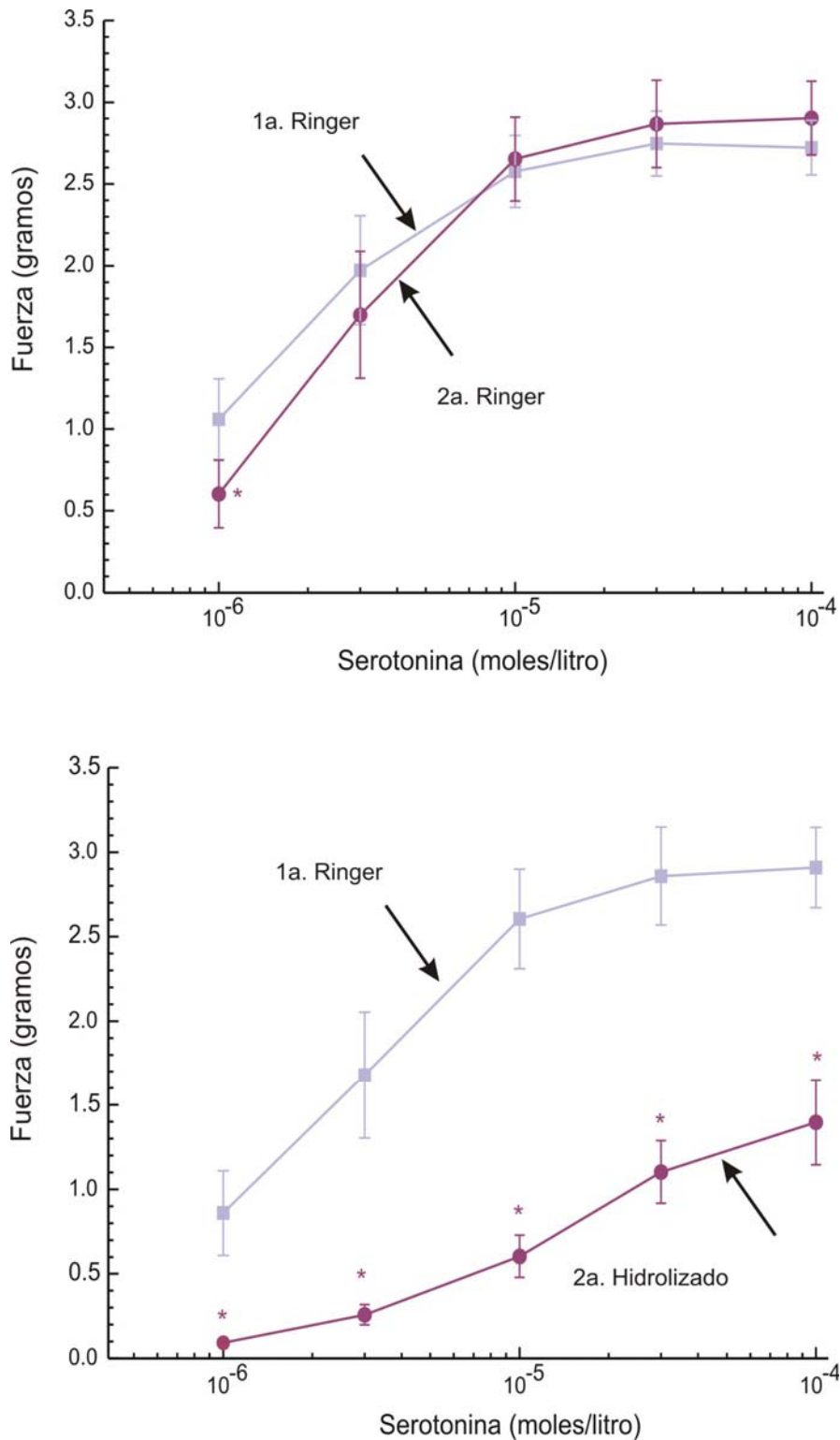
En la Figura 79 se puede ver la concentración efectiva 50 para noradrenalina. En las dos barras de la izquierda se observa que la simple repetición de la curva en condiciones control aumentó significativamente la  $EC_{50}$  (test de t por apareadas,  $p <$

0,05); y en las barras de la derecha se observa que la repetición de las curvas en presencia del hidrolizado aumento la  $EC_{50}$  más todavía y también en forma significativa (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, el incremento de  $EC_{50}$  obtenido con hidrolizado fue significativamente superior al obtenido en situación control.



**Figura 79:** Concentración efectiva 50 para la noradrenalina calculada a partir de los datos de la figura 78.

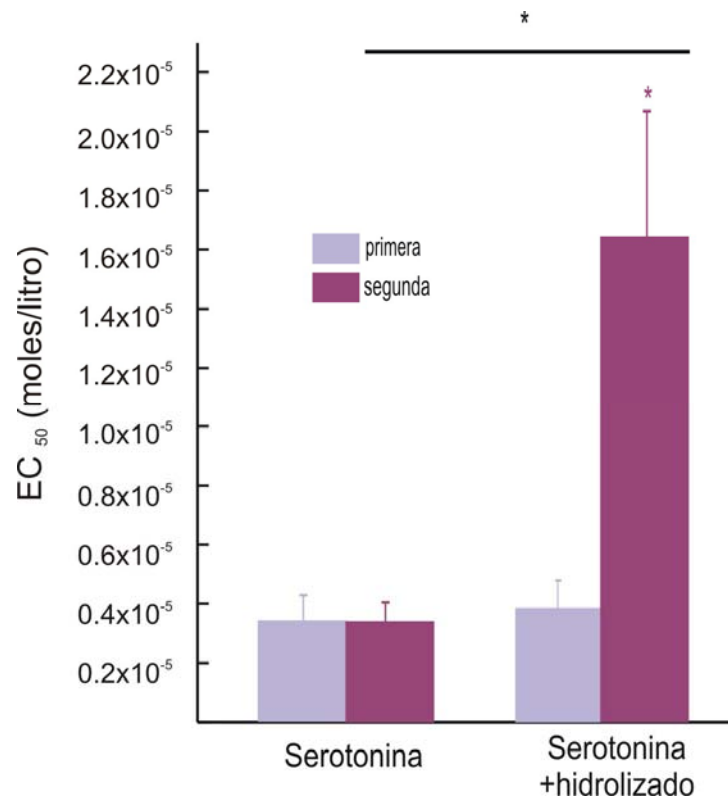
En la Figura 80 panel superior puede verse que la repetición de la curva dosis respuesta a la serotonina no modificó la respuesta máxima y solamente se produjo una disminución significativa de la fuerza a la dosis de  $10^{-6}$  M (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En el panel inferior de la misma Figura se observan dos curvas sucesivas a serotonina, la segunda de ellas luego de incubar media hora con hidrolizado (1 mg/ml), y puede verse que en este último caso se produjo una disminución significativa de la fuerza en todas las concentraciones ensayadas (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ). En experimentos adicionales en los cuales se repitió este protocolo efectuando la segunda curva en presencia de L-NAME 100 mM, el efecto depresor del hidrolizado sobre la contracción vascular se continuó manifestando (experimentos no ilustrados).



**Figura 80:** Fuerza desarrollada por anillos aislados de aorta (n=8-10) en 2 exposiciones sucesivas a serotonina desde  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M. En el panel inferior la segunda curva fue realizada previa incubación con hidrolizado de amaranto (1 mg/ml).

En la Figura 81 puede verse que en el caso de la curva a la serotonina repetida dos veces en condiciones controles (dos barras de la izquierda) no hubo cambios significativos de la  $EC_{50}$ . Cuando se repitió la curva en presencia de hidrolizado (dos

barras de la derecha) se produjo un incremento significativo de la  $EC_{50}$  con respecto a la situación control (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ).



**Figura 81:** Concentración efectiva 50 para la serotonina calculada a partir de los datos de la figura 80.

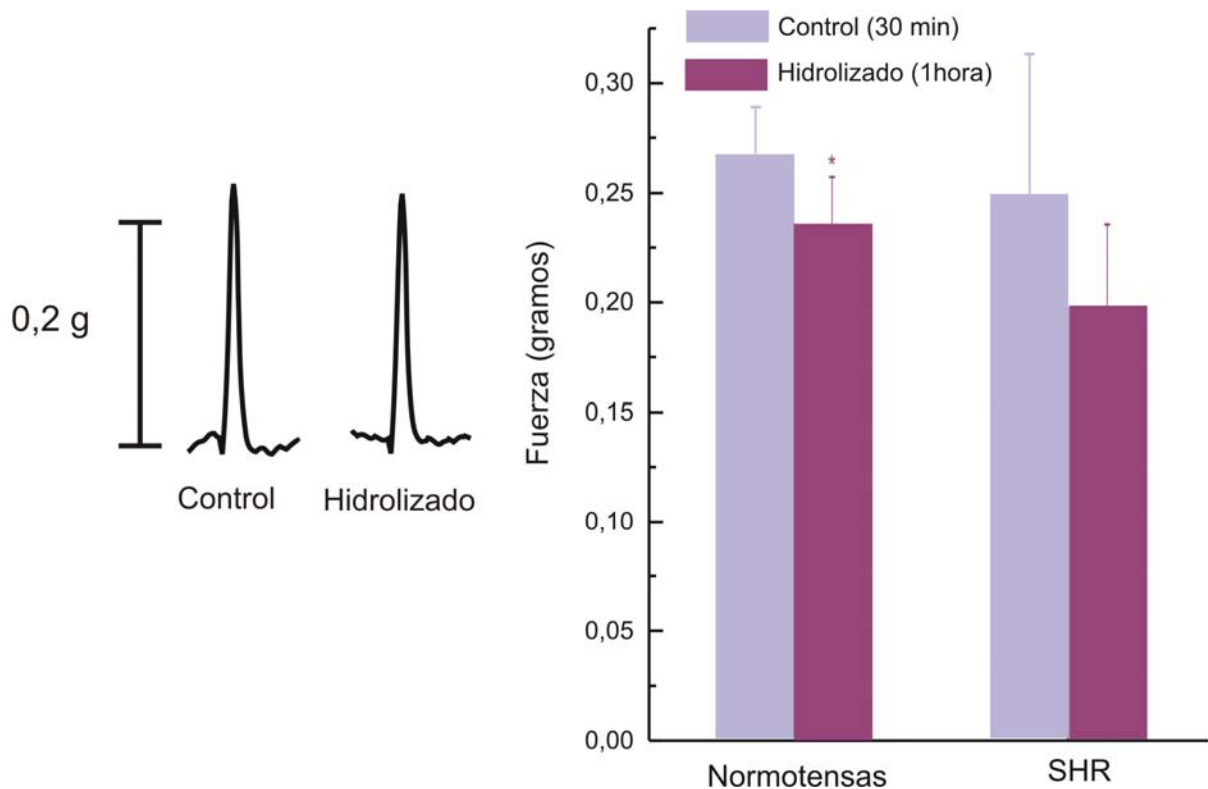
Como conclusión de estos experimentos podemos decir que los hidrolizados de amaranto *in-vitro* produjeron un antagonismo de tipo no competitivo con respecto a la noradrenalina y serotonina, ya que disminuyó la fuerza máxima y aumentó la  $EC_{50}$  y que estos efectos fueron independientes del estado funcional del endotelio. Por lo tanto y en base a estos experimentos podríamos concluir que el efecto observado sobre la presión arterial se debió a una disminución del tono vascular y de la resistencia periférica. Esto podría deberse a una acción inhibidora sobre el sistema renina-angiotensina local, o bien a algún otro efecto no aclarado sobre los receptores de noradrenalina y serotonina.

### **Contracción de músculo papilar de corazón de rata**

Los músculos papilares se estimularon eléctricamente a una frecuencia de 0,5 Hz estabilizándolos durante 30 minutos en solución de Ringer; pasado ese tiempo el preparado se expuso durante una hora nuevamente a solución de Ringer (experimentos control en ratas normotensas), o bien a solución de Ringer con hidrolizado de amaranto (alcalasa 4 horas) con una concentración de 1 mg/ml en ratas

normotensas y en ratas SHR. Se comparó la fuerza al fin de los primeros 30 minutos con la fuerza al fin de los 90 minutos de duración del protocolo. También se obtuvieron las derivadas positiva y negativa de la fuerza en función del tiempo y se midieron los valores máximos de ambas en los mismos puntos mencionados (30 minutos y 90 minutos).

Como se ve en la Figura 82 la exposición a hidrolizado de amaranto deprimió levemente la fuerza de contracción, y la disminución solamente fue significativa en ratas normotensas (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ) pero no en SHR. En los experimentos control en ratas normotensas la exposición a Ringer en dos periodos consecutivos no produjo disminución significativa de la fuerza (experimentos no ilustrados).

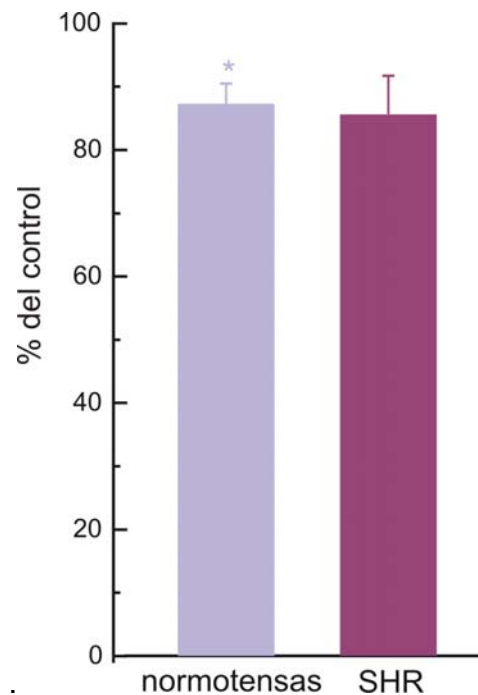


**Figura 82:** Panel izquierdo: registro individual de la fuerza desarrollada por un músculo papilar en condiciones control y luego de la exposición al hidrolizado. Panel derecho: fuerza desarrollada por músculos papilares de ratas normotensas ( $n=10$ ) y SHR ( $n=9$ ) estimulados eléctricamente a una 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). (Fritz y col., 2009).

En la Figura 83 la barra de la izquierda representa el porcentaje de la fuerza al fin de los 60 minutos de incubación con hidrolizado de amaranto en ratas normotensas; y la barra de la derecha representa el mismo valor en ratas SHR. Como puede observarse el

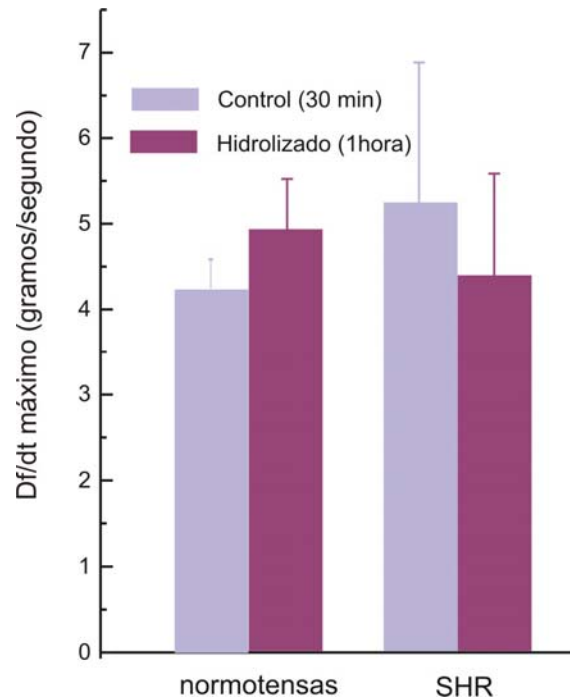


descenso porcentual fue de alrededor de un 13 % en ambos tipos de ratas, pero solamente fue significativo en las ratas normotensas (test de t por apareadas,  $p < 0,05$ ).

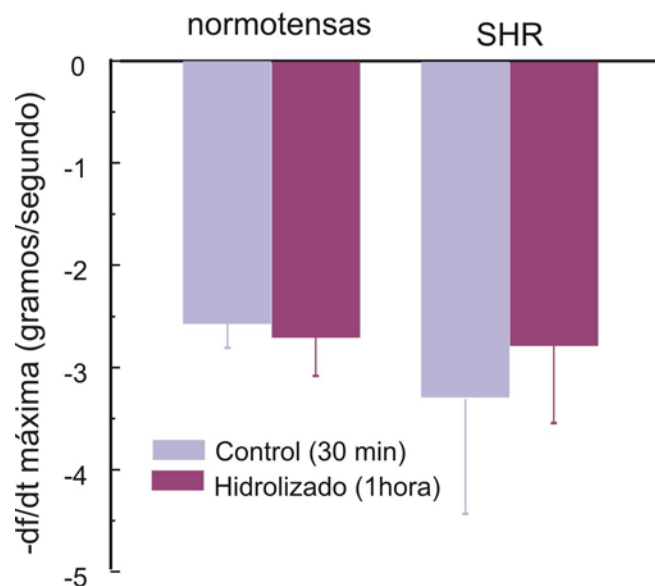


**Figura 83:** Fuerza desarrollada por músculos papilares de ratas normotensas (n=10) y SHR (n=9) estimulados eléctricamente a una frecuencia de 0,5 Hz. y en presencia de hidrolizado, expresada como porcentaje de la fuerza desarrollada al fin de la incubación con Ringer normal.

Con respecto a la derivada de la fuerza en función del tiempo, las Figuras 84 y 85 muestran, respectivamente, que tanto el  $df/dt$  positivo como el negativo en sus picos máximos no tuvieron cambios significativos luego de 60 minutos de incubación con hidrolizado de amaranto.



**Figura 84:** Máxima velocidad de desarrollo de la fuerza de los experimentos mostrados en la figura 82. Puede observarse que tanto en las normotensas (n=10) como en las SHR (n=9) no hubo variaciones significativas inducidas por la incubación con hidrolizado de amaranto (test de t por apareadas, NS).

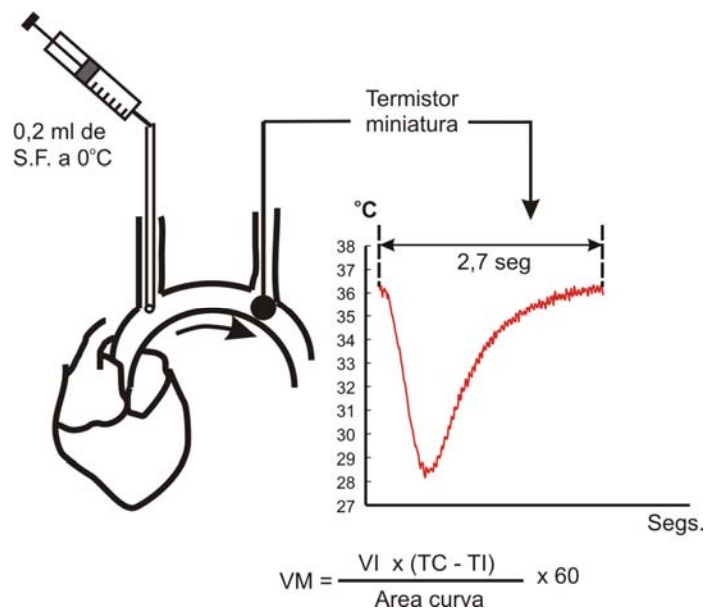


**Figura 85:** Mínima velocidad de desarrollo de la fuerza de los experimentos mostrados en la figura 82. Puede observarse que tanto en las normotensas (n=10) como en las SHR (n=9) no hubo variaciones significativas inducidas por la incubación con hidrolizado de amaranto (test de t por apareadas, NS)

### Medida de volumen minuto

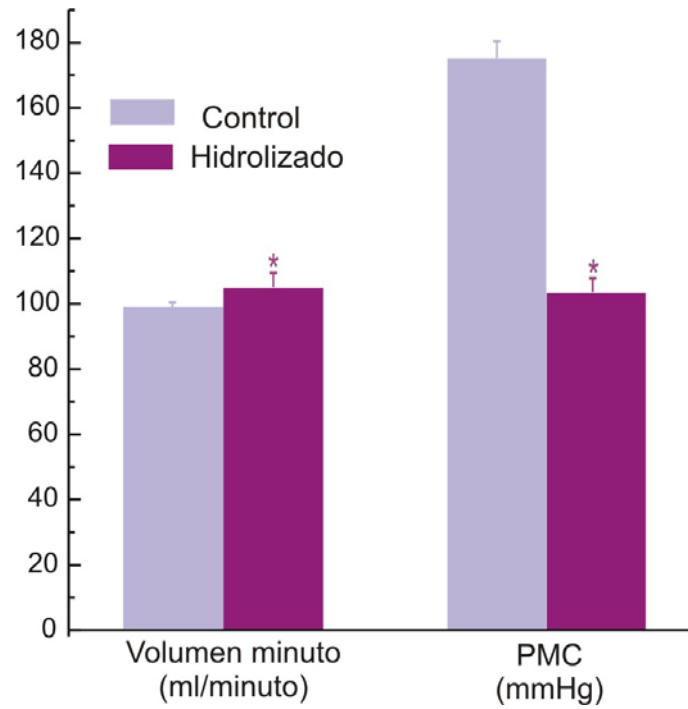
El volumen minuto se estudió en ratas SHR anestesiadas en las cuales se midió además presión media carotídea en forma simultánea. El hidrolizado fue administrado por una gastrostomía en forma similar a los experimentos en ratas conscientes. En la Figura 86 se muestra esquemáticamente el procedimiento utilizado para registrar la

curva de termodilución y el método de cálculo del volumen minuto empleando el equipamiento descrito en métodos.



**Figura 86:** Esquema del método de termodilución utilizado para medir volumen minuto. El volumen inyectado (VI) llega al termistor miniatura y provoca un inmediato descenso de temperatura del mismo (indicada por el registro que aparece arriba) que rápidamente desaparece a causa de la sangre circulante que devuelve el termistor a la temperatura corporal. Conociendo la temperatura corporal (TC), la temperatura del inyectato (TI) y midiendo el área bajo la curva temperatura-tiempo se puede calcular el volumen minuto (VM) mediante la fórmula indicada.

En la Figura 87 pueden verse en las dos barras de la izquierda los valores de volumen minuto en condiciones control y después de media hora de la administración intragástrica del hidrolizado, utilizando una concentración de 1,5 g/kg que había tenido un efecto importante en los experimentos en ratas conscientes. Como puede observarse se produjo un discreto pero significativo aumento del volumen minuto de aproximadamente un 7 % con respecto al valor basal de  $98 \pm 3$  ml/minuto (test de t por apareadas,  $n = 8$ ,  $p < 0,05$ ). En las dos barras de la derecha de la misma figura se observa que el hidrolizado produjo una caída importante y significativa de la presión arterial tal como había ocurrido en ratas conscientes (test de t por apareadas,  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ). Teniendo en cuenta el escaso efecto directo del hidrolizado sobre músculos papilares, podríamos suponer que el aumento del volumen minuto que observamos en estos experimentos se debería en forma predominante al descenso de la postcarga producido por la caída de presión arterial.



**Figura 87:** Volumen minuto (barras de la izquierda) y presión media carotídea (PMC, barras de la derecha) medidos en ratas SHR anestesiadas en condiciones control y 30 minutos después de la administración intragástrica directa de 1,5 g/kg de hidrolizado de amaranto.

## Síntesis de los efectos de los hidrolizados proteicos de amaranto

Los resultados obtenidos *in Vitro* muestran que si bien el aislado nativo de *A. mantegazzianus* posee una actividad inhibidora de la ECA medible, su hidrólisis resulta en un incremento significativo de dicha actividad, que llega al máximo con los grados de hidrólisis de 45 y 65 %.

La administración intragástrica de los hidrolizados de amaranto fue efectiva para bajar la presión arterial en ratas en experimentos agudos *in vivo*. El efecto hipotensor fue más fácilmente detectable mediante registro directo de la presión arterial y administración intragástrica por gastrostomía, debiéndose con toda probabilidad a las menores molestias que este procedimiento causaba a los animales. Por el contrario la administración orogástrica del hidrolizado y la medición indirecta de presión arterial permitieron detectar también el efecto hipotensor pero a dosis más elevadas, y causando más molestias a los animales y mayor variabilidad en las lecturas de presión. El efecto hipotensor también puede evidenciarse mediante administración por gastrostomía y medición indirecta de la presión arterial si bien en forma menos consistente.

El efecto hipotensor debido presumiblemente a la actividad inhibidora de la ECA lo pudimos poner de manifiesto en diversos modelos: ratas espontáneamente hipertensas (SHR), ratas hipertensas por constricción de la arteria renal y ratas hipertensas por administración de fructosa.

Comprobado el efecto hipotensor se efectuaron experimentos adicionales para evaluar la actividad de los hidrolizados sobre el miocardio (responsable del volumen minuto) y sobre los vasos periféricos (responsables de la resistencia periférica). Los experimentos en donde se midió el efecto de los hidrolizados sobre músculos papilares aislados y sobre el volumen minuto en ratas anestesiadas demostraron una acción miocárdica escasa o nula. Por el contrario, los experimentos en aorta aislada demostraron un pronunciado efecto vasodilatador de los hidrolizados de amaranto que fue independiente del endotelio.

Queda como posibilidad para futuros estudios definir las cantidades de amaranto a administrar con la alimentación común que pudieran ser capaces de provocar un efecto similar al de los hidrolizados administrados en forma directa.

Las conclusiones del presente trabajo las podemos dividir en dos partes:

- a- conclusiones relativas al método de medición de la presión arterial
- b- conclusiones relativas al efecto de los hidrolizados de amaranto sobre el sistema vascular.

### **a- Método de medición de la presión arterial**

- Calentamiento de la rata: concluimos que es efectivo en cuanto a lograr un aumento de flujo en la arteria de la cola y una mejor señal de pulso; pero la cola no fue, al menos en nuestra experiencia, un órgano termorregulador importante. Para el calentamiento de los animales desarrollamos un tipo especial de incubadora que permitió evitar las muertes por sobrecalentamientos que eran habituales con otros métodos usados anteriormente.
- El desarrollo de un sistema de inmovilización adaptable a diferentes tamaños de animales ayudó a obtener registros de pulso menos afectados por los movimientos de la rata.
- El registro de las señales de presión y de pulso mediante un sistema de adquisición de datos permitió leer la presión arterial con precisión de 1 mmHg, y registrar cada lectura en forma de un archivo, permitiendo la posterior recuperación y/o análisis de los datos.
- El inflado del manguito ocluser mediante aire comprimido proveniente de un cilindro y un juego de válvulas para regular el flujo de aire permitió provocar menos molestias a los animales y obtener un registro más libre de artefactos inducidos por el movimiento de la rata. Esto también fue facilitado por el desarrollo de un inmovilizador de acrílico adaptable a los distintos tamaños de animales.
- En las determinaciones de presión arterial directa por cateterización carotídea crónica en ratas conscientes los valores de presión directa son medibles sin decaimiento con respecto al control hasta 48 horas posteriores a la operación. En todos los experimentos en los cuales empleamos esta técnica, las mediciones las efectuamos a las 24 horas garantizando así estar dentro de un período confiable en cuanto a la reproducibilidad de las lecturas.
- Para verificar la confiabilidad de las medidas obtenidas por el método crónico directo, comparamos estas determinaciones con medidas de presión aórtica obtenidas en

forma directa con una aguja metálica, que al ser muy rígida y de gran calibre interior podría considerarse como el valor más representativo de la presión arterial. El valor medio obtenido fue igual con ambos métodos, pero lo que sí presentó diferencias importantes fue la presión diferencial, que en el caso de los catéteres carotídeos se redujo entre un 50 y 60 % con respecto a la medida con la aguja aórtica. Este resultado era previsible y a la vez inevitable en función de los catéteres delgados que había que utilizar, y determinó que en todos los experimentos de presión directa utilizáramos la presión media como mejor estimación de la presión de la rata.

- La conclusión metodológica más importante fue la que obtuvimos con respecto a la toma de presión arterial por el método indirecto, ya que al disponer de una mayor precisión de lectura por el sistema de adquisición de datos mencionado pudimos extraer y publicar (Fritz y Rinaldi, 2007 y 2008) los siguientes aspectos prácticos:

1- durante la medición indirecta de la presión arterial la lectura obtenida durante el inflado del manguito es usualmente mayor que la obtenida durante el desinflado. Comparando con mediciones simultáneas efectuadas por cateterismo arterial comprobamos que el valor de inflado es el que coincide con el valor intraarterial sistólico real.

2- además del rol que pueden cumplir distintos factores físicos, en ratas Wistar el fenómeno mencionado precedentemente puede explicarse casi en su totalidad por la liberación local de óxido nítrico en respuesta a la oclusión de la arteria de la cola.

3- la diferencia entre los valores de inflado y desinflado en ratas SHR se debe menos a la producción de óxido nítrico, y es causada principalmente por el sistema nervioso simpático y los factores físicos locales. Esto quizás sea consecuencia de la depresión de la función endotelial que presentan estos animales.

4- como conclusión aplicable a la práctica, en la toma indirecta de presión arterial la oclusión de la arteria de la cola se debe hacer tan breve como sea posible y utilizar de preferencia la lectura obtenida durante el inflado del manguito como mejor estimación de la presión sistólica.

## **b- Efecto de los hidrolizados de amaranto sobre el sistema vascular**

- La dieta rica en colesterol no llego a producir los cambios esperados en la presión arterial y la reactividad vascular. Debido a esto, no se continuó aplicando este diseño para estudiar el posible efecto vascular del amaranto.
- Sin embargo, esta primera parte fue útil para poner a punto el equipo de medición automatizada de presión arterial indirecta.
- Mediante intubación orogástrica y medida indirecta de presión arterial pudimos comprobar que:
  - En las ratas Wistar no se vieron cambios significativos en la presión sistólica, durante 7 horas, ni con la administración de hidrolizado de amaranto, ni con la administración de agua.
  - En las ratas SHR, se vio un descenso en la presión sistólica indirecta de 30 mmHg a la tercer hora de administrar 2,4 g/kg rata de hidrolizado de amaranto (alcalasa 5 horas). No se vieron cambios significativos con concentraciones menores.
- Debido a la variabilidad que presenta el método de toma de presión indirecta y el estrés que provoca el método de intubación orogástrica en la rata consciente, comenzamos a utilizar un nuevo diseño experimental. El mismo consistió en medición directa de la presión media carotídea y administración intragástrica por gastrostomía del hidrolizado de amaranto, lo cual permitió observar un efecto sobre la presión arterial que con la técnica previa había sido imposible de detectar, o bien se había hecho evidente solamente a concentraciones muy elevadas del hidrolizado.
- Se puede concluir que el hidrolizado de amaranto fue efectivo para descender la presión arterial en forma sostenida en tres modelos diferentes de hipertensión arterial en la rata. En aquel que obtuvimos mayor cantidad de resultados fue en el modelo de ratas SHR y su control normotenso, pero aún con un número de animales más escaso por las dificultades comentadas también pudimos comprobar el efecto hipotensor en los otros dos modelos (hipertensión renal y por administración de fructosa).
- El efecto de los hidrolizados de amaranto fue hemodinámicamente similar al del captopril tanto en el modelo renal como en las SHR, si bien el efecto del captopril a dosis bajas solamente fue evidente en ratas hipertensas renales.



- A pesar de la mejora metodológica que significó la administración intragástrica por gastrostomía con medición directa de la presión arterial, en experimentos complementarios fuimos capaces de detectar el efecto hipotensor de los hidrolizados de amaranto en ratas SHR mediante administración por gastrostomía y medición indirecta de la presión arterial, si bien con mayor variabilidad que con la toma directa de presión.
- Si bien el efecto del hidrolizado de amaranto es indiscutible, faltaría definir una relación cuantitativa entre la cantidad que recibió la rata en forma intragástrica directa y la que podría incorporar al organismo luego de la ingesta de un alimento que contenga amaranto.
- 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, y se efectuaron mediciones de volumen minuto.
- 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 disminución de la resistencia periférica sería la causa de la caída de la presión sanguínea.
- Esta afirmación se demostró realizando experimentos en aorta aislada, en los que se observó una acentuada disminución de la contractilidad del músculo liso, que fue independiente de la funcionalidad del endotelio. 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 (Vecchi y Añón, 2009), es razonable suponer que ese efecto podría haber estado presente en los experimentos *in vivo* y podría ser el responsable del efecto hipotensor.
- En síntesis, puede concluirse que la administración intragástrica directa de hidrolizados de amaranto tiene un efecto hipotensor en la rata consciente que podría deberse 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.

$\Delta P$ : gradiente de presión  
5-HT: 5-hidroxitriptamina  
aa: aminoácido  
Ach: acetilcolina  
ACTH: hormona adenocorticotropa  
ADPc: adenosina difosfato cíclico  
AMPc: adenosina monofosfato cíclico  
Ang II: angiotensina II  
ATP: adenosina trifosfato  
AVP: arginina vasopresina  
C: caudal sanguíneo  
CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas  
DNP: Dendroaspis Natriuretic Peptide  
EC<sub>50</sub>: concentración efectiva 50 %  
ECA: Enzima Convertidora de Angiotensina  
eNOs: Oxido Nítrico sintetasa endotelial  
ET: endotelina  
GH: grado de hidrólisis  
GMPc: guanosina monofosfato cíclico  
h: viscosidad  
Hz: Hertz= ciclo por segundo  
IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato  
kD: kilo daltons  
L: longitud del conducto  
LC: cadenas livianas de la miosina  
L-NAME: N (G)-nitro-L- arginine methyl ester  
MLCK: quinasa de la cadena liviana de miosina  
NA: Noradrenalina  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido  
NOs: Oxido Nítrico sintetasa  
PCO<sub>2</sub>: presión parcial de dióxido de carbono  
PKC: proteína quinasa C  
PN: Péptidos Natriuréticos  
PNA: Péptido Natriurético Atrial

PNC: Péptido Natriurético Cerebral

PN-C: Péptido Natriurético tipo C

PO<sub>2</sub>: presión parcial de oxígeno

r: radio del tubo

R: resistencia

ROC: canales de Ca<sup>2+</sup> activados por receptores

rpm: revoluciones por minuto

Ry: receptor de rianodina

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

VM: volumen minuto

VOC: canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje

WKY: Wistar-Kyoto rats

WR: Ratas Wistar

- Acland RD. Practice Manual for Microvascular Surgery. The C. V. Mosby Company, St Louis, Washington DC, Toronto (1989).
- Adler-Nissen J. The Thermal Inactivation of Alcalase. In: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers. pp 340-363 (1986).
- Alvarez BV, Pérez NG, Ennis IL, De Hurtado MC, Cingolani HE. 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).
- Alvarez BV, Ennis IL, De Hurtado MC, Cingolani HE. Effects of antihypertensive therapy on cardiac sodium/hydrogen ion exchanger activity and hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Can J Cardiol.* 18: 667-672 (2002).
- Amado Cattaneo E, Rinaldi GJ, Gende AO, Venosa RA, Cingolani HE. Increased sensitivity to nifedipine of smooth muscle from hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 8: 915-920 (1986).
- Asaad MM, Antonaccio MJ. Vascular wall renin in spontaneously hypertensive rats. Potential relevance to hypertension maintenance and antihypertensive effect of captopril. *Hypertension.* 4: 487-493 (1982).
- Barba de la Rosa AP, Gueguen J, Paredes-López O, Viroben G. Fractionation procederes, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J Agric Food Chem.* 40: 931-936 (1992).
- Baron GD, Speden RN, Bohr DF. Beta-adrenergic receptors in coronary and skeletal muscle arteries. *Am J Physiol.* 223: 878-881 (1972).
- Barton M, Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol.* 86: 485-498 (2008).
- Batenburg WW, Krop M, Garrelds IM, de Vries R, de Bruin RJ, Burcklé CA, Müller DN, Bader M, Nguyen G, Danser AH. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of rennin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J Hypertens.* 25: 2442-2453 (2007).
- Bazil MK, Krulan C, Webb RL. Telemetric monitoring of cardiovascular parameters in conscious spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22: 897-905 (1993).

- Becerra R. "El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo". Boletín bimestral de la comisión nacional del conocimiento y uso de la biodiversidad. 30: 1-6 (2000).
- Becker R. Amaranth Oil: Composition, Processing, and Nutritional Qualities. In: Amaranth Biology, Chemistry and Tecnology. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 133-141 (1994).
- Beierwaites WB. Prorenin and Renin. In: Hypertension Primer. The essentials of high blood pressure: Basic science, Population science and clinical management. Izzo JL, Sica DA, Black HR (Eds.). AHA Learning Library. 4<sup>th</sup> ed. Dallas, Texas, USA (2008).
- Berne RM, Degeest H, Levy MN. Influence of the cardiac nerves on coronary resistance. Am J Physiol. 208: 763-769 (1965).
- Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA (Eds). Physiology. Mosby Editorial Company St. Louis Missouri USA. pp. 659-685 5<sup>th</sup> Ed. (2004).
- Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. Physiol Rev. 79: 763-854 (1999).
- Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulador. N Engl J Med. 347: 1795-1797 (2002).
- Braunwald E, Ross J, Jr Sonnenblick EH. Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. Little, Brown & Co, Boston, MA, USA. pp 1-39 (1976) a.
- Braunwald E, Ross J Jr, Sonnenblick EH. Mechanisms of contraction of the normal and failing heart. Little, Brown & Co, Boston, MA, USA. pp. 92-131. 2<sup>nd</sup> Ed. (1976) b.
- Bressani R. Composition and nutricional properties of amaranth. In: Amaranth Biology, Chemistry and Tecnology. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 185-205 (1994).
- Brilla CG, Zhou G, Rupp H, Maisch B, Weber KT. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. Am J Cardiol. 76: 8D-13D (1995).
- Brockway BP, Mills PA, Azar SH. A new method for continuous chronic measurement and recording of blood pressure, heart rate and activity in the rat via radio-telemetry. Clin Exp Hypertens A. 13: 885-895 (1991).
- Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central

- activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 32: 426-432 (2005).
- Brown PB, Franz G, Moraff H. *Electronics for the Modern Scientist*. Elsevier, New York, NY, USA. pp. 409-426 (1982).
  - Burton AC. *Physiology and biophysics of the circulation*. Year Book Medical Publishers, Chicago, Ill, USA. 2<sup>nd</sup> Ed. (1972).
  - Byrom FB, Wilson C. A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J Physiol*. 93: 301-304 (1938).
  - Chavez-Jáuregui RN, Silva MEMP, Áreas JAG. Extrusion Cooking Process for Amaranth (*Amarantus caudatus* L.). *J Food Science*. 65: 1009-1015 (2000).
  - Chen S, Paredes-López O. Isolation and characterization of the 11S globulin from amaranth seeds. *J Food Biochem*. 21: 53-65 (1997).
  - Cingolani HE. Mecánica cardíaca. Fenómenos sistólicos y diastólicos. En: *Fisiología Humana*. Cingolani HE y Houssay AB (Eds). Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 7ma Edición. pp 279-295 (2000).
  - Cobbold RSC. *Transducers for biomedical measurements: Principles and applications*. John Wiley & Sons. New York, NY, USA. pp 190-243 (1974).
  - Comroe JH. *Exploring the heart. Discoveries in heart disease and high blood pressure*. WW Norton and Co., New York-London. pp 218-222 (1983).
  - *Data Translation Product Handbook. Solutions for: DSP Data Acquisition, Data Acquisition and Imaging*. Data Translation Company, 100 Locke drive, Marlboro, Massachusetts. USA (1995).
  - de Bold AJ, Borestein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci*. 28: 89-94 (1981).
  - De la Riva I. Control de la presión arterial. En: *Fisiología Humana*. Cingolani HE y Houssay AB (Eds). Editorial El Ateneo, Buenos Aires. 7ma Edición. pp 334-352 (2000).
  - De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*. 35: 1183-1188 (2000).
  - Downing SE: Baroreceptor regulation of the heart. In: *Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System. Volume I: The heart*. Berne RM,

- Sperelakis N, Geiger SR (Eds). American Physiological Society, Bethesda, Maryland, USA. pp. 581-621 (1979).
- Downton WJS. *Amaranthus edulis*: A high lysine grain amaranth. World Crops. 25: 20 (1973).
  - Dyson DH, McDonnell WN, Horne JA. Accuracy of thermodilution measurement of cardiac output in low flows applicable to feline and small canine patients. Can J Comp Med. 48: 425-427 (1984).
  - Dzau VJ. Significance of the vascular rennin-angiotensin pathway. Hypertension. 8: 553-559 (1986).
  - Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. J Hypertens Suppl. 6: S7-S12 (1988).
  - Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, Van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. Am J Cardiol. 88(9A):1L-20L (2001).
  - Dziuba J, Minkiewicz P, Nalecz D, Iwaniad A. Database of biologically active peptide sequences. Nahrung. 43: 190-195 (1999).
  - Fabiato A, Fabiato F. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. J Physiol (Paris). 75: 463-505 (1979).
  - Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallan EA. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. Hypertension. 18(5 Suppl): III126-133 (1991).
  - Fritz M, Esborrat L, Rinaldi G. Estudio de diversos lechos vasculares en ratas Sprague-dawley y sus implicancias prácticas en un estudio de reactividad vascular "in vivo". IX Congreso y 6tas Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata. Centro Cultural Islas Malvinas. 21 de Agosto de 2007 ( Resumen).



- Fritz M, Rinaldi G. Influence of nitric oxide-mediated vasodilation on the blood pressure measured with the tail-cuff method in the rat. *J Biomed Sci.* 14: 757-765 (2007).
- 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. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 58: 215-221 (2008).
- Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC. Amaranth seed protein hydrolysates have in-vivo and in-vitro antihypertensive activity. Enviado a publicar. 2009.
- Frumento AS. Elementos de biofísica. Editorial Intermedica. Buenos Aires. 3ª. Edición (1979).
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-376 (1980).
- Geddes LA, Baker E. Principles of Applied Biomedical Instrumentation. John Wiley & Sons. New York, NY, USA. pp 14-54 (1975).
- Ghatta S, Ramarao P. Increased contractile responses to 5-Hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta. *Lipids Health Dis.* 3: 19 (2004).
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.* 59: 347-381 (1934).
- Goldblatt H. Studies on experimental hypertension: II. The pathogenesis of experimental hypertension due to renal ischemia. *Ann Intern Med.* 11: 69-103 (1937).
- Gourine AV. On the peripheral and central chemoreception and control of breathing: an emerging role of ATP. *J Physiol.* 568: 715-724 (2005).
- Gow BS. Circulatory correlates: vascular impedance, resistance and capacity. In: *Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System. Volume II: Vascular smooth muscle.* Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV Jr (Eds.). American Physiological Society, Bethesda, Maryland, USA. pp 353-409 (1979).
- Guyton AC, Hall JE. *Medical Physiology.*, WB Saunders Co, Philadelphia, PA. 10<sup>th</sup> ed (2000).

- Guzman-Maldonado S, Paredes-López O. Functional products of plants indigenous to Latin American: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. In: Functional foods. Biochemical and processing aspects. G. Mazza (Ed.). pp 293-327 (1998).
- Harris RB, Kor H. Insulin sensitivity is rapidly reversed in rats by reducing dietary fat from 40% to 30% of energy. *J Nutr.* 122: 1811-1822 (1992).
- Harvey W, 1628. Anatomical studies on the motion of the heart and blood. The Leake Translation of 1928. Charles C. Thomas, Springfield, Ill, USA. 5<sup>th</sup> Ed. (1970).
- Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* 64: 767-771 (1996).
- He HP, Cai Y, Sun M, Corke H. Extraction and purification of squalene from amaranthus grain. *J Agric Food Chem.* 50: 368-372 (2002).
- Hermansen K. A new method for determination of the systolic blood pressure in conscious rats. *Life Sci I.* 9:1233–1237 (1970).
- Hirsch AT, Pinto YM, Schunkert H, Dzau VJ. Potential role of the tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of congestive heart failure. *Am J Cardiol.* 66: 22D-30D (1990).
- Hofer AM, Lefkimmiatis K. Extracellular calcium and cAMP: second messengers as “third messengers”? *Physiology (Bethesda).* 22: 320-327 (2007).
- Hoffman BB. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. (Eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* McGraw-Hill. New York, NY. 10<sup>th</sup> Ed. pp. 215-269 (2001).
- Houssay BA. *Fisiología humana.* El Ateneo, Buenos Aires. 4<sup>a</sup> Edición (1970).
- Ikeda K, Nara Y, Yamori Y. Systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Lab Anim.* 25: 26–29 (1991).
- Katz AM. *Physiology of the Heart.* Raven Press, New York, NY. pp. 89-107 (1977) a.
- Katz AM. *Physiology of the Heart.* Raven Press, New York, NY. pp 107-119 (1977) b.

- Kigel J. Development and ecophysiology of amaranth. In: *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp 39-73 (1994).
- Kim Y, Yoon S, Yu D, Lönnerdal B, Cheung B. Novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human  $\alpha$ 1-casein expressed in *Escherichia coli*. *J Dairy Res*. 66: 431-439 (1999).
- Klabunde RE. *Cardiovascular Physiology Concepts*. Lippincott Williams & Wilkins. PA, USA (2005).
- Kohama Y, Oka H, Kayamori Y, Tsujikawa K, Mimura T, Nagase Y, Satake M. Potent synthetic analogues of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *Agric Biol Chem*. 55: 2169-2170 (1991).
- Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 51: 429-441 (2001).
- Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*. 16: 945-960 (2006).
- Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. G-Protein coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*. 111: 1806-1813 (2005).
- Kulakow PA, Hauptli H. Genetic characterization of grain amaranth. In: *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp 9-22 (1994).
- Kurabayashi M, Yazaki Y. Downregulation of angiotensin II receptor type 1 in heart failure. *Circulation*. 95: 1104-1107 (1995).
- Kurnjek ML, Mangiarua E, Basso N, Taquini AC. Further studies on the development of two kidney-two clip Goldblatt hypertension in 6-hydroxydopamine treated rats. *Hypertension*. 5: V3-7 (1983).
- Kurnjek ML, Basso N, Mikulic L, Taquini AC. Effect of ketanserin and prazosin on blood pressure and cardiovascular reactivity to vasopressor agents during the development of two kidney - two clip renal hypertension in the conscious rat. *Arch Int Physiol Biochim*. 97: 59-64 (1989).

- Lee RP, Wang D, Lin NT, Chou YW, Chen HI. Modified technique for tail cuff pressure measurement in unrestrained conscious rats. *J Biomed. Sci.* 9: 424–427 (2002).
- Levy MN, Pappano AJ. *Cardiovascular Physiology*. CV Mosby Co., St. Louis, MO, USA. 9<sup>th</sup> Edition (2007).
- Lipkin A, Anisimova V, Nikonorova A, Babakov A, Krause E, Bienert M, Grishin E, Egorov T. An antimicrobial peptide Ar-AMP from amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry*. 66: 2426-2431 (2005).
- Lisy O, Burnett JC Jr. Potential future therapies: natriuretic peptides. *Coron Artery Dis.* 10: 389-394 (1999).
- Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R. Dietary fish oil normalize dislipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochim Biophys Acta.* 1299: 175-182 (1996).
- López MG, Bello-Pérez LA, Paredes-López O. Amaranth carbohydrates. In: *Amaranth Biology, Chemistry and Tecnology*. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA.pp. 107-131 (1994).
- Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield MM, Bailey JE, Sandberg SM, Heublein DM, Burnett JC. Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension.* 28: 472-477 (1996).
- Mariani DD, Lorda G, Balatti AP. Influencia del amaranto en la producción de alfa-amilasa empleando *Aspergillus niger* NRRL 3112. *Rev Argent Microbiol.* 32: 185-189 (2000).
- Martínez NE, Añón MC. Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *J Agric Food Chem.* 44: 2523-2530 (1996).
- Martínez EN, Castellani OF, Añón MC. Common molecular features among amaranth storage proteins. *J Agric Food Chem.* 45: 3832-3839 (1997).
- Martirosyan DM, Miroshnichenko LA, Kulakova SN, Pogojeva AV, Zoloedov VI. Amaranth oil application for coronary heart disease and hipertensión. *Lipids Health Dis.* 6: 1-12 (2007).

- Matsui T, Li CH, Osajima Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J Pept Sci.* 5: 289-297 (1999).
- Matsui T, Tamaya K, Seki E, Osajima K, Matsumoto K, Kawasaki T. Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29: 204-208 (2002).
- Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res.* 68: 366-375 (2005).
- Megías C, Del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. Purification of an ACE inhibitory peptide alter hydrolysis of sunflower (*Heliantus annuus L.*) protein isolates. *J Agric Food Chem.* 52m: 1928-1932 (2004).
- Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors.* 21: 55-61 (2004).
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A. Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J Nutr.* 94: 731-737 (2005).
- Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J Nutr.* 136: 1457-1460 (2006).
- Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre A. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 78: 2960-2966 (2006).
- Miguel M, Alvarez Y, López-Fandiño R, Alonso MJ, Salaices M. Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regul Pept.* 140: 131-135 (2007).
- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1: S193-201 (2006).
- Morris Quevedo HJ, Arceo AA, Farnés OC, Díaz Abdala RT. Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. *Rev Cubana Aliment. Nutr.* 15: 85-89 (2001).
- Murphy RA, Rembold CM. The latch-bridge hypothesis of smooth muscle contraction. *Can J Physiol Pharmacol.* 83: 857-864 (2005).

- Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. *Br J Cancer*. 87: 31-36 (2002).
- Nakano T, Hidaka H, Uchida J, Nakajima K, Hatta Y. Hypotensive effects of wakame. *J Jpn Soc Clin Nutr*. 20: 92 (1998).
- Nazer MA, Van Breemen C. A role for the sarcoplasmic reticulum in Ca<sup>2+</sup> extrusion from rabbit inferior vena cava smooth muscle. *Am J Physiol*. 274: H123-H131 (1998).
- Oberleithner H, Ludwig T, Riethmüller C, Hillebrand U, Albermann L, Schäfer C, Shahin V, Schillers H. Human endothelium, target for aldosterone. *Hypertension*. 43: 952-956 (2004).
- Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 27: 282-293 (1963).
- Olds RJ, Olds JR. A colour atlas of The Rat-dissection guide. Wolfe Medical Publications Ltd. London, UK (1979).
- Opie LH, Paterson DJ. Blood pressure and peripheral circulation. In *Heart Physiology, From Cell to Circulation*. Ed. By Lionel H. Opie. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA. 4<sup>th</sup> Edition (2004).
- O'Rourke M, Docherty JR. Effects of a high-cholesterol diet on vascular and endothelial function in rat aorta. *Pharmacology*. 56: 1-6 (1998).
- Osborne T. In: *The Vegetable Proteins*. Longmans y Green, New York, NY, USA. 2<sup>nd</sup> Edition (1924).
- Palbøl J, Henningsen J. Blood pressure measurements in the conscious rat. An improved photoelectric, sphygmomanometric device. *Scand J Urol Nephrol*. 13: 319-321 (1979).
- Pantanelli A. Los Mayas ya lo sabían: prometedora resurrección del amaranto. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Buenos Aires (Argentina). Dirección Nacional de Alimentos. *Alimentos Argentinos (Argentina)*. 18: 60-63 (2001).
- Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hipertensión. *Circulation*. 87: 1468-1474 (1993).
- Patterson SW, Piper H, Starling EH. The regulation of the heart beat. *J. Physiol*. 48: 465-513 (1914).

- Popovic V, Popovic P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. *J Appl Physiol.* 15: 727-728 (1960).
- Rao MB, Tanksale M, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597-635 (1998).
- Re RN. The clinical implication of tissue rennin angiotensin systems. *Curr Opin Cardiol.* 16: 317-327 (2001).
- Reaux-Le Goazigo A, Iturrioz X, Fassot C, Claperon C, Roques BP, Llorens-Cortés C. Role of angiotensin III in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 7: 128-134 (2005).
- Rembold CM. Electromechanical and Pharmacomechanical Coupling. In: Bárány M. (Editor): *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction.* Academic Press. New York, NY, USA. pp: 227-240 (1996).
- Riegger AJ, Lever AF, Millar JA, Morton JJ, Slack B. Correction of renal hypertension in the rat by prolonged infusion of saralasin inhibitors. *Lancet.* 2: 1317-1319 (1977).
- Rinaldi G, Cingolani H. Relationship between baseline blood pressure and blood pressure decrease after calcium channel blockers in conscious rats. *Can J Cardiol.* 10: 743-747 (1994).
- Rinaldi GJ. Blood pressure fall and increased relaxation of aortic smooth muscle in diabetic rats. *Diabetes Metab.* 31: 487-495 (2005).
- Roks AJ, van Geel PP, Pinto YM, Buikema H, Henning RH, de Zeeuw D, van Gilst WH. Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *Hypertension.* 34: 296-301 (1999).
- Rowberg A, Franklin D, Van Citters RL. Nontraumatic method for measurement of blood pressure in animals with tails. *J Appl Physiol.* 27: 301-302 (1969).
- Rushmer RF. *Cardiovascular dynamics.* WB Saunders Co., Philadelphia, PA, USA. 3<sup>rd</sup>. Edition (1970).
- Ruzicka M, Leenen FH. Update on local cardiac renin-angiotensin system. *Curr Opin Cardiol.* 12: 347-353 (1997).
- Sanchez Gisande G. *Historia de la medicina.* Editorial Atlántida. Buenos Aires. pp 241-246 (1945).

- Sanders-Bush E, Mayer SE: 5-hydroxytryptamine (Serotonin): Receptor agonists and antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. (Editors). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, NY, USA. 10<sup>th</sup> Edition. pp. 269-291 (2001).
- Schirger JA, Heublein DM, Chen HH, Lisy O, Jougasaki M, Wennberg PW, Burnett JC Jr. Presence of Dendroaspis natriuretic peptide-like immunoreactivity in human plasma and its increase during human heart failure. *Mayo Clin Proc.* 74: 126-130 (1999).
- Schnetzler KA, Breene WM. Food uses and amaranth product research: A comprehensive review. In: *Amaranth Biology, Chemistry and Tecnology*. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 155–184 (1994).
- Scilingo AA, Molina Ortiz SE, Martínez EN, Añón MC. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility. *Food Res Int.* 35: 855-862 (2002).
- Segura-Nieto M, Barba de la Rosa AP, Paredes-López O. Biochemistry of amaranth proteins. In: *Amaranth Biology, Chemistry and Tecnology*. Paredes-López O (Ed). CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. pp. 75-106 (1994).
- Shin DH, Heo HJ, Lee YJ, Kim HK. Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. *Br J Biomed Sci.* 61: 11-14 (2004).
- Silva-Sánchez C, de la Rosa AP, León-Galván MF, de Lumen BO, de León-Rodríguez A, de Mejía E. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J Agric Food Chem.* 56: 1233-1240 (2008).
- Silver PJ, Kraffe DS. Pharmacological Regulation of Smooth Muscle by Ion Channels, Kinases, and Cyclic Nucleotides. In: Bárány M. (Editor): *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. Academic Press. New York, NY, USA. pp: 367-378 (1996).
- Slowing K, Ganado P, Sanz M, Ruiz E, Tejerina T. Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. *J Nutr.* 131: 994S-999S (2001).
- Stingo AJ, Clavell AL, Aarhus LL, Burnett JC Jr. Cardiovascular and renal actions of C-type natriuretic peptide. *Am J Physiol.* 262: H308-H312 (1992).
- Stocker SD, Osborn JL, Carmichael SP. Forebrain osmotic regulation of the



- sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35: 695-700 (2008).
- Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ. Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *Am J Clin Nutr*. 47: 420-427 (1988).
  - Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. *Diabetes*. 40: 280-289 (1991).
  - Stuehr DJ, Fasehum OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF. Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J*. 5: 98-103 (1991).
  - Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 15: 267-272 (2004).
  - Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation with mortality. *Circulation*. 82: 1730-1736 (1990).
  - Tipton CM, Sebastian LA, Overton JM, Woodman CR, Williams SB. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 71: 2206-2210 (1991).
  - Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacolo Rev*. 52: 639-672 (2000).
  - Tovar-Pérez EG, Guerrero-Legarreta I, Farrés-González A, Soriano-Santos J. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*. 116: 437-444 (2009).
  - Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*. 9: 277-284 (1996).
  - Vecchi B, Añón MC. ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*. 70: 864-870 (2009).
  - Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr*. 92: 357-366 (2004).
  - Vesely DL. Urodilatin: a better natriuretic peptide? *Curr Heart Fail Rep*. 4: 147-152 (2007).

- Vincent SR, Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*. 46: 755-784 (1992).
- Wang X, Reznick S, Li P, Liang W, van Breemen C. Ca(2+) removal mechanisms in freshly isolated rabbit aortic endothelial cells. *Cell Calcium*. 31: 265-277 (2002).
- Whitesall SE, Hoff JB, Vollmer AP, D'Alecy LG. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2408–H2415 (2004).
- Wilfert K, Drischel K, Unbehau A, Guski H, Persson PB, Stauss HM. Vascular Response to Angiotensin II in Atherosclerosis. Role of the Baroreflex. *Hipertensión*. 35: 685-690 (2000).
- Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Adrenal Cortex. In *Williams Textbook of Endocrinology*. WB Saunders Co. Philadelphia, PA, USA. 9<sup>th</sup> Edition (1998).
- Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*. 49: 501-506 (2001).
- Wu J, Ding X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Res Int*. 35: 367-375 (2002).
- Wyss JM. Central Nervous System in arterial pressure regulation. In *Hypertension Primer. The essentials of high blood pressure: Basic science, Population science and clinical management*. Izzo JL, Sica DA, Black HR (Eds). AHA Learning Library. Dallas, Texas. 4<sup>th</sup> Edition (2008).
- Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, Meng H, Shen L, Mehta P, Mehta JL. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18: 1433-1439 (1998).
- Yang HY, Yang SC, Chen JR, Tzeng YH, Han BC. Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr*. 92: 507-512 (2004).
- Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci Biotechnol Biochem*. 56: 1541-1545 (1992).

- Zheleznov AV, Solonenko LP, Zheleznova NB. Seed proteins of de wild and the cultivated *Amaranthus* species. *Euphytica*. 97: 177-182 (1997).
- Zuberbuhler RC, Bohr DF. Responses of coronary smooth muscle to catecholamines. *Circ Res*. 16: 431-440 (1965).
- Zucker IH. Novel mechanisms of sympathetic regulation in chronic heart failure. *Hypertension*. 48:1005-1011 (2006).