



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización de los Efectos Vasculares de
Extractos de Amaranto**

Adriana Barba Montoya

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

**Director de Tesis
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

**Codirector de Tesis
Dra. María del Carmen González Castillo**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2008



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de los Efectos Vasculares de los Extractos de Amaranto en Células Endoteliales**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Adriana Barba Montoya** y aprobada el **14 de 07 de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Director de la tesis)

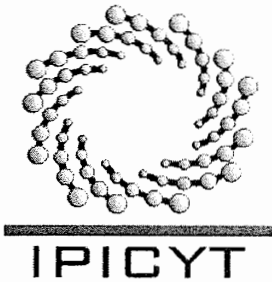
Dra. María del Carmen González Castillo
(Codirector de la tesis)

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Asesor de la tesis)

Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de las doctoras Ana Paulina Barba de la Rosa y María del Carmen González Castillo

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 204198).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 049 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2008, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. María del Carmen González Castillo	Presidente	UASLP
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Adriana Barba Montoya

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de los Efectos Vasculares de Extractos de Amarantho

que se desarrolló bajo la dirección de


Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dra. María del Carmen González Castillo (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:10 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2008.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



A mis padres por su gran amor y apoyo constante

A mi hermano José Antonio

A Ricardo

A mi tía Nena por creer siempre en mí

Agradecimientos

A todos los profesores de la División de Biología Molecular por su valiosa
enseñanza

A los técnicos académicos de los laboratorios 1, 2, 3, 4, 5 y 6 por su gran
apoyo y excelentes consejos en el desarrollo de los experimentos

A las señoras Sonia y Meche

ÍNDICE

ÍNDICE	
Constancia de Aprobación de la Tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de Examen	iv
Agradecimientos	vi
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades del Amaranto	1
1.2 Beneficios del Amaranto	2
1.3 Proteínas de la Semilla de Amaranto	4
1.4 Glutelinas	6
1.5 Péptidos Biológicamente Activos	6
1.6 Péptidos Inhibidores de la ECA	9
1.7 Enzima Convertidora de Angiotensina	10
1.8 Fármacos Inhibidores de la ECA	12
1.9 Angiotensina II	13
1.10 Bradicidina	14
1.11 Óxido Nítrico	19
1.12 Hipertensión	21
II. JUSTIFICACIÓN	24
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo General	25
3.2 Objetivos Específicos	25

IV. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 Extracción de Proteínas de Amaranto	26
4.2 Digestión de proteínas de Amaranto	27
4.3 Actividad de ECA	28
4.4 Cultivos Celulares	28
4.5 Cuantificación de Nitritos y Nitratos	29
4.6 Bioensayo de Relajación e Aortas de Rata	30
V. RESULTADOS	
5.1 Extracción y Digestión de Proteínas de Amaranto	31
5.2 Actividad de ECA	33
5.3 Cuantificación de Nitritos y Nitratos	34
5.4 Bioensayo de Relajación e Aortas de Rata	39
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	41
VII. REFERENCIAS	44
VIII. PERSPECTIVAS	54

RESUMEN

El amaranto (*Amaranthus spp.*), es una planta originaria de América, utilizada como cultivo medicinal en diversas partes del mundo. La semilla de amaranto posee un valor nutricional superior en comparación con otros granos, debido a su contenido alto de proteínas, y un mejor balance de aminoácidos esenciales que cereales y legumbres. La digestión trípica de la fracción glutelinas de la semilla de amaranto, origina, entre otros, péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La ECA está implicada en procesos patológicos como la hipertensión y la aterosclerosis, a través de la regulación de sustancias vasoactivas como angiotensina II y bradicidina. La bradicidina estimula la producción de óxido nítrico (NO), involucrado en la regulación de la vasodilatación. En el presente trabajo se caracterizaron los efectos vasculares dependientes de NO de los péptidos inhibidores de ECA derivados de digeridos trípticos de glutelinas (DTGs) de amaranto. Para tal efecto, se midió la actividad inhibitoria de los DTGs sobre ECA, obteniéndose una concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) de 200 µg/mL. También se cuantificó la producción de NO en células endoteliales de aorta de rata (CEC), tratadas con diferentes concentraciones de estos péptidos. La producción de NO se incrementó hasta en un 40% (102.6 µM) con respecto a la producción basal (57.15 µM) de dicha molécula. Por otro lado, en segmentos de aorta de rata, los DTG's tuvieron un efecto relajante dosis-dependiente. Estos datos sugieren que el incluir el amaranto en la dieta como alimento nutracéutico puede aportar beneficios en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión, además de ayudar a proteger del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

ABSTRACT

Amaranth (*Amaranthus spp.*), is native american plant, extensively used as a medicinal crop around the world. The amaranth seed has a higher nutritional value when compared with other grains, due to its high protein content, and a better balance of essential amino acids than cereals and legumes. The tryptic hydrolysis of glutelins fraction of amaranth seeds, originates, among others, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. ACE is involved in pathological processes such as hypertension and atherosclerosis, through the regulation of vasoactive substances like as angiotensin II and bradykinin. Bradykinin stimulates the production of nitric oxide (NO), which is involved in the regulation of vasodilation. In the present study the NO-dependent vascular effects of ACE- inhibitory peptides derived from glutelin tryptic digest (DTGs) was characterized. For these, the ACE inhibitory activity of DTGs was measured, obtaining a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 200 µg/ml. The NO production in endothelial cells of rat aorta (CEC), treated with different concentrations of DTGs was quantified. The NO production was increased about 40% (102.6 µ M) comparing with the baseline (57.15 µM). On the other hand, in rat aorta segments, the DTG's had a dose-dependent relaxing effect. These data suggest that including amaranth as nutraceutical food in the diet could bring benefits in treating diseases such as hypertension, also helping in the prevention of cardiovascular diseases.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del amaranto

El amaranto, *Amaranthus spp*, es una planta originaria de América que pertenece a la familia de las *Amaranthaceae* (Figura 1), la cual está integrada por alrededor de 60 géneros que incluyen un total de 800 especies (Paredes-López y Valverde, 2006). El amaranto se caracteriza por su capacidad de adaptación a diversos climas, por lo que se encuentra ampliamente distribuido en todos los continentes (Svirskis, 2003), principalmente en las regiones templadas y tropicales (Sauer, 1967). Algunas de estas especies son comestibles y como alimento, esta planta fue muy valorada por las antiguas culturas prehispánicas pues, además de ser un alimento energético brinda muchos beneficios a la salud (Paredes-López y Valverde, 2006).



Figura 1. Organografía de *Amaranthus spp*

El amaranto es recomendado por la Organización Mundial de la Salud como fuente de proteína nutricionalmente rica (Hibi *et al.*, 2003) y en 1975, la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos catalogó al amaranto dentro de las 36 especies vegetales más prometedoras del mundo (Svirskis, 2003). El potencial significativo que el amaranto tiene como cultivo, depende de diversos factores relevantes, como lo son su capacidad de crecer en muchas áreas del mundo con un buen rendimiento; la tolerancia a la sequía, altas temperaturas y plagas (Bressani, 1994); el contenido de proteína es de alta calidad (13-18%) en semillas y hojas secas (Svirskis, 2003; Abalone *et al.*, 2004; Segura-Nieto *et al.*, 1994). El balance de aminoácidos de las proteínas de semilla es altamente aceptable, pues se acerca al balance óptimo de aminoácidos sugerido por la FAO (Bressani, 1994; Segura-Nieto *et al.*, 1994).

1.2 Beneficios del Amaranto

El empleo del amaranto como planta medicinal, está considerablemente distribuido en el mundo, por lo que sus propiedades farmacológicas y fisiológicas se están comenzando a estudiar (Czerwinski *et al.*, 2004; Hilou *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2005; Martirosyan *et al.*, 2007; Silva-Sánchez *et al.*, 2008; Haskell *et al.*, 2005). En América, desde tiempos prehispánicos, los aztecas utilizaban el amaranto como un cultivo medicinal (Paredes-López y Valverde, 2006), pues las hojas las utilizaban para preparar infusiones contra la diarrea y para tratar el reumatismo (<http://www.amaranto.com.mx>). En algunas regiones de África, el amaranto es utilizado para tratar la malaria y otras enfermedades

parasitarias (Hilou *et al.*, 2006). Estudios recientes demostraron que la especie *A. spinosus* tiene propiedades anti-malaricas (Hilou *et al.*, 2006) y anti-microbianas (Lipkin *et al.*, 2005) debido a su contenido de betalainas, las cuales son conocidas por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antivirales y antiparasitarias (Hilou *et al.*, 2006). En la medicina tradicional china, el amaranto es empleado comúnmente para tratar la diabetes (Lin *et al.*, 2005). Se ha observado que la ingesta de alimentos preparados con amaranto estimula la producción de insulina, razón por la que el consumo de estos alimentos es recomendado a pacientes diabéticos (Guerra-Matías y Arêas, 2005).

Asimismo, los efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores del amaranto, también han llamado la atención de los investigadores. Se ha observado que la ingesta de alimentos preparados con amaranto no provoca reacciones alérgicas en la mucosa intestinal, por tal motivo, el consumo de estos alimentos se recomienda a pacientes que padecen la enfermedad celiaca (Guerra-Matías y Arêas, 2005) e hipercolesterolemia (Czerwinski *et al.*, 2004), los cuales presentan alergia a ciertos componentes presentes en los cereales. Lin y colaboradores (2005) demostraron que el extracto acuoso de la hoja de *A. spinosus* debe sus propiedades inmunoestimuladoras a una proteína de 313 kDa llamada GF1. Esta proteína tiene la capacidad de estimular la activación de linfocitos B, con la subsiguiente proliferación de linfocitos T *in vitro*. Por otro lado, el grano de amaranto, así como su extracto acuoso inhiben la producción de IgE antígeno-específica, inmunoglobulina implicada en respuestas de hipersensibilidad y alérgicas, a través de la inducción de citocinas pro-

inflamatorias (Th1) tanto *in vitro* como *in vivo* (Hibi *et al.*, 2003). Debido a sus propiedades inmunoestimuladoras e inmunomoduladoras, se ha sugerido al amaranto como una herramienta útil en el tratamiento de enfermedades alérgicas (Czerwinski *et al.*, 2004; Guerra-Matías y Arêas, 2005; Hibi *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005).

El consumo de amaranto en la dieta también es recomendado a pacientes con enfermedades cardiovasculares (Martirosyan *et al.*, 2007) pues se ha observado que el amaranto afecta de manera positiva el perfil lipídico plasmático en ratas alimentadas con dietas ricas en colesterol (Czerwinski *et al.*, 2004). El grano de amaranto contiene tocotrienoles y escualeno (He *et al.*, 2002; He y Corke, 2003), compuestos que, se ha observado, afectan la biosíntesis del colesterol en modelos animales (Martirosyan *et al.*, 2007). Asimismo, en hámsteres el aceite de amaranto es capaz de disminuir los niveles de colesterol (Berger *et al.*, 2003).

Los estudios de las propiedades bioquímicas y farmacológicas del amaranto han permitido considerar a esta planta como un alimento funcional (Silva-Sánchez, 2007). Los alimentos funcionales son aquellos que al ser consumidos regularmente ejercen un efecto específico y benéfico para la salud, más allá de sus propiedades nutricionales (Ohnishi y Yokoyama, 2004; Aoi *et al.*, 2006; Espin *et al.*, 2007;), pero dicho efecto debe ser probado científicamente (Espin *et al.*, 2007). La capacidad de los alimentos funcionales para reducir el riesgo de enfermedades crónicas, se ha asociado, en parte, a los metabolitos secundarios no nutricionales, los cuales se ha demostrado

ejercen un amplio rango de actividades biológicas (Espin *et al.*, 2007); aunque se sabe existen otras moléculas, como proteínas, péptidos, lípidos, entre otras, que también pueden participar (Czerwinski *et al.*, 2004; Guerra-Matías y Arêas, 2005; Lin *et al.*, 2005; Martirosyan *et al.*, 2007; Silva-Sánchez *et al.*, 2008;).

1.3 Proteínas de la Semilla de Amaranto

La cantidad de proteína presente en las semillas en general, varía de 10% (en cereales) al 40% (en algunas legumbres y semillas oleosas), por lo que son la principal fuente de proteína alimenticia (Shewry *et al.*, 1995). El amaranto es un pseudocereal, (Gorinstein *et al.*, 1998) y su semilla posee una composición química muy interesante, así como un valor nutricional superior en comparación con otros granos, ya sean cereales, legumbres o semillas oleosas (Bressani, 1994 (Gorinstein *et al.*, 1998). Las características que confieren al grano de amaranto un alto valor nutricional son su contenido relativamente alto de proteínas así como su patrón de aminoácidos esenciales, los cuales presentan mejor balance que cereales y legumbres (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Bressani, 1994; Segura-Nieto *et al.*, 1994; Scilingo *et al.*, 2002). Además, su contenido de lisina (3.2-6.4%) es más alto que el encontrado en los cereales más comunes, los cuales, generalmente, son deficientes en lisina y triptófano; por otro lado, la concentración de aminoácidos azufrados (2.6-5.5%) es mayor que la de las legumbres más importantes, las que son deficientes en dichos aminoácidos (Segura-Nieto *et al.*, 1994; Mandal y Mandal, 2000).

Con base en sus funciones biológicas, las proteínas de semilla se pueden clasificar en dos grandes grupos, proteínas constitutivas y proteínas de almacenaje. Las proteínas constitutivas son las responsables del mantenimiento del metabolismo celular. Las proteínas de almacenaje se caracterizan por tener, en su mayoría, pesos moleculares altos y son poco solubles en agua (Mandal y Mandal, 2000); tienen como única función proveer las proteínas que, como fuente de nitrógeno y azufre, son requeridas durante la germinación y el desarrollo de la nueva planta (Segura-Nieto *et al.*, 1994; Mandal y Mandal, 2000; Shewry *et al.*, 1995), por lo que se encuentran acumuladas en cantidades significativas en la semilla en desarrollo y compartimentalizadas en cuerpos proteínicos los cuales son rápidamente hidrolizados durante la germinación. Además del almacenaje, estas proteínas carecen de cualquier otra función y son sintetizadas únicamente en la semilla, particularmente en el cotiledón o en el endospermo (Figura 2), y no en otros tejidos (Mandal y Mandal, 2000; Shewry *et al.*, 1995). Las proteínas de almacenaje, a su vez, fueron clasificadas por Osborne de acuerdo a su solubilidad, en albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en concentraciones salinas altas; prolaminas, solubles en alcohol acuoso y glutelinas solubles en soluciones ácidas o alcalinas (Segura-Nieto *et al.*, 1994; Shewry *et al.*, 1995; Mandal y Mandal, 2000).

La fracción proteínica más abundante en las semillas de amaranto son las albúminas (48.9-65%), seguidas de las glutelinas (22.4-42.3%). Las globulinas representa el 13.7-18.1% del total de las proteínas y la fracción

menos abundante son las prolaminas con tan solo el 1-3.2% (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Segura-Nieto *et al.*, 1994; Scilingo *et.al*, 2002)

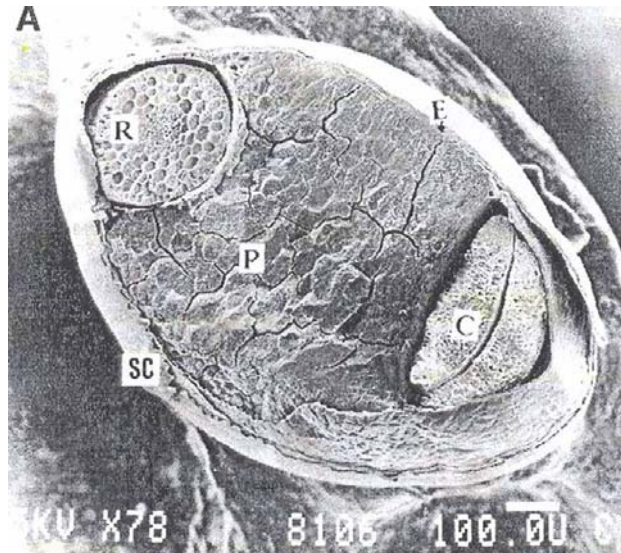


Figura 2. Micrografía electrónica de la semilla de *A. hypochondriacus*. R, raíz; E, endospermo; P, perispermo; C, cotiledones; SC, testa. (Segura-Nieto *et al.*, 1994)

1.4 Glutelinas

Las glutelinas representan la segunda fracción más importante en la semilla de amaranto donde forman grandes agregados unidos por enlaces disulfuro (Mandal y Mandal, 2000). Las glutelinas están compuestas por 6 conjuntos principales de polipéptidos, 2 con un peso molecular de alrededor de 55-67 kDa, 2 de 35-38 kDa y los más pequeños de 22-23 kDa (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Segura-Nieto *et al.*, 1994). Estos polipéptidos son homólogos en tamaño a los polipéptidos de legumbres, y algunos de ellos,

principalmente los de peso molecular cercano a los 30 kDa, presenta un punto isoeléctrico (pI) similar a los polipéptidos de legumbres, del mismo peso molecular (Abugoch *et al.*, 2003). Las glutelinas tienen un alto contenido de lisina (5.9-10.2%), así como tirosina + fenilalanina (6.7-10.3%) (Barba de la Rosa *et al.*, 1992; Segura-Nieto *et al.*, 1994). Las glutelinas de amaranto, a pesar de compartir las propiedades de solubilidad con las glutelinas de otras plantas, presentan características moleculares similares a las de las globulinas 11S (Abugoch *et al.*, 2003).

1.5 Péptidos Biológicamente Activos

Existe evidencia cuantiosa acerca de la existencia de péptidos y proteínas derivados de alimentos que pudieran brindar un efecto benéfico a la salud humana a través de una actividad biológica, por lo que en la actualidad son considerados sustancias bioactivas (Ohnishi y Yokoyama, 2004; Aoi *et al.*, 2006; Möller *et al.*, 2008). El término sustancia bioactiva se refiere a los componentes de los alimentos que pueden afectar procesos o sustratos biológicos y, por lo tanto, tener un impacto sobre la función o condición del cuerpo, y en última instancia, sobre la salud (Möller *et al.*, 2008). Para que un componente alimenticio sea considerado bioactivo, debe transmitir un efecto fisiológico que pueda ser medido, en un nivel fisiológico realista. Además, la bioactividad medida debe tener, por lo menos, el potencial de afectar la salud de una manera benéfica, la cual excluye efectos dañinos tales como toxicidad, provocar alergias o ser mutagénico (Möller *et al.*, 2008).

Si bien los péptidos bioactivos derivados de proteínas vegetales pueden tener un papel fisiológica importante en la misma planta, muchos de estos péptidos son liberados al consumir la planta como alimento, durante el tránsito gastrointestinal, por la acción de enzimas digestivas (Möller *et al.*, 2008), tales como tripsina, pepsina, quimiotripsina, etc. (Saiga *et al.*, 2002). Tal como se mencionó anteriormente, los péptidos bioactivos pueden estar codificados dentro de la secuencia de aminoácidos de una proteína mayor (Farrokhi *et al.*, 2008). Regularmente, dichos péptidos consisten de 2-20 aminoácidos (Vermeirssen *et al.*, 2004; Möller *et al.*, 2008) y pueden liberarse de la proteína original *in vivo*, durante la digestión, ya sea por enzimas digestivas, como la tripsina, o por enzimas microbianas, ya sean del tracto digestivo o de los mismos alimentos. *In vitro* pueden ser liberados durante el procesamiento o la maduración de los alimentos por enzimas aisladas o microbianas (Möller *et al.*, 2008).

Son numerosos los efectos de péptidos bioactivos liberados por proteólisis enzimática de proteínas alimenticias que se han descrito, tales como actividades opioides, antitrombóticos, antihipertensivos, inmunomoduladores, osteoprotectores, antioxidantes, antimicrobianos, anticarcinogénicos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, entre otras (Vermeirssen *et al.*, 2002; Rutherford-Markwick y Moughan, 2005; Möller *et al.*, 2008; Silva-Sánchez *et al.*, 2008). Cabe mencionar que algunos péptidos específicos pueden tener uno o más efectos biológicos diferentes (Möller *et al.*, 2008).

1.6 Péptidos Inhibidores de la ECA

Los péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se han aislado de muchas proteínas derivadas de productos alimenticios tales como la espinaca (Yang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004), huevo (Miguel y Aleixandre, 2006), productos lácteos (FitzGerald y Meisel, 2000; Hernández-Ledesma *et al.*, 2002; Takano, 2002; Nakamura *et al.*, 1995; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2004b; Hernández-Ledesma *et al.*, 2007), soya (Cha y Park, 2005), arroz (Chen *et al.*, 2007), trigo (Vermeirssen *et al.*, 2002; Motoi y Kodama, 2003), productos animales (Yu *et al.*, 2006; Cinq-Mars y Li-Chan, 2007; Qian *et al.*, 2007) y amaranto (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

Como todos los péptidos bioactivos, los péptidos inhibidores de la ECA contienen entre 2 y 20 residuos de aminoácidos. Estos péptidos se caracterizan por tener propiedades antihipertensivas potenciales *in vivo* (Vermeirssen *et al.*, 2004), a través de su actividad inhibitoria sobre la ECA, la cual juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema cardiovascular (Tsai *et al.*, 2008) (Figura 4).

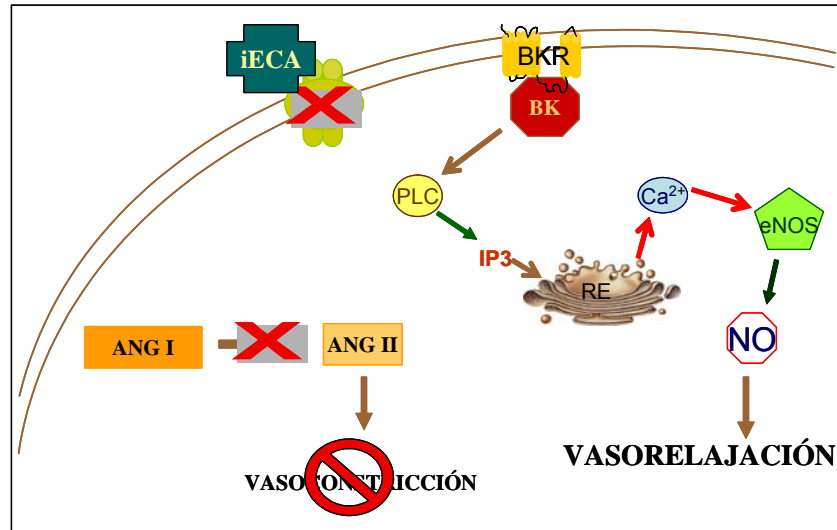


Figura 4. Posible mecanismo de acción de los péptidos inhibidores de la ECA. Al inhibir a la ECA, la angiotensina I no es convertida en angiotensina II y el efecto vasoconstrictor se suprime. Asimismo, la bradicidina (BK) no es inactivada, por lo que se une a su receptor y desencadena una respuesta fisiológica que culmina con la liberación de óxido nítrico el cual estimula la vasorelajación (Moreau *et al*, 2005)

Tal como en el caso de los fármacos inhibidores de la ECA, la correlación estructura-actividad de diferentes péptidos inhibidores de la ECA indica que la secuencia del tripéptido C-terminal influencía fuertemente la unión al sustrato. Si bien la especificidad del sustrato aún no se entiende completamente, se ha sugerido que la ECA tiene más afinidad por sustratos o inhibidores competitivos que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las tres posiciones C-terminal, o bien, una lisina o arginina en el mismo sitio, con carga positiva en su grupo amino. También se ha propuesto que el mecanismo de inhibición de la ECA involucra una interacción entre el inhibidor y un sitio de unión aniónico distinto al sitio catalítico. Así, se plantea que la conformación del péptido, por ejemplo la estructura adoptada en un ambiente

específico, debe contribuir a la potencia del inhibidor. Si bien todos los inhibidores de la ECA se unen al sitio catalítico C-terminal (Figura 4), los hidrofóbicos tienen la capacidad de unirse al sitio catalítico insertado en el N-terminal y por esto son mejores bloqueadores de la enzima (Vermeirssen *et al.*, 2004).

En el caso de los dipéptidos inhibidores de la ECA, la presencia de una tirosina en estos péptidos confiere una actividad inhibitoria mayor que la fenilalanina, pero menor que la de los dipéptidos con prolina en el extremo C-terminal. Después de la administración oral en ratas hipertensas espontáneas, los dipéptidos con tirosina en el extremo C-terminal provocó una reducción lenta pero prolongada de la presión arterial, en comparación con los dipéptidos con fenilalanina localizadas en el mismo extremo, los cuales produjeron una disminución más rápida y menos duradera (Vermeirssen *et al.*, 2004).

1.7 Fármacos Inhibidores de la ECA

Los inhibidores sintéticos de la ECA, como el captopril y enalapril (Figura 5), son comúnmente utilizados en el tratamiento de enfermedades tales como hipertensión, falla congestiva cardiaca, neuropatía diabética entre otras (Ignjatovic *et al.*, 2002). Dichos fármacos son efectivos para disminuir la presión arterial (Yang *et al.*, 2007) pues se dirigen al sitio activo de la ECA (Reid, 2001). Además, se ha demostrado que el captopril y el enalapril son potentes activadores de la óxido nítrico sintasa (NOS), posiblemente a través de la

reducción de especies reactivas de oxígeno lo que promueve la estabilización de la forma dimérica de NOS (Pechanova, 2007) Tienen la capacidad de disminuir la resistencia vascular sistémica sin aumentar la frecuencia cardiaca. Además de bloquear la conversión de angiotensina I a angiotensina II, también inhiben la degradación de la bradicidina, ya que se ha observado que un agonista del receptor de bradicidina, el icatibant, bloquea el efecto hipotensor sanguíneo del captopril (Gainer *et al.*, 1998) contribuyendo de esta manera a su actividad hipotensora (Benowitz, 2001). El captopril tiene una actividad antihipertensiva ya que inhibe al sistema renina-angiotensina y estimula al sistema calicreína-cinina (Figura 6) (Benowitz, 2001)

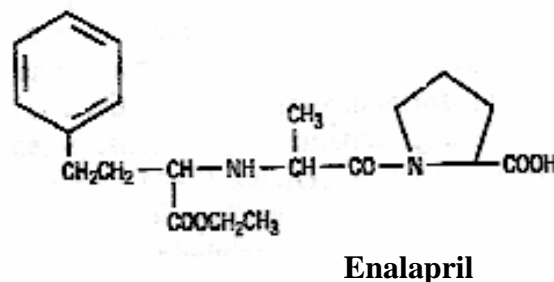
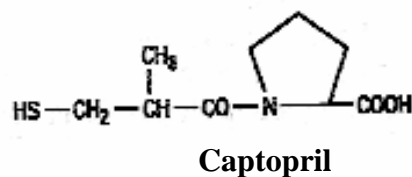


Figura 5. Estructura química de los fármacos inhibidores de la ECA captopril y enalapril (Reid, 2001)

Estudios recientes en modelos celulares proponen que los inhibidores de la ECA potencian los efectos inducidos por bradicidina por medio de la

inhibición de la desensibilización de sus receptores, más que por la inhibición de su hidrólisis por la ECA. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre aún no se ha elucidado, aunque se ha sugerido que puede involucrar un entrecruzamiento entre la ECA y el receptor de bradicidina del tipo 2 (Tom *et al.*, 2002)

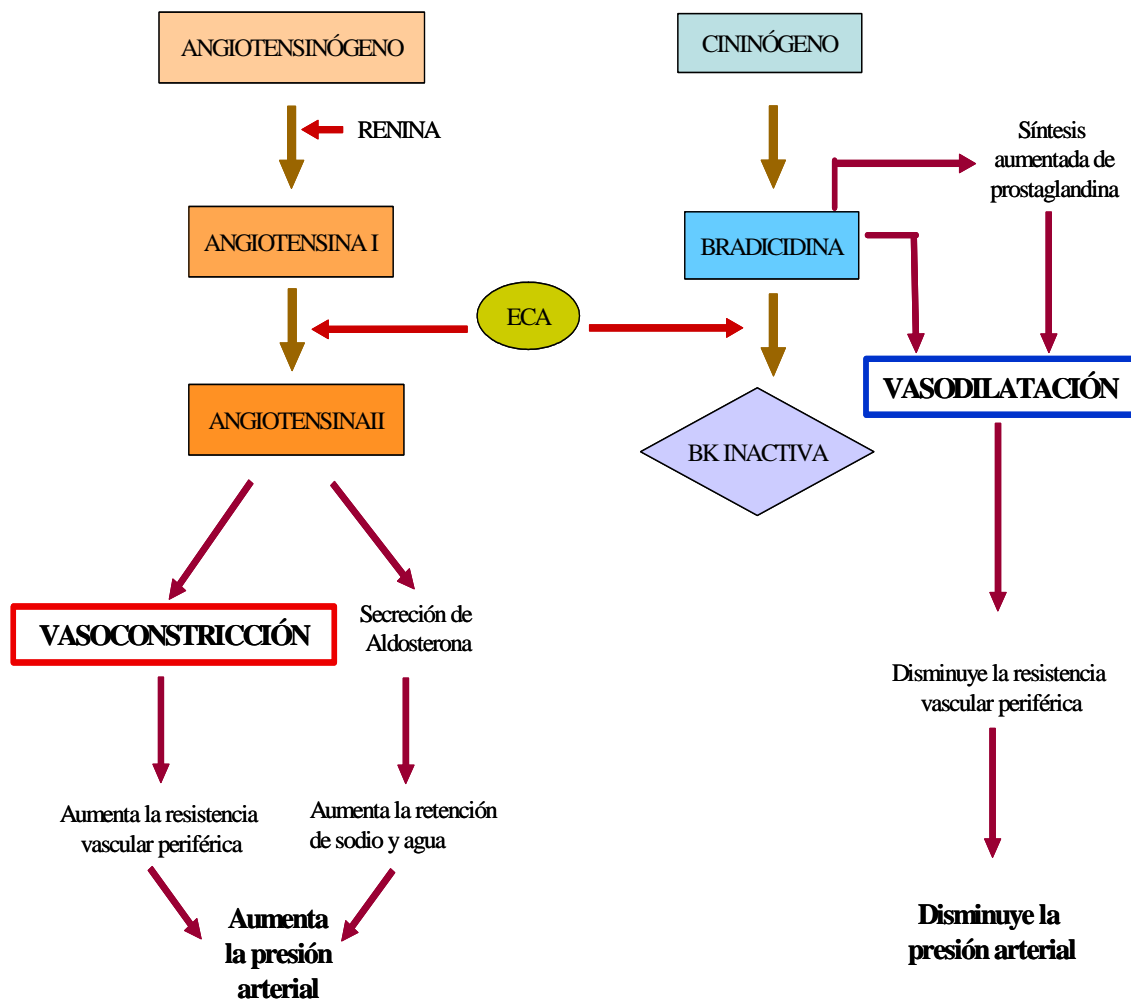


Figura 6. Actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) sobre los sistemas renina-angiotensina y caliceína-cinina. La ECA actúa sobre la angiotensina I convirtiéndola en angiotensina II, principal efector del sistema renina-angiotensina y potente vasoconstrictor. La ECA también tiene la capacidad de inactivar la bradicidina, principal efector del sistema caliceína-cinina y potente vasodilatador (Reid, 2001).

1.8 Enzima Convertidora de Angiotensina

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una dipeptidil carboxipeptidasa dependiente de zinc, compuesta de cerca de 1300 aminoácidos, con un peso aproximado de 150-180 kDa (Moreau *et al.*, 2005). Se encuentra anclada en la membrana plasmática celular de la mayoría de los tejidos, tales como la superficie endotelial de los pulmones, membranas en forma de cepillo de los riñones, intestino, placenta y plexo coroide, no obstante, también se puede encontrar en forma soluble, en algunos fluidos corporales (Moreau *et al.*, 2005). Generalmente, esta enzima se origina en las células endoteliales, aunque también se puede originar en células epiteliales y germinales (testículos) (Kohlstedt *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2005). Esta enzima tiene dos dominios de metaloproteinasas (dominios N- y C-terminales). Ambos dominios tienen una homología, tanto en sus secuencias de nucleótidos como de aminoácidos, de aproximadamente 60%, y contienen un motivo de unión a zinc y un sitio activo; además trabajan de manera cooperativa en la actividad de la enzima (Moreau *et al.*, 2005).

La ECA tiene una participación muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema cardiovascular pues regula la actividad de los péptidos vasoactivos angiotensina I y bradicidina (Ignjatovic *et al.*, 2002; Saiga *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2008), contribuyendo de este modo en la regulación de la presión sanguínea, así como en procesos involucrados

en el remodelamiento vascular, fertilización, aterosclerosis, entre otros (Moreau *et al.*, 2005; Kohlstedt *et al.*, 2004). La enzima convertidora de angiotensina cataliza la conversión del decapeptido inactivo angiotensina I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) al octapéptido angiotensina II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe), removiendo el dipéptido C-terminal His⁹-Leu¹⁰, e inactiva el nonapéptido bradicidina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) removiendo secuencialmente los dipéptidos Phe⁸-Arg⁹ y Ser⁶-Pro⁷ (Ignjatovic *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005; Moreau *et al.*, 2005).

1.9 Angiotensina II

La angiotensina II es una hormona con propiedades vasoconstrictoras potentes (Stoll *et al.*, 1995; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2005), que controla la presión arterial, por medio de la regulación de los niveles de sal en los riñones y el metabolismo de agua, así como el tono de las células del músculo liso vascular y mecanismos del sistema nervioso central, como la sed (Watanabe *et al.*, 2005). Igualmente, ejerce efectos a largo plazo en la estructura tisular, incluyendo hipertrofia cardíaca, remodelamiento vascular y fibrosis renal (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2005). Esta hormona también está involucrada en la liberación de aldosterona, reabsorción de sodio, y en la regulación de la expresión de muchas sustancias, tales como factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, y moléculas de adhesión, las cuales están involucradas en el crecimiento celular, apoptosis, fibrosis e inflamación (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001).

Siendo el péptido activo del sistema renina-angiotensina, la angiotensina II desencadena diferentes vías de señalización que desembocan en una respuesta funcional inmediata (hipertensión arterial) y después a una respuesta estructural hipertrofiante y, finalmente, a respuestas pro-inflamatorias y pro-coagulantes (Michel, 2004). En células vasculares e inflamatorias provoca la secreción de mediadores pro-inflamatorios que ayudan al reclutamiento de células mononucleares nuevas lo que resulta en una respuesta adicional inflamatoria que contribuye al daño vascular (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). La producción de esta hormona puede ser a nivel sistémico vía el sistema renina-angiotensina sistémico, o a nivel tisular, por medio del sistema renina-angiotensina tisular. Las células localizadas en la pared vascular, es decir, las células endoteliales y del músculo liso vascular, tienen la capacidad de sintetizar sus propios componentes tisulares del sistema renina-angiotensina (Itoh *et al.*, 2003).

1.10 Bradicidina

La bradicidina es la cinina principal del sistema calicreína-cinina, cuya cascada metabólica que al ser activada resulta en la liberación de cininas vasoactivas (Ueno y Oh-ishi, 2003; Moreau *et al.*, 2005). La bradicidina tiene la capacidad de estimular a las células endoteliales, lo que conlleva a vasodilatación, incremento en la permeabilidad vascular, producción de óxido nítrico (Gainer *et al.*, 1998; Weston *et al.*, 2005) y movilización del ácido

araquidónico (Moreau *et al.*, 2005). Las cininas participan en procesos fisiológicos tales como la regulación de la presión arterial y funciones renales y cardiacas, y en procesos patológicos tales como la inflamación (Moreau *et al.*, 2005).

Como otros autacoides, la bradicidina actúa en las células endoteliales provocando una disminución de la presión arterial por medio de la activación de diversas vías que involucran la liberación de las sustancias vasorelajantes óxido nítrico y prostaciclina (Weston *et al.*, 2005). Al ser activado por la bradicidina, su receptor de tipo 2 (BR2) promueve transitoriamente la fosforilación de MAP-quinasa, fosfolipasa C (PLC) y Hsp90, además de tener una interacción directa con eNOS, todo esto permite el control de la fosforilación de NOS y, por lo tanto, la producción de NO. Por otro lado, los productos de PLC, es decir, inositol (IP3), 1-4-5-trifosfato y diacilglicerol, son responsables del transporte de calcio desde almacenes intracelulares al citosol. Por su parte, el calcio media la activación de eNOS y finalmente la producción de NO en células endoteliales (Moreau *et al.*, 2005) (figura 7).

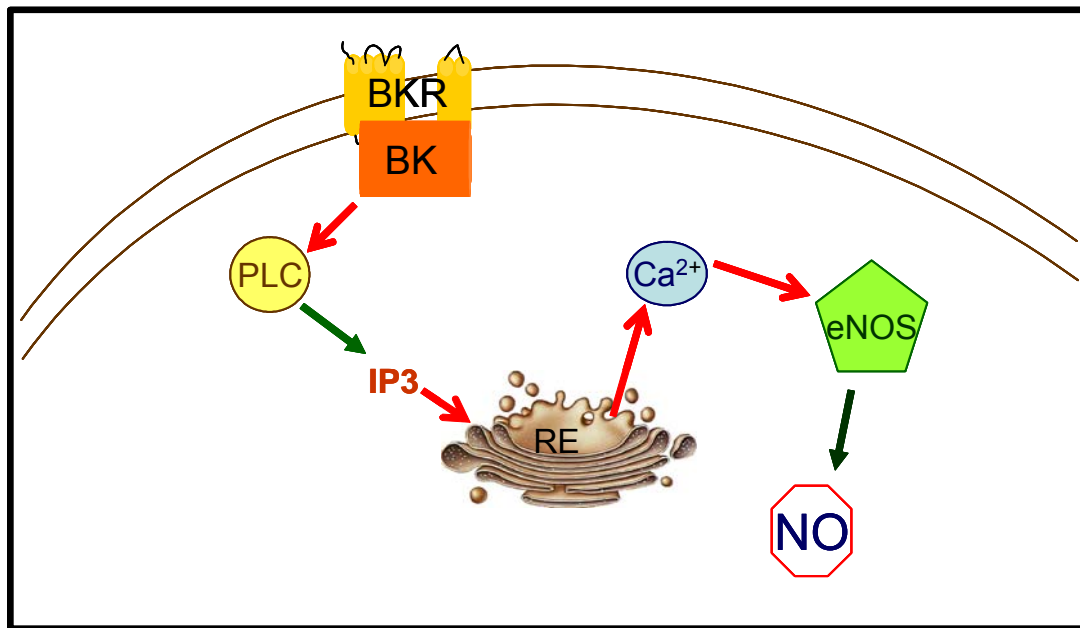


Figura 7. Producción de óxido nítrico por activación del receptor de bradicidina. Al unirse a su receptor, la bradicidina activa a la fosfolipasa C cuyo producto, el fosfatidil inositol (IP3), estimula la liberación de calcio en el retículo endoplásmico, promoviendo la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Moreau *et al.*, 2005)

1.11 Óxido Nítrico

Otra molécula que tiene importancia relevante en el mantenimiento del tono vascular es el óxido nítrico (NO), mediador biológico cuyas características pleiotrópicas regulan diversas actividades (Beever *et al.*, 2001), como la angiogénesis, la regulación del tono vascular, así como la inhibición de la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio, la agregación plaquetaria y la migración y proliferación de las células de músculo liso vasculares (Kawashima, 2004). Es un radical libre gaseoso, hiporeactivo como tal, que

tiene la capacidad de difundirse fácilmente, gracias a sus propiedades lipofílicas que le permiten permear las membranas biológicas (Beevers *et al.*, 2001). En el endotelio, el óxido nítrico es sintetizado por la acción de la enzima, óxido nítrico sintasa endotelial dependiente de NADPH (eNOS) sobre L-arginina, la cual estimula la formación de óxido nítrico a partir del átomo de nitrógeno del guanidino terminal de la L-arginina, convirtiendo la L-arginina en L-citrulina, en presencia de Ca^{2+} /calmodulina, FAD, FMN y tetrahidrobioproteína (BH₄), que actúan como cofactores (Palmer *et al.*, 1988; Kawashima, 2004) (Figura 8).

Las propiedades químicas del NO son altamente propicias para la difusión rápida, inactivación rápida y acción local en el músculo liso vascular y las plaquetas adyacentes al endotelio vascular (Ignarro, 1989). Es producido por el endotelio de arterias y venas y al difundir a través de la pared de los vasos hacia el músculo liso provoca vasodilatación (Beevers *et al.*, 2001), pues actúa como segundo mensajero convirtiendo GTP en GMPc, el cual disminuye la concentración de calcio intracelular en las células del músculo liso a través de una cascada de eventos que estimulan la relajación del músculo liso y la vasodilatación (Simko, 2007). Dentro de las propiedades farmacológicas del NO se encuentran la activación de la guanilato cíclica soluble y un subsiguiente incremento en los niveles de GMPc; inducción de respuestas relajantes marcadas pero transitorias; inhibición y reversión de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión plaquetaria a la superficie endotelial (Ignarro, 1989).

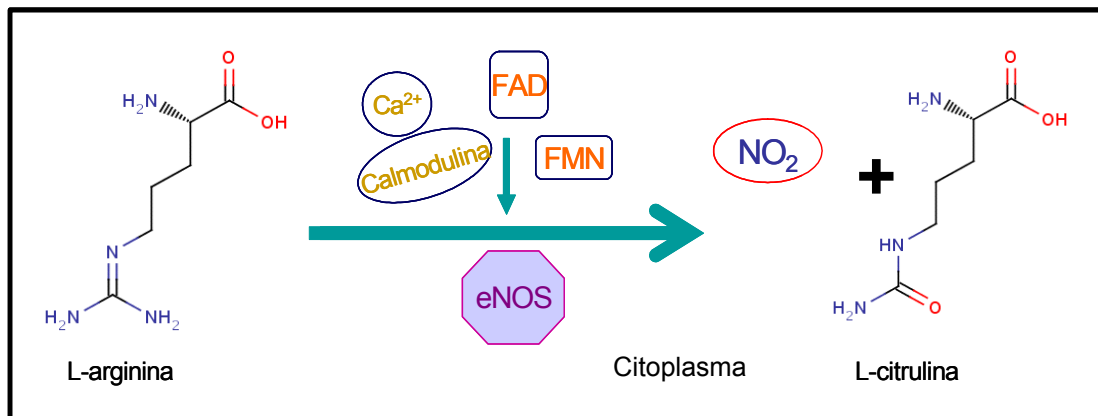


Figura 8. Síntesis de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. El NO, junto con la L-citrulina, son sintetizados por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) sobre L-arginina. La NOS utiliza FAD, FMN y tetrahidrobioproteína (BH₄) como cofactores

El óxido nítrico derivado de endotelio, antes conocido como factor relajante derivado de endotelio (Ignarro, 1989), participa activamente en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Kawashima y Yokoyama, 2004), ejerce funciones cruciales en el sistema cardiovascular, por lo que alteraciones en la producción de dicha molécula conllevan al desarrollo y progresión de diversas enfermedades cardiovasculares tales como la aterosclerosis, trombosis e hipertensión (Chen *et al.*, 2002).

1.12 Hipertensión

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica de etiología multifactorial y poligenética (Chen *et al.*, 2002), que se caracteriza por la elevación persistente de la tensión arterial. Se estima que existen en el mundo 600 millones de personas que la padecen, de los cuales más de 16 millones son mexicanos en edades entre 20 y 69 años (Rosas Peralta *et al.*, 2005).

La principal causa de la hipertensión es un incremento en la resistencia vascular periférica, debida a una contracción mediada por calcio, de las células musculares lisas de las pequeñas arteriolas, lo cual, junto con el incremento en los niveles de angiotensina II y la disminución en la producción de óxido nítrico, lleva a una contracción prolongada así como al engrosamiento de la pared vascular, como resultado de un incremento en la resistencia vascular periférica (Velásquez-Monroy *et al.*, 2003). En pacientes hipertensos, se sabe que la interrupción del sistema renina-angiotensina con inhibidores de la ECA restaura la función endotelial (Endemann y Schiffrin, 2004). Los factores que más se han relacionado con la hipertensión arterial son, ingesta de sal, obesidad y resistencia a insulina, así como los sistemas renina-angiotensina y nervioso simpático, factores genéticos, y disfunción endotelial (Beevers *et al.*, 2001). Se ha confirmado que en el proceso hipertensivo existe una vasodilatación alterada en diferentes lechos vasculares (Endemann y Schiffrin, 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la población humana vive más tiempo y más estresada, las enfermedades crónicas asociadas a la edad, tales como las enfermedades cardiovasculares e hipertensión, son cada vez más frecuentes en la población mundial (Hermansen, 2000; Espin *et al.*, 2007). También se sabe que dichas enfermedades están fuertemente relacionadas con los hábitos alimenticios (Espin *et al.*, 2007; Radica *et al.*, 2008). Por tal motivo, las ciencias de la nutrición han evolucionado hacia “la nutrición para una buena salud” (Vermeirssen *et al.*, 2004), y con el fin de brindar una contribución adicional a la prevención de enfermedades se han identificado diversos compuestos presentes en plantas alimenticias que proveen de beneficios a la salud humana.

Para prevenir y ayudar a controlar la hipertensión, se ha sugerido incluir en la dieta amaranto (Czerwinski *et al.* 2004; Paredes-López y Valverde 2006; Martirosyan *et al.* 2007) pues se sabe que además de sus componentes nutritivos también contiene otras sustancias que podrían participar en el mantenimiento de la homeostasis del sistema cardiovascular. Se ha propuesto que el amaranto puede ser considerado como una fuente natural potencial de péptidos antihipertensivos, ya que análisis *in silico* de digeridos tripticos de glutelinas de amaranto revelaron que dichos péptidos son los más frecuentes (Silva-Sánchez *et al.*, 2008). Por estas razones, la finalidad de este trabajo es caracterizar los efectos vasculares de los péptidos inhibidores de la ECA resultantes de la digestión triptica de glutelinas de Amaranto.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterización de los efectos vasculares dependientes de NO de los digeridos trópticos de glutelinas de amaranto en células endoteliales y segmentos de aorta de rata.

3.2 Objetivos Específicos

- 1) Establecer las condiciones para la extracción de glutelinas de harina desengrasada de amaranto.
- 2) Determinar las condiciones de hidrólisis de las glutelinas.
- 3) Caracterizar la actividad de inhibición de ECA de los digeridos trópticos de glutelinas
- 4) Identificar los efectos de los digeridos trópticos de glutelinas sobre la producción de óxido nítrico en células endoteliales de coronarias de rata.
- 5) Caracterizar los efectos de los digeridos trópticos de glutelinas de amaranto en segmentos de aorta de rata.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Extracción de proteínas de amaranto

La extracción de glutelinas de amaranto se realizó a partir de harina desengrasada de amaranto (*Amarantus hypochondriacus*) de las variedades Gabriela y Criolla. Las harinas se desengrasaron mezclándolas con hexanos y manteniendo en agitación magnética constante durante toda la noche. Los hexanos fueron eliminados por decantación y la harina se dejó secar a temperatura ambiente, hasta quedar totalmente seca.

Para la extracción de glutelinas, primero se extrajeron las diferentes fracciones proteínicas (albúminas, globulinas 7S, globulinas 11S y prolaminas), de acuerdo con lo reportado previamente por Barba de la Rosa y colaboradores (1992). Brevemente, la fracción de albúminas se extrajo mezclando harina desengrasada de amaranto con agua destilada y se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos. A continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Se recolectó el sobrenadante y se guardó a -20°C hasta su uso. La pastilla resultante se resuspendió en buffer (0.1 M NaCl, 0.01 M K₂HPO₄, 0.001 M EDTA; pH 7.5), para la extracción de globulinas 7S, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente mencionado. Para la extracción de globulinas 11S, la pastilla resultante de la extracción anterior se resuspendió en un segundo buffer (0.8 M NaCl, 0.01 M K₂HPO₄, 0.001 M EDTA; pH 7.5) utilizando el mismo procedimiento. Las prolaminas se

obtuvieron de la misma manera, resuspendiendo la pastilla en etanol 70%. Para la extracción de glutelinas se probaron dos soluciones de extracción diferentes: NaOH 0.1 M y tris 0.1 M, pH 8.

Las fracciones proteínicas se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando el kit *Protein Assay* (Biorad), siguiendo las especificaciones del fabricante.

La ratificación de las fracciones proteínicas se llevó a cabo por análisis electroforético, con el método SDS-PAGE, en condiciones desnaturizantes utilizando geles al 15%. Para reducir los puentes disulfuro se mezclaron las proteínas con β -mercaptoetanol (5%) y se calentaron a 100°C en baño María por 5 minutos. La electroforesis se realizó con una corrida constante a 20 mA por gel durante 1-2 hrs. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie Brillante con una concentración de 0.25%, durante 3-5 hrs. Para desteñir los geles se utilizó una solución con 50% metanol y 5% ácido acético glacial durante 3-5 hrs. Las fotografías de los geles se tomaron con un equipo Kodak.

4.2 Digestión de proteínas de amaranto

Las glutelinas extraídas de harina desengrasada de amaranto se digirieron con tripsina, agregando 1 μ g de tripsina por cada 10 μ g de proteína. Se incubaron a 37°C durante 10 hrs. La digestión se ratificó con SDS-PAGE, tal como se describió anteriormente (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

4.3 Actividad inhibitoria de ACE

Para medir la actividad inhibitoria de ECA de los digeridos tripticos de glutelinas de amaranto se utilizó el método reportado por Cushman y Cheung (1971). Se agregaron 15 μ L de digeridos tripticos de glutelinas de amaranto a un buffer de fosfatos que contenía 0.3 M NaCl, 0.2 M KH_2PO_4 y 10 mM de Hip-His-Leu (SIGMA), pH 8.3. A esta mezcla se le agregaron 25 μ L de ACE (5 mU) (SIGMA) y se dejó incubar a 37°C en baño María por 80 minutos. La reacción se detuvo con HCl 1N. El ácido hipúrico producido en la reacción se extrajo con acetato de etilo el cual se evaporó a 98°C; finalmente el ácido hipúrico se disolvió en agua para la lectura espectrofotométrica, que se llevó a cabo a una longitud de onda de 228 nm. La actividad de estas muestras se midió por triplicado. Como control de inhibición de ECA, se midió la actividad inhibitoria de captopril.

4.4 Cultivos celulares

Cultivos primarios de células endoteliales de coronarias de rata (CEC) fueron cultivadas en placas de 12 pozos, a una densidad de 8×10^4 células/cm² en medio Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO), adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO) y 1% de antibiótico. Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y luego de 24 horas se trataron con diferentes concentraciones de digeridos tripticos de glutelinas y glutelinas de

amaranto, así como con dos concentraciones diferentes (10 y 200 µg/mL) de digeridos tripticos y glutelinas de amaranto desnaturalizados. Para desnaturalizar los digeridos y las proteínas se sometieron a calentamiento en baño de agua a 100°C durante 5 min. El medio fue recolectado a las 24 horas y guardado a -20°C para la cuantificación de nitritos por el método de Griess.

4.5 Cuantificación de nitritos

La determinación de la producción de óxido nítrico por las células CEC tratadas con digeridos tripticos de glutelinas y glutelinas de amaranto, se llevó a cabo cuantificando su producto final estable, NO_2^- , presente en el medio de cultivo, por la reacción de Griess, utilizando el método previamente reportado (Miranda *et al.*, 2001). Se adicionaron alícuotas de 50 µL de las muestras por duplicado en placas de ELISA de 96 pozos. A continuación se adicionó el reactivo de Griess (1% Sulfanilamida y 0.02% NEDA) y se dejó incubar 15-20 minutos protegido de la luz, a temperatura ambiente. La absorbancia se leyó en un lector de ELISA (Biorad) a una longitud de onda de 570 nm. Para calcular la concentración de NO_2^- se realizó una curva estándar de NO_2^- en cada experimento.

4.6 Bioensayo de Vasorelajación en Segmentos de Aorta de Rata

Los experimentos se llevaron a cabo con segmentos de aorta de rata macho, de la cepa Sprague Dawley con un peso aproximado de 350-400 g. Los animales se sacrificaron con una inyección de pentobarbital y se extirpó la aorta, se limpió de tejido conectivo y se seccionó transversalmente en segmentos de 3-4 mm de longitud, evitando dañar el endotelio.

Segmentos individuales de aorta, se suspendieron en un transductor isométrico Radnoti en baños que contenían 10 mL de solución fisiológica (NaCl 135 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.17mM, KH₂PO₄ 1.15 mM, CaCl₂ 1.1 mM, indometacina 3 µM, dextrosa 1.8 g/L y HEPES 4.766 g/L). A los segmentos se les aplicó una tensión pasiva de 2 g, y se equilibraron durante 1 hr. A continuación los segmentos se contrajeron con fenilefrina 50 mM y nuevamente se equilibraron durante 40 min. Posteriormente, los segmentos de aorta se trataron con concentraciones crecientes de los digeridos trópticos de glutelinas de amaranto. Los registros se obtuvieron en tiempo real, y fueron colectados y analizados utilizando el software Poliview versión 3.0.

La determinación de la producción de NO por la aorta de rata se llevó a cabo por el método de Griess descrito anteriormente.

V. RESULTADOS

5.1 Extracción y digestión de glutelinas de Amaranto

El patrón electroforético de las dos extracciones de glutelinas (NaOH y tris), muestra las bandas características reportadas por Silva-Sánchez (2007). En el gel se observaron 3 bandas principales en 50, 35 kDa y 22 kDa, y una adicional de 65 kDa, característica de la variedad Gabriela (Figura 9). Los carriles 3 y 5, correspondientes a los segundos lavados muestran que la mayor parte de la proteína se extrae en el primer lavado.

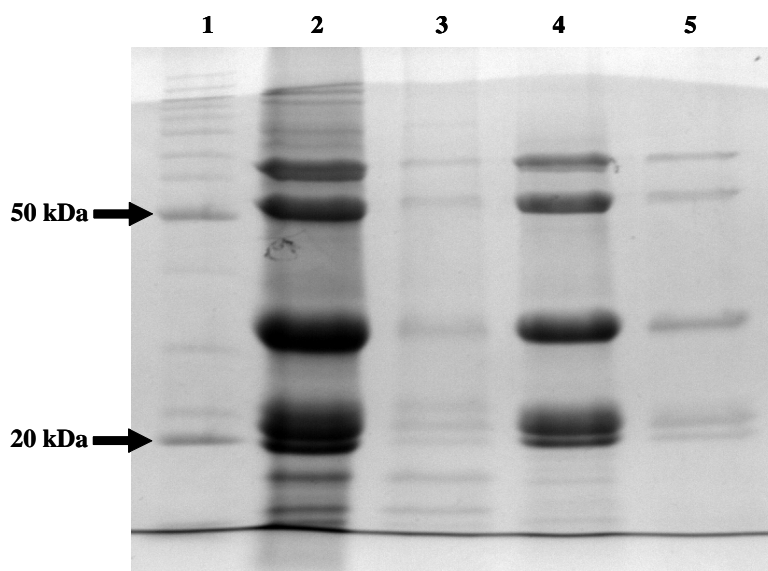


Figura 9. Extracción de glutelinas de Amaranto. **Carril 1**, Marcador de peso molecular. **Carril 2**, glutelinas extraídas en NaOH 0.1 M, primer lavado; **Carril 3**, glutelinas extraídas con NaOH 0.1 M, segundo lavado; **Carril 4**, glutelinas extraídas en tris 0.1 M, pH 8, primer lavado; **Carril 5**, glutelinas extraídas en tris 0.1 M, pH 8, segundo lavado

La Figura 10 muestra el patrón electroforético de la digestión de glutelinas en diferentes tiempos. En el último carril (carril 9), después de 10 horas de digestión, se observa que las bandas más grandes (35-65 kDa), desaparecieron por completo, y aparecen bandas más pequeñas, por debajo de los 20 kDa.

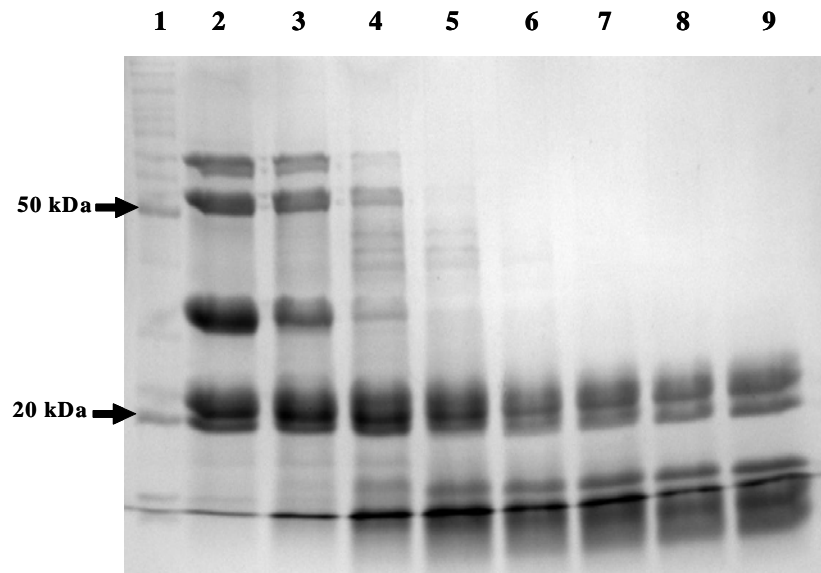


Figura 10. Digestión de glutelinas de Amaranto. La digestión se llevó a cabo agregando 1 μg de tripsina por cada 10 μg de proteína y se incubó durante 10 horas a 37°C. **Carril 1**, Marcador de peso molecular. **Carril 2**, glutelinas sin digerir; **Carril 3**, Tiempo 0 de la digestión; **Carril 4**, 30 minutos de digestión; **Carril 5**, 2 horas de digestión; **Carril 6**, 4 horas; **Carril 7**, 6 horas; **Carril 8**, 8 horas; **Carril 9**, 10 horas

5.2 Actividad de ECA

Se analizó y cuantificó el porcentaje de inhibición de los digeridos tripticos de glutelinas de amaranto sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina, utilizando el mismo rango de concentraciones (0-200 µg/mL) que se emplearon en la determinación de la producción de NO en CEC. Se obtuvo un IC₅₀ de 200 µg/mL, lo que se asocia a la estimulación de la producción de NO detectado en células tratadas con esa concentración. La máxima inhibición alcanzada fue del 80% con 1000 µg/mL de DTGs (Figura 11)

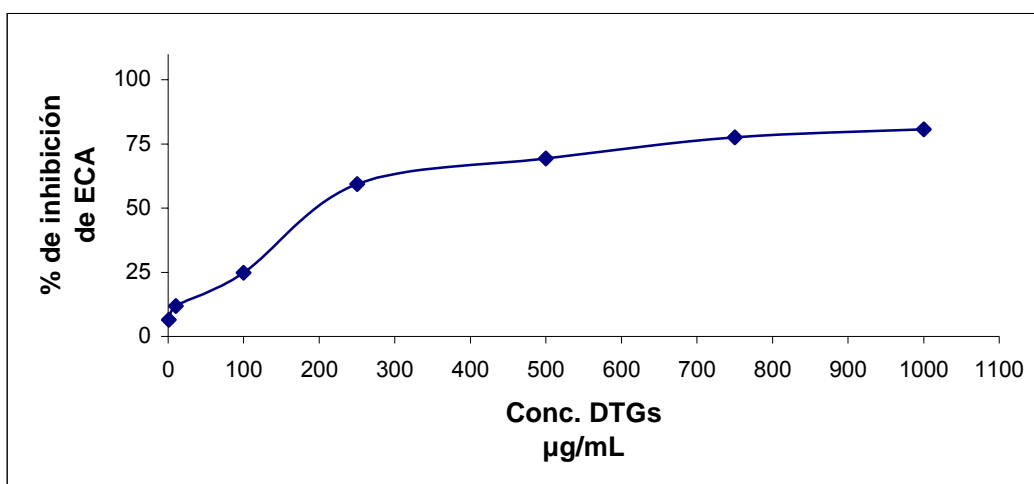


Figura 11. Porcentaje de inhibición de ECA. Las concentraciones de digeridos tripticos de glutelinas de amaranto que se utilizaron fueron: 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula: $(Abs_{control} - Abs_{muestra})/Abs_{control}$

Como control, se analizó y cuantificó la actividad inhibitoria del captopril, utilizando concentraciones crecientes y se obtuvo una IC_{50} de 25 μM (Figura 12).

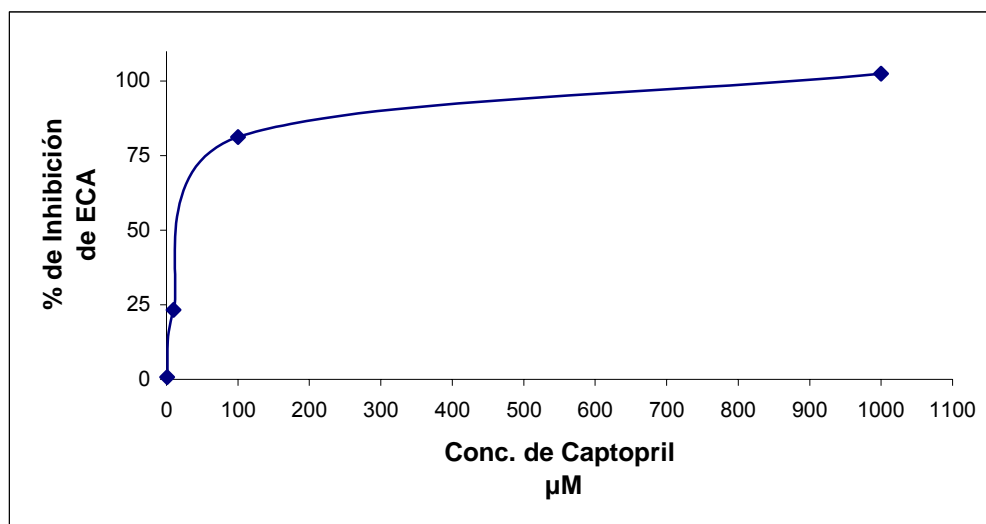


Figura 12. Porcentaje de inhibición de ECA. Las concentraciones de captopril que se utilizaron fueron: de 1 μM , 10 μM , 100 μM y 1000 μM . El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula: $(Abs_{control} - Abs_{muestra})/Abs_{control}$

5.3 Cuantificación de Nitritos

Las células CEC fueron tratadas con diferentes concentraciones de DTGs, glutelinas nativas de amaranto y desnaturalizados (Figuras 13 y 14); como control negativo se utilizó el medio suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico. En el caso de los tratamientos con DTGs la producción de óxido nítrico fue dosis-dependiente, es decir, la concentración de nitritos en el medio incrementó conforme aumentaron las concentraciones de

los DTGs (Figura 13), alcanzando la máxima producción de NO (102.6 μM) con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

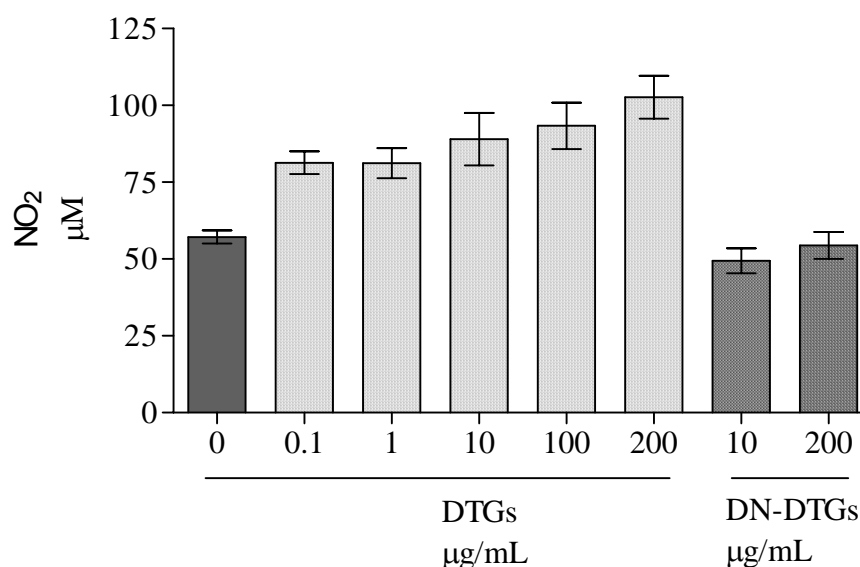


Figura 13. Producción de NO en células CEC tratadas con diferentes concentraciones de digeridos tripticos de glutelinas de amaranto (DTGs) y DTGs desnaturalizados (DN-DTGs). La producción de NO fue dosis-dependiente alcanzando la máxima producción con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al desnaturalizar los péptidos, éstos pierden su actividad.

n = 16; P \leq 0.05

Tabla 1. Producción de óxido nítrico en células CEC tratadas con diferentes concentraciones de digeridos tripticos de glutelinas de amarantos y DTGs desnaturalizados

Muestra	[Muestra] ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	[NO] μM (promedio)	Error estándar
Control	0	57.15 ^a	2.1
DTGs	0.1	81.33 ^b	3.7
DTGs	1	81.19 ^b	4.9
DTGs	10	88.98 ^c	8.5
DTGs	100	93.38 ^c	7.5
DTGs	200	102.6 ^d	6.9
DN-DTGs	10	49.41 ^a	4.1
DN-DTGs	200	54.39 ^a	4.3

Promedio de 3 experimentos diferentes. Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas a P \leq 0.05

Los tratamientos con glutelinas sólo estimularon la producción de NO con las concentraciones más altas correspondientes a 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y los desnaturalizados a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ parecen haber inhibido la producción de NO, mientras que a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ perdieron su efecto estimulador. No hubo diferencia significativa entre las concentraciones más pequeñas, las DN-Glut a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el control negativo (Tabla 2).

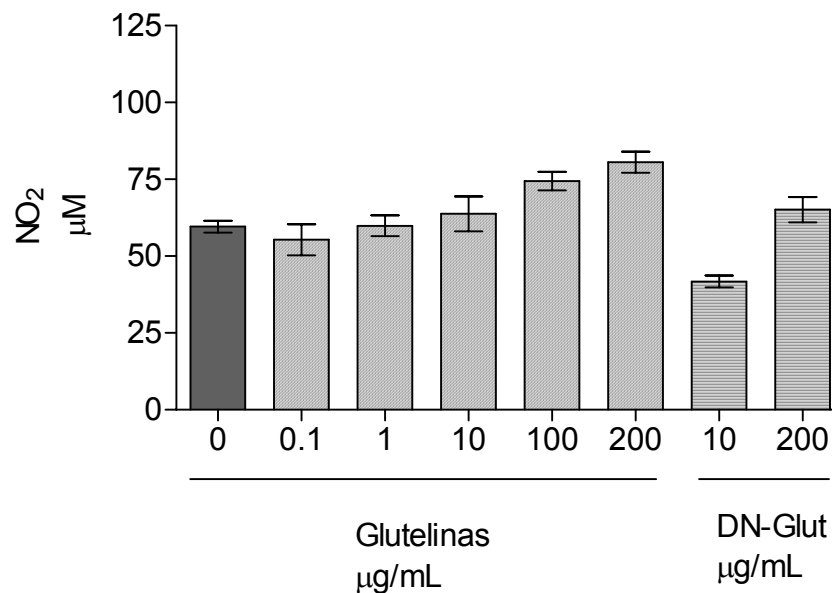


Figura 14. Producción de NO en células CEC tratadas con diferentes concentraciones de glutelinas de amaranto y glutelinas desnaturalizadas (DN-Glut). Las glutelinas estimularon la producción de NO en las concentraciones más altas, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. $n = 16$; $P \leq 0.05$

Tabla 2. Producción de óxido nítrico en células CEC tratadas con diferentes concentraciones de glutelinas de amarantos y glutelinas desnaturalizadas

Muestra	[Muestra] ($\mu\text{g/mL}$)	[NO] μM (promedio)	Error estándar
Control	0	59.61 ^a	1.9
Glutelinas	0.1	55.32 ^a	5.0
Glutelinas	1	59.89 ^a	3.3
Glutelinas	10	63.76 ^a	5.6
Glutelinas	100	74.40 ^b	3.0
Glutelinas	200	80.60 ^c	3.4
DN-Glut	10	41.75 ^d	1.9
DN-Glut	200	65.14 ^a	4.1

Promedio de 3 experimentos diferentes. Las letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas a $P \leq 0.05$

Como controles positivos se utilizaron bradicidina y captopril 50 μM . La bradicidina estimula la producción de NO a través de la activación de la óxido nítrico sintasa (Figura 7). Por otro lado, el captopril es un inhibidor farmacológico de la ECA que también tiene la capacidad de estimular la producción de NO (Figura 6). Ambos tratamientos estimularon la producción de NO en las células CEC (Figura 15), aunque el captopril produjo mayor concentración de nitritos, 94.32 μM , que la bradicidina, 67.16 μM , con respecto al control (59.61 μM)

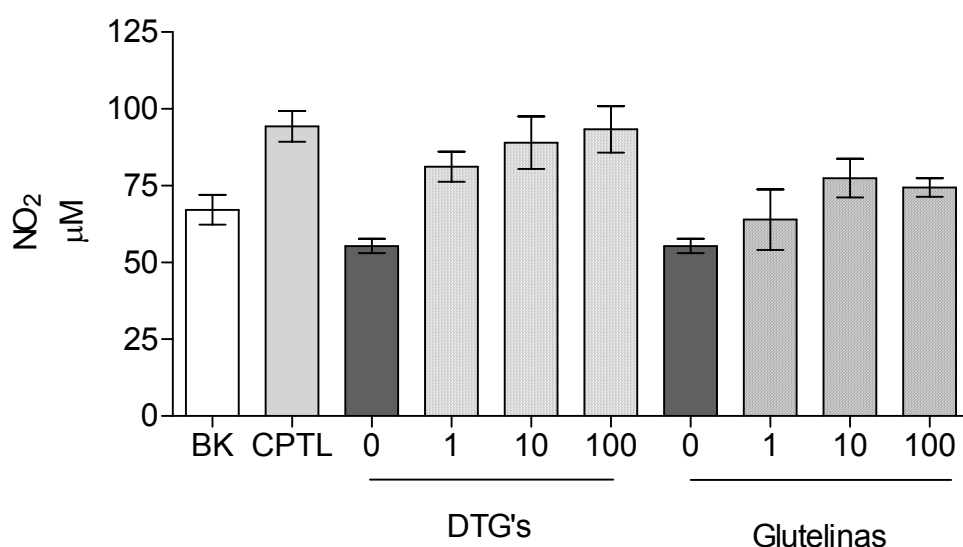


Figura 15. Producción de NO en células CEC tratadas con diferentes concentraciones de glutelinas de amaranto, digeridos trópticos de glutelinas (DTGs), Bradicidina (BK) y Captopril (CPTL). El Captopril estimuló más la producción de NO con respecto a la bradicidina. Los DTGs también estimularon la producción de NO en todas las concentraciones utilizadas y las glutelinas sólo en las concentraciones más altas, 10 y 100 µg/mL

5.4 Bioensayo de Biorelajación en Segmentos de Aorta de

Rata

Se analizaron y evaluaron 3 concentraciones diferentes de DTGs en segmentos de aorta de rata: 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL. El tratamiento con la concentración más pequeña, 1 µg/mL, indujo una vasorelajación de aproximadamente 30% en los segmentos y con la máxima concentración (100 µg/mL) se alcanzó una relajación de aproximadamente un 90% (Figura 16). Se

cuantificó la producción de NO por el método de Griess en la solución fisiológica (Figura 17).

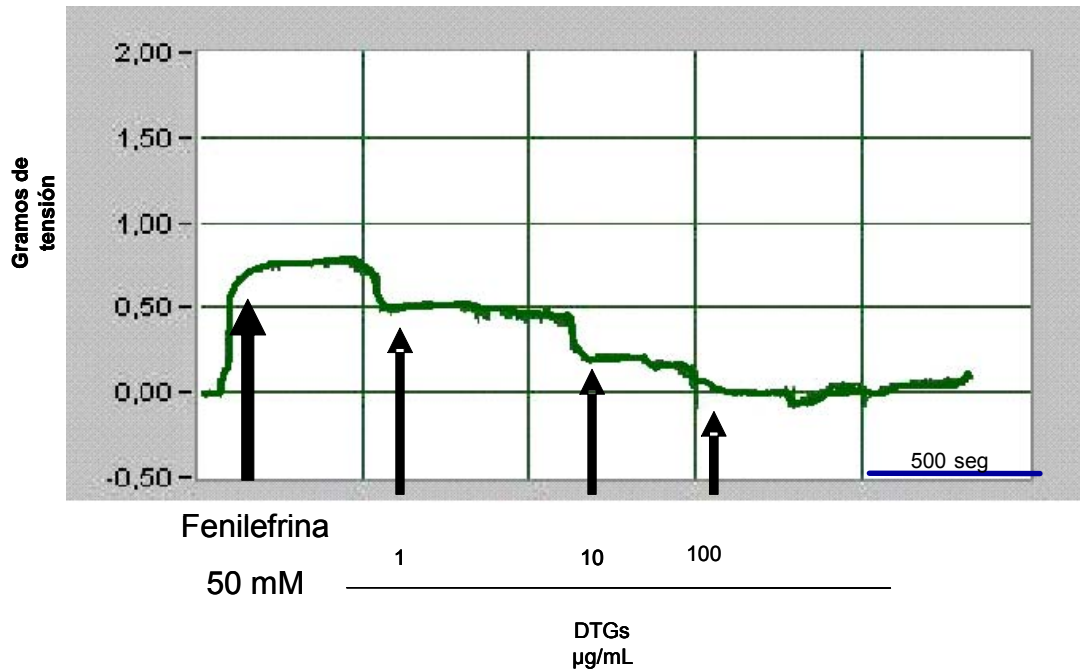


Figura 16. Efecto de los digeridos trópicos de glutelinas de amaranto en segmentos de aorta de rata. Se probaron 4 diferentes concentraciones: 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL. Todas las concentraciones tuvieron un efecto vasorelajante.

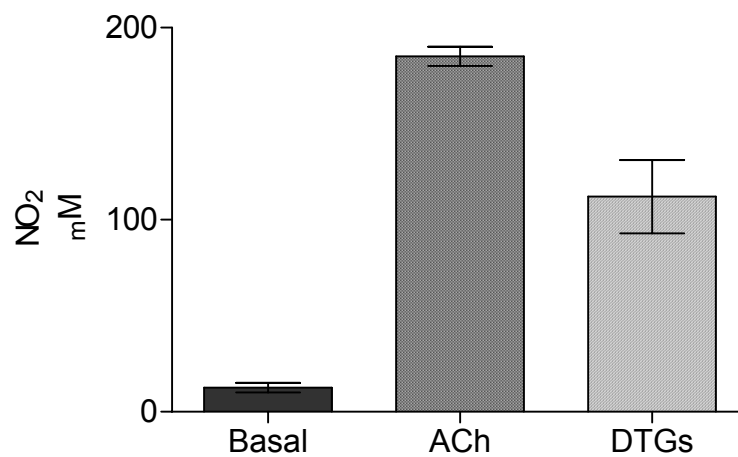


Figura 17. Efecto de los DTGs sobre la producción de NO. Segmentos de aorta de rata se trataron con concentraciones crecientes de DTGs. Los DTGs estimularon la producción de NO en las aortas. Como control se utilizó acetilcolina.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dado que la tripsina no actúa en NaOH, se probaron dos soluciones de extracción de glutelinas: NaOH 0.1 M y tris 0.1 M, pH 8. Con las 2 soluciones de extracción fue posible obtener las glutelinas, así que se eligió tris 0.1 M como solución de extracción de glutelinas. Así mismo, se determinó que el tiempo óptimo para la digestión fuera de 10 horas.

Los datos obtenidos en estos experimentos muestran que los digeridos trépticos de amaranto (DTGs) tienen la capacidad de inhibir a la enzima convertidora de angiotensina con un IC_{50} de 200 $\mu\text{g/mL}$, así como incrementar la producción de NO en CEC, de 57.15 μM , producción basal, a 102.6 μM , lo que representa un incremento de aproximadamente 40% con respecto al control (tabla 1). Se cree que la acumulación de bradicidina contribuye con los efectos benéficos de los inhibidores de la ECA ya que estudios recientes en células aisladas proponen que los inhibidores de la ECA potencian los efectos inducidos por la BK inhibiendo la des-sensibilización de su receptor, más que bloqueando la hidrólisis de la misma BK por la ECA (Tom *et al.*, 2002). Como ya se mencionó anteriormente, la bradicidina estimula la producción de óxido nítrico a través de la fosforilación de la fosfolipasa C, la cual se encuentra involucrada en la activación de eNOS (Moreau *et al.*, 2005). Así, el incremento en la concentración de NO en células tratadas con DTGs, puede deberse a este mecanismo, ya que los digeridos trépticos presentaron actividad inhibitoria de ECA (Figura 11).

Los digeridos trípticos de glutelinas de amaranto también mostraron un efecto dilatador en segmentos de aorta de rata. La vasorelajación en este bioensayo se asocia a la producción de NO en CEC.

Debido a los efectos vasodilatadores ejercidos por los digeridos trípticos de glutelinas de amaranto a través de la inhibición de ECA (Figura 11), asociados a la producción de NO (Figuras 13-15, Tablas 1 y 2) y sus efectos sobre el tono vascular (Figura 16) y tisular (Figura 15), los DTGs podrían ser considerados nutraceuticos antihipertensivos, es decir, sustancias provenientes de un alimento que proveen algún beneficio a la salud que pudiera ayudar en el tratamiento o prevención de enfermedades (Espin *et al.*, 2007). Los compuestos que funcionan como nutraceuticos tienen potencia baja como compuestos bioactivos si son comparados con fármacos, pero, dado que son ingeridos regularmente en cantidades significativas como parte de la dieta, pueden presentar un efecto fisiológico a largo plazo perceptible (Espin *et al.*, 2007). Comparados con los fármacos inhibidores de la ECA, los péptidos derivados de alimentos tienen ciertas ventajas, ya que, aunque tienen una actividad inhibitoria menor *in vitro* que los fármacos (FitzGerald y Meisel, 2000), no tienen los efectos secundarios dañinos, tales como tos seca, vértigo, dolor de cabeza, sabor anormal (metálico o salado), problemas de riñones e hígado y angioedema (Yang *et al.*, 2007), además de que representan un costo más bajo de la salud (FitzGerald y Meisel, 2000).

Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una estrecha relación entre los riesgos de la salud y los hábitos alimenticios, ya que los

alimentos tienen un impacto directo en la salud (Espin *et al.*, 2007). Así, las modificaciones en el estilo de vida, así como en la dieta son dos de las herramientas más importantes para disminuir la presión arterial (Hermansen, 2000); por tal motivo, los péptidos inhibidores de la ECA como parte de un producto alimenticio o como nutracéuticos, pueden ser de interés funcional tanto en el tratamiento como en la prevención de la hipertensión (Vermeirssen *et al.*, 2004). Se ha reportado que la inhibición de la actividad de la ECA mejora la función endotelial y estimula el remodelamiento vascular, además de que atenúa la progresión de la arterioesclerosis así como el acontecimiento de eventos cardiovasculares en humanos (Kohlstedt *et al.*, 2004; Stanisavljevic *et al.*, 2006). Por otro lado, el Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) demostró que la inhibición crónica de ECA puede reducir eventos cardiovasculares en pacientes con riesgo de desarrollar aterosclerosis (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001). De esta manera, el amaranto es un alimento que puede ser incluido en la dieta de pacientes con enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la aterosclerosis, como coadyuvante de los tratamientos farmacológicos de dichas patologías.

VII. REFERENCIAS

- Abalone, R., Cassinera, A., Gastón, A., y Lara, M.A. 2004. Some Physical Properties of Amaranth Seeds. *Biosystems Engineering* **89**: 109-117.
- Aoi, W., Naito, Y., y Yoshikawa, T. 2006. Exercise y functional foods. *Nutr J* **5**: 15.
- Barba de la Rosa AP, Gueguen J., Paredes-López O, Viroben G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization y amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural y Food Chemistry* **40**: 931-936.
- Beevers, G., Lip, G.Y., y O'Brien, E. 2001. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Bmj* **322**: 912-916.
- Benowitz, N. 2001. Antihipertensores. In *Farmacología básica y clínica*. (ed. B. Katzung), pp. 1346. Manual Moderno, México DF.
- Bressani, R. 1994. Composition y nutritional properties of Amaranth. In *Amaranth: Biology, Chemistry y Technology*. (ed. O. Paredes-López), pp. 185-207. CRC Press Inc.
- Cha, M., y Park, J.R. 2005. Production y characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate. *J Med Food* **8**: 305-310.
- Chen, A.F., Ren, J., y Miao, C.Y. 2002. Nitric oxide synthase gene therapy for cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol* **89**: 327-336.
- Chen, Q., Xuan, G., Fu, M., He, G., Wang, W., Zhang, H., y Ruan, H. 2007. Effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from rice

- dregs protein on antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac J Clin Nutr* **16 Suppl 1**: 281-285.
- Chen, Z., Tan, F., Erdos, E.G., y Deddish, P.A. 2005. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme y the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension* **46**: 1368-1373.
- Cinq-Mars, C.D., y Li-Chan, E.C. 2007. Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of Pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology y ultrafiltration. *J Agric Food Chem* **55**: 9380-9388.
- Cushman, D.W., y Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay y properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* **20**: 1637-1648.
- Czerwinski, J., Bartnikowska, E., Leontowicz, H., Lange, E., Leontowicz, M., Katrich, E., Trakhtenberg, S., y Gorinstein, S. 2004. Oat (*Avena sativa* L.) y amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J Nutr Biochem* **15**: 622-629.
- Endemann, D.H., y Schiffrin, E.L. 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* **15**: 1983-1992.
- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T., y Tomas-Barberan, F.A. 2007. Nutraceuticals: facts y fiction. *Phytochemistry* **68**: 2986-3008.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J.P., y Brusslan, J.A. 2008. Plant peptides y peptidomics. *Plant Biotechnol J* **6**: 105-134.
- FitzGerald, R.J., y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr* **84 Suppl 1**: S33-37.

- Gainer, J.V., Morrow, J.D., Lovely, A., King, D.J., y Brown, N.J. 1998. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive y hypertensive subjects. *N Engl J Med* **339**: 1285-1292.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Fliess, A., Shnitman, I., Paredes-Lopez, O., Yamamoto, K., Kobayashi, S., y Taniguchi, H. 1998. Computational analysis of the amino acid residue sequences of amaranth y some other proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 1845-1851.
- Guerra-Matías A, Arêas JAG. 2005. Glycemic y insulinemic responses in women consuming extruded amaranth (*Amaranthus cruentus* L). *Nutrition Research* **25**: 815-822.
- Hermansen, K. 2000. Diet, blood pressure y hypertension. *Br J Nutr* **83 Suppl 1**: S113-119.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., y Recio, I. 2004. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *International Dairy Journal* **14**: 889-898.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., y Recio, I. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk y infant formula with pepsin y pancreatin. *International Dairy Journal* **17**: 42-49.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., Ramos, M., y Amigo, L. 2002. Preparation of ovine y caprine b-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine [beta]-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *International Dairy Journal* **12**: 805-812.

- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., y Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* **52**: 1504-1510.
- Hibi M, Hachimura S., Hashizume S, Obata T, Kaminogawa S. 2003. Amaranth grain inhibits antigen-specific IgE production through augmentation of the IFN-g response *in vivo* y *in vitro*. *Cytotechnology* **43**: 33-40.
- Hilou, A., Nacoulma, O.G., y Guiguemde, T.R. 2006. In vivo antimalarial activities of extracts from *Amaranthus spinosus* L. y *Boerhaavia erecta* L. in mice. *J Ethnopharmacol* **103**: 236-240.
- Ignarro, L.J. 1989. Endothelium-derived nitric oxide: actions y properties. *Faseb J* **3**: 31-36.
- Ignjatovic, T., Tan, F., Brovkovich, V., Skidgel, R.A., y Erdos, E.G. 2002. Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. *J Biol Chem* **277**: 16847-16852.
- Kawashima, S., y Yokoyama, M. 2004. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase y atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 998-1005.
- Kohlstedt, K., Bryes, R.P., Muller-Esterl, W., Busse, R., y Fleming, I. 2004. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res* **94**: 60-67.
- Lin, B.F., Chiang, B.L., y Lin, J.Y. 2005. *Amaranthus spinosus* water extract directly stimulates proliferation of B lymphocytes *in vitro*. *Int Immunopharmacol* **5**: 711-722.
- Lipkin, A., Anisimova, V., Nikonorova, A., Babakov, A., Krause, E., Bienert, M., Grishin, E., y Egorov, T. 2005. An antimicrobial peptide Ar-AMP from

- amaranth (*Amaranthus retroflexus* L.) seeds. *Phytochemistry* **66**: 2426-2431.
- Myal S, M.R. 2000. Seed Storage Proteins y Approaches for Improvement of their Nutritional Quality by Genetic Engineering. *Current Science* **79**: 576-589.
- Martirosyan, D.M., Miroshnichenko, L.A., Kulakova, S.N., Pogojeva, A.V., y Zoloedov, V.I. 2007. Amaranth oil application for coronary heart disease y hypertension. *Lipids Health Dis* **6**: 1.
- Michel, J.B. 2004. [Renin-angiotensin system y vascular remodelling]. *Med Sci (Paris)* **20**: 409-413.
- Miguel, M., y Aleixyre, A. 2006. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J Nutr* **136**: 1457-1460.
- Mirya, K.M., Espey, M.G., y Wink, D.A. 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate y nitrite. *Nitric Oxide* **5**: 62-71.
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., y Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides y proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.*
- Moreau, M.E., Garbacki, N., Molinaro, G., Brown, N.J., Marceau, F., y Adam, A. 2005. The kallikrein-kinin system: current y future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99**: 6-38.
- Motoi, H., y Kodama, T. 2003. Isolation y characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung* **47**: 354-358.

- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S., y Takano, T. 1995. Purification y characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci* **78**: 777-783.
- Ohnishi, N., y Yokoyama, T. 2004. Interactions between medicines y functional foods or dietary supplements. *Keio J Med* **53**: 137-150.
- Palmer, R.M., Ashton, D.S., y Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**: 664-666.
- Paredes-López O, Valverde ME. 2006. Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*: 65-73.
- Pechanova, O. 2007. Contribution of captopril thiol group to the prevention of spontaneous hypertension. *Physiol Res* **56 Suppl 2**: S41-48.
- Radhika, G., Sudha, V., Mohan Sathya, R., Ganesan, A., y Mohan, V. 2008. Association of fruit y vegetable intake with cardiovascular risk factors in urban south Indians. *Br J Nutr* **99**: 398-405.
- Reid, I. 2001. Péptidos vasoactivos. In *Farmacología básica y clínica*. (ed. B. Katzung), pp. 1346. Manual Moderno, México DF.
- Rosas Peralta, M., Lara Esqueda, A., Pastelin Hernández, G., Velásquez Monroy, O., Martínez Reding, J., Méndez Ortiz, A., Lorenzo Negrete, J.A., Lomeli Estrada, C., González Hermsillo, A., Herrera Acosta, J., et al. 2005. [National Re-survey of Arterial Hypertension (RENAHTA). Mexican consolidation of the cardiovascular risk factors. national follow-up cohort]. *Arch Cardiol Mex* **75**: 96-111.

- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Mezzano, S., Plaza, J.J., y Egido, J. 2001. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expying the field. *Hypertension* **38**: 1382-1387.
- Rutherford-Markwick, K.J., y Moughan, P.J. 2005. Bioactive peptides derived from food. *J AOAC Int* **88**: 955-966.
- Saiga A, K.K., Wei Z, Okumura T, Kaneko T, Nishimura T. 2002. Hypotensive activity of muscle protein y gluten hydrolysates obtained by protease treatment. *J Food Biochem* **26**: 391-401.
- Sauer, J.D. 1967. The grain amaranths y their relatives: a revised taxonomic y geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden* **54**: 103-137.
- Scilingo AA, M.-O.S., Martínez EN, Añón MC. 2002. Amaranth protein isolates modified by hydrolytic y thermal treatments. Relationship between structure y solubility. *Food Research International* **35**: 855-862.
- Segura-Nieto M, B.d.I.R.A., Paredes López O. 1994. Biochemistry of Amaranth Proteins. In *Amaranth: Biology, Chemistry y Technology*. (ed. O. Paredes-López), pp. 75-106. CRC Press Inc.
- Shewry, P.R., Napier, J.A., y Tatham, A.S. 1995. Seed storage proteins: structures y biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 945-956.
- Silva-Sánchez, C. 2007. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. In *Departamento de Biología Molecular*, pp. 100. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí.
- Silva-Sánchez, C., de la Rosa, A.P., León-Galván, M.F., de Lumen, B.O., de León-Rodríguez, A., y de Mejía, E.G. 2008. Bioactive peptides in

- amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* **56**: 1233-1240.
- Simko, F. 2007. Is NO the king? Pathophysiological benefit with uncertain clinical impact. *Physiol Res* **56 Suppl 2**: S1-6.
- Stanisavljevic, S., Ignjatovic, T., Deddish, P.A., Brovkovich, V., Zhang, K., Erdos, E.G., y Skidgel, R.A. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors block protein kinase C epsilon by activating bradykinin B1 receptors in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1153-1158.
- Stoll, M., Steckelings, U.M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., y Unger, T. 1995. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* **95**: 651-657.
- Svirskis, A. 2003. Investigation of amaranth cultivation y utilisation in Lithuania. *Agronomy Research* **1**: 253-264.
- Takano, T. 2002. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 333-340.
- Tom, B., Dendorfer, A., de Vries, R., Saxena, P.R., y Jan Danser, A.H. 2002. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol* **137**: 276-284.
- Tsai JS, C.T., Pan BS, Gong SD, Chung MY. 2008. Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry* **106**: 552-558.
- Ueno, A., y Oh-ishi, S. 2003. Roles for the kallikrein-kinin system in inflammatory exudation y pain: lessons from studies on kininogen-deficient rats. *J Pharmacol Sci* **93**: 1-20.

- Velásquez-Monroy, O., Rosas Peralta, M., Lara Esqueda, A., Pastelin Hernández, G., Sánchez-Castillo, C., Attie, F., y Tapia Conyer, R. 2003. [Prevalence y interrelations of noncommunicable chronic diseases y cardiovascular risk factors in Mexico. Final outcomes from the National Health Survey 2000]. *Arch Cardiol Mex* **73**: 62-77.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., y Verstraete, W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* **92**: 357-366.
- Watanabe, T., Barker, T.A., y Berk, B.C. 2005. Angiotensin II y the endothelium: diverse signals y effects. *Hypertension* **45**: 163-169.
- Weston, A.H., Feletou, M., Vanhoutte, P.M., Falck, J.R., Campbell, W.B., y Edwards, G. 2005. Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel activation y epoxyeicosatrienoic acids. *Br J Pharmacol* **145**: 775-784.
- Yang, Y., Marczak, E.D., Usui, H., Kawamura, Y., y Yoshikawa, M. 2004. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. *J Agric Food Chem* **52**: 2223-2225.
- Yang, Y., Marczak, E.D., Yokoo, M., Usui, H., y Yoshikawa, M. 2003. Isolation y antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from spinach Rubisco. *J Agric Food Chem* **51**: 4897-4902.
- Yang, Y., Tao, G., Liu, P., y Liu, J. 2007. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *J Agric Food Chem* **55**: 7891-7895.

VI. PERSPECTIVAS

- Determinar los efectos de los digeridos tripticos de glutelinas de amaranto en los niveles de angiotensina II en células endoteliales.
- Obtener cada uno de los péptidos con actividad inhibitoria de la ECA.
- Caracterizar los efectos de cada péptido en la producción de NO en células endoteliales.
- Caracterizar los efectos de cada péptido en los niveles de angiotensina II en células endoteliales.
- Caracterizar los efectos de cada péptido sobre la actividad de la ECA.
- Determinar los componentes de los digeridos tripticos de glutelinas de amaranto que participan en la vasorelajación a nivel de músculo
- Determinar las vías por las cuales se dan dichos efectos
- Determinar los efectos de dichos péptidos en ratones hipertensos.