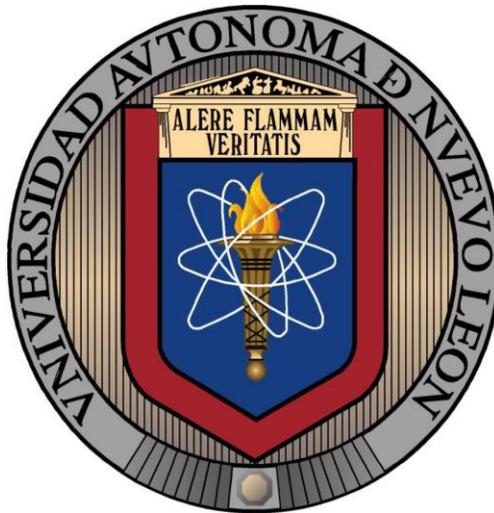


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLA DE *Salvia hispanica* L. SOBRE LA HIPERTENSIÓN: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UN MODELO MURINO

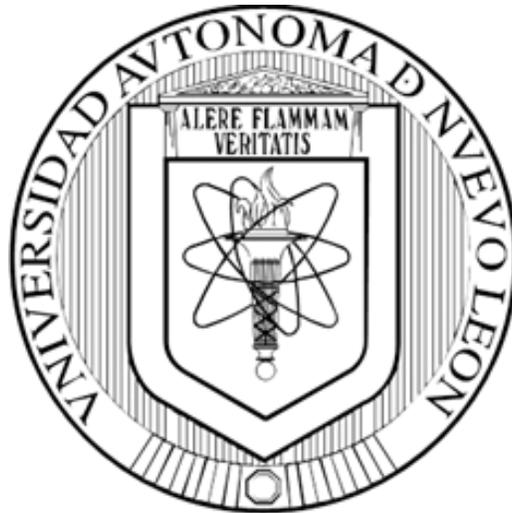
POR

L.N. GERARDO ISMAEL ARREDONDO MENDOZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

MAYO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLA DE *Salvia hispanica* L. SOBRE LA HIPERTENSIÓN: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN UN MODELO MURINO

POR

L.N. GERARDO ISMAEL ARREDONDO MENDOZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

MONTERREY, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MAYO, 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por mostrarme el camino que he de seguir, el cual me ha llenado de gozo y satisfacción, y por darme la sabiduría y entendimiento necesarios para desarrollarme en todos los aspectos de mi vida.

A mi madre Juana María Mendoza, porque de ella he aprendido el valor del esfuerzo, que ante el trabajo no hay que rendirse, sino intentar hacerlo cada vez mejor.

A mi padre Juan Bautista, porque a pesar de las diferencias he aprendido que no importa lo mucho o lo poco que sepas, lo importante es el compartirlo con quien quiere aprender.

A mi hermano Daniel Arredondo, porque siempre me ha visto como su hermanito, porque siempre busca protegerme, porque siempre está ahí cuando lo necesito, y porque no importa lo diferentes que somos, siempre tiene las palabras que necesito.

A mi hermana Dulce Bautista, por ese apoyo incondicional en cada uno de los proyectos que emprendo, por su dedicación a este proyecto y su compañía.

A Paola Gurrola, por confiar siempre en mí, por compartir conmigo cada momento importante dentro de este camino y por ser parte de mis motivaciones para ser mejor.

A la Dra. Blanca González, por esa oportunidad que me dio al llegar a su laboratorio, por la confianza que puso en mí y el conocimiento que me ha compartido a lo largo de estos años. Por ser parte fundamental en mi formación académica y profesional.

Al Dr. Eduardo Campos, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y mostrarme la pasión con la que se debe trabajar, por las pláticas motivacionales en los momentos difíciles y su apoyo constante.

Al Dr. Francisco Guzmán, por la paciencia y el apoyo que tuvo hacia mi trabajo y las oportunidades que dispuso para seguir aprendiendo cosas nuevas.

A mis amigos del laboratorio de alimentos: Abad, Sofía y Bere; porque ellos fueron en gran manera los responsables de hacerme las tardes agradables, por el tiempo y consejos que compartimos en los últimos años y la amistad que sigue creciendo.

A mis amigos del laboratorio de proteómica: Oto, Clara, Damaris, Wendy, Roberto, Gaby, Ale; porque con ellos he aprendido cómo trabajar más allá del compañerismo, y cada uno me ha mostrado que sin importar las diferencias que tengamos, seguimos siendo una familia.

A don Trino, porque él fue de gran apoyo en mi estancia en el bioterio.

Al Dr. Heriberto Castro de quien recibí apoyo durante el proceso del bioensayo y Grecia Ruíz quien estuvo dispuesta a sacrificar unas horas de cada día para colaborar en ese proceso.

A los profesores del programa de MCN, por darme las herramientas necesarias para enfrentarme al mundo laboral y alimentar mis ganas de crecer en esta área.

A la Facultad de Salud Pública y Nutrición y la Facultad de Medicina, por brindarme los recursos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante mi estadía en el programa académico.

A todos y cada uno de ellos...

Gracias totales

DEDICATORIA

A mis padres:

Juana María Mendoza Rosales

Juan Bautista Hernández

A mis hermanos:

Dulce Esmeralda Bautista Mendoza

Daniel Martín Arredondo Mendoza

A mi novia:

Paola Elizabeth Gurrola Villaseñor

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
2.1 Hipertensión Arterial.....	7
2.2 Clasificación y criterios para el diagnóstico	9
2.3 Fisiopatología	10
2.4 Tratamiento.....	11
2.5 Enzima Convertidora de la Angiotensina I	12
2.6 Papel del sistema renina-angiotensina sobre la presión arterial.....	13
2.7 Papel del sistema calicreína-cinina (SCC) sobre la presión arterial.....	16
2.8 Papel del óxido nítrico sobre la presión arterial	17
2.9 Inhibidores de la ECA I.....	19
2.10 Fuentes naturales de IECAs.....	21
2.11 Compuestos bioactivos y biomarcadores	23
2.12 Inhibidores naturales de la ECA I	25
2.12.1 Péptidos bioactivos	26
2.12.2 Compuestos fenólicos	26
2.13 <i>Salvia hispánica</i> L.	28
2.13.1 Generalidades	28
2.13.2 Presencia de compuestos fenólicos	29
2.13.3 <i>Salvia hispánica</i> L. e hipertensión	30
2.14 Expresión génica.....	31
2.14.1 Expresión génica e hipertensión	32
III. HIPOTESIS	34
IV. OBJETIVOS.....	35
4.1 General.....	35
4.2 Específicos	35
V. MATERIAL Y MÉTODOS	36
5.1 Estrategia general de trabajo	36

5.2 Material biológico	37
5.3 Diseño del estudio.....	37
5.4 Obtención del extracto etanólico de semilla de <i>Salvia hispanica</i> L. (EESH).....	37
5.5 Análisis de los compuestos fenólicos del EESH	38
5.5.1 Cuantificación de flavonoides totales del EESH	38
5.5.2 Cuantificación de polifenoles totales.....	39
5.6 Cuantificación de la actividad inhibitoria de la ECA I <i>in vitro</i>	40
5.6.1 Determinación de la concentración inhibitoria máxima media (IC50)	41
5.7 Bioensayo	41
5.7.1 Inducción de la hipertensión (Semana 0-6)	41
5.7.2 Medición de la presión arterial en las ratas.....	42
5.7.3 Administración de los tratamientos (Semana 7-10)	44
5.8 Eutanasia y recolección de tejido.....	44
5.9 Selección de los genes a analizar	45
5.10 Identificación de las secuencias que codifican para los genes <i>Ace, Agtr1a, Nos3, Bdkrb2</i> y <i>Gapdh</i>	45
5.10.1 Diseño de oligonucleótidos específicos	46
5.11 Análisis de expresión de los genes <i>Ace, Agtr1a, Nos3, Bdkrb2</i> y <i>Gapdh</i>	46
5.11.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	46
5.11.2 Aislamiento y purificación de RNA.....	47
5.11.3 Síntesis de DNAC.....	48
5.11.4 Amplificación de fragmentos de DNAC por PCR.....	49
5.11.5 Electroforesis en gel de agarosa	49
5.11.6 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes <i>Ace, Agtr1a, Nos3, Bdkrb2</i> y <i>Gapdh</i>	50
5.12 Análisis estadístico	51
VI. RESULTADOS	52
6.1 Obtención del extracto etanólico de semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (EESH).....	52
6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales del EESH.....	52
6.3 Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA I <i>in vitro</i>	53
6.4 Bioensayo	54
6.4.1 Obtención del modelo de ratas con hipertensión	54
6.4.3 Efecto de los tratamientos sobre la presión arterial.....	55
6.4.4 Efecto de los tratamientos sobre el peso de los animales.....	56

6.4.5 Efecto de los tratamientos en el peso de los órganos	57
6.5 Análisis <i>in silico</i> : identificación de las secuencias de gens y diseño de oligonucleótidos específicos	58
6.6 Estandarización de condiciones para análisis de expresión de los genes <i>Ace</i> , <i>Agtr1a</i> , <i>Nos3</i> , <i>Bdkrb2</i> y <i>Gapdh</i>	59
6.7 Extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido cardiaco de rata	60
6.7.1 Aislamiento y purificación de RNA	60
6.7.2 Síntesis de DNAC.....	61
6.8 Análisis de expresión de los genes <i>Ace</i> , <i>Agtr1a</i> , <i>Nos3</i> , <i>Bdkrb2</i>	61
6.8.1 Expresión del gen <i>Ace</i>	62
6.8.2 Expresión del gen <i>Agtr1a</i>	63
6.8.3 Expresión del gen <i>Nos3</i>	64
6.8.4 Expresión del gen <i>Bdkrb2</i>	65
VII. DISCUSIÓN.....	68
7.1 Caracterización del extracto etanólico de semilla de chía (EESH)	68
7.1.1 Contenido de compuestos fenólicos del EESH.....	68
7.1.2 Actividad inhibitoria de la ECA <i>in vitro</i>	69
7.2 Obtención de un modelo de ratas con hipertensión	70
7.3 Efecto del captopril y EESH en la presión arterial	71
7.4 Análisis de la expresión de genes en ratas con hipertensión.....	72
VIII. CONCLUSIONES	79
IX. REFERENCIAS.....	80
ANEXO 1	90
ANEXO 2	94

Índice de tablas

Tabla	Nombre	Página
1	Clasificación de la presión arterial para adultos	10
2	Tratamiento administrado a cada grupo de ratas	44
3	Valores de IC50 de EESH y captopril para inhibición de la ECA	54
4	Presión arterial sistólica en los diferentes grupos de ratas al inicio de la administración de los tratamientos	55
5	Comparación del peso corporal de las ratas al inicio y final de los tratamientos	57
6	Comparación del peso promedio de los órganos	58
7	Análisis de oligonucleótidos específicos diseñados para los genes <i>Ace</i> , <i>Agtr1a</i> , <i>Nos3</i> , <i>Bdkrb2</i> y <i>Gapdh</i>	59

Índice de figuras

Figura	Nombre	Página
1	Estructura terciaria de la Enzima Convertidora de Angiotensina I unida al péptido Angiotensina II	13
2	Sistema renina angiotensina-aldosterona, efecto de la ECA sobre la angiotensina I	14
3	Sistema calicreína-cinina, efecto de la ECA sobre la bradicinina	17
4	Sistemas renina-angiotensina y calicreina-cininas, efecto de la ECA sobre sus sustratos	17
5	Fases de desarrollo del proceso experimental	36
6	Ejemplo de registro de presión arterial en ratas	43
7	Curva de calibración de ácido gálico	52
8	Efecto inhibitorio del EESH sobre la actividad de la ECA	53
9	Comparación de los valores de PAS en los diferentes grupos al inicio y final de los tratamientos	56
10	Amplificación de un fragmento del gen <i>Agtr1a</i> usando como molde diferentes concentraciones de DNAg	60
11	Amplificación de un fragmento del gen <i>Gapdh</i> en los diferentes grupos de ratas	62
12	Comparación de la expresión del gen <i>Ace</i> en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos	63
13	Comparación de la expresión del gen <i>Agtr1a</i> en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos	64
14	Comparación de la expresión del gen <i>Nos3</i> en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos	65
15	Comparación de la expresión del gen <i>Bdkrb2</i> en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos	66
16	Comparación de la expresión de los genes <i>Ace</i> , <i>Agtr1a</i> , <i>Nos3</i> y <i>Bdkrb2</i> en tejido cardiaco de ratas sometidas a diferentes tratamientos	66

NOMENCLATURA

µl	microlitros
Ang	Angiotensina
Anova	Análisis de varianza
CPL	Captopril
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EESH	Extracto etanólico de semilla de Salvia hispánica L.
g	gramos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
h	horas
HAS	Hipertensión arterial sistólica
HHL	Hipuril-L-Histidil-L-Leucina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HTA	Hipertensión arterial
IC50	Concentración media inhibitoria
IECAs	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
kg	kilogramo
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil ester
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mmHg	milímetros de mercurio
mU	miliunidades
N	normal
Na ₂ CO ₃	Carbonato de calcio
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nM	nanomolar
ON	Óxido nítrico
ONSe	Óxido nítrico sintasa endotelial
PA	Presión arterial
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SCC	Sistema calicreína-cinina
seg	segundos
SRA	Sistema renina angiotensina

RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una de las patologías de mayor prevalencia (30-35 %) a nivel mundial. Este es uno de los principales factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y está directamente relacionada con patologías como la obesidad y dislipidemias, entre otras. Su regulación está dada principalmente por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (usados como tratamiento de primera línea) producen reacciones adversas en el paciente, por lo que se ha incrementado el interés en la búsqueda de alternativas en el tratamiento de la HTA a partir de fuentes naturales. Diversas especies pertenecientes a la familia de las salvias han mostrado un efecto hipotensor asociado a la presencia de compuestos antioxidantes. En este estudio se analizó el efecto de un extracto etanólico de semilla de chía, en un modelo de ratas con hipertensión, sobre la expresión de los genes implicados en los mecanismos de regulación de la HTA: *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* y *Bdkrb2*.

Para el desarrollo de este trabajo se obtuvo un extracto etanólico de semilla de chía (EESH), se cuantificaron los polifenoles y flavonoides totales, y se determinó el IC50 sobre la enzima ECA I. Por otro lado, se generó un modelo de ratas con hipertensión inducida por la administración de L-NAME (inhibidor de la síntesis de óxido nítrico). A las ratas hipertensas se asignaron 3 tratamientos; un grupo recibió captopril, otro recibió EESH, y uno más permaneció con la administración de L-NAME (grupo hipertenso). A otro grupo se le administró agua destilada como tratamiento durante todo el estudio (grupo sano). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*. El análisis de expresión de genes se realizó por RT-PCR en muestras de tejido cardíaco, utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen.

La cantidad de polifenoles y flavonoides en el EESH fue de 1.55 g/100g de semilla y 23 % de quercetina, respectivamente; y se determinó un IC50 de 9.37 mg/ml. La inducción de la HTA incrementó los valores de PA a 310 - 328 mmHg, mientras que el grupo sano mostró valores de 100 mmHg. Después de la administración de los diferentes tratamientos, las ratas que recibieron L-NAME presentaron un incremento del 31.2 % en los valores de PA, mientras que la administración de captopril y EESH produjo una disminución del 0.2 % en los valores de PA. La administración crónica de L-NAME produjo una disminución en

la ganancia de peso de las ratas hipertensas, mientras que las ratas sanas continuaron incrementando su peso hasta un 7.8 % con respecto al inicio de los tratamientos. El análisis de expresión de los genes demostró que la administración de L-NAME produjo una disminución significativa en la expresión del gen *Ace*, mientras que los niveles de los genes *Agtr1a* y *Nos3* se incrementaron de forma significativa, con respecto a los valores basales (ratas sanas). Las ratas hipertensas tratadas con captopril mostraron niveles de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a* estadísticamente iguales a los mostrados por los niveles basales. La administración del EESH a las ratas hipertensas produjo un efecto similar al captopril en los valores de expresión de los genes *Agtr1a* y *Nos3*, los cuales mostraron igualdad estadística a los niveles basales; sin embargo, la expresión del gen *Ace* solo presentó igualdad estadística con las ratas tratadas con captopril, pero no con los niveles basales. La expresión del gen *Bdkrb2* no mostró cambios significativos en su expresión en los diferentes grupos de ratas tratados.

El EESH produce un efecto inhibitorio sobre la ECA, y mostró un efecto similar en la PA de las ratas hipertensas. Similar al obtenido por la administración de captopril. Además, se observa un efecto regulatorio en la expresión de genes involucrados en la modulación de la PA. El EESH podría ser utilizado como, y para el desarrollo de, agentes coadyuvantes en el tratamiento de la hipertensión.

ABSTRACT

Arterial hypertension (AHT) is the principal risk factor for developing cardiovascular disease; its prevalence in worldwide is ca. 30-35% and it is directly related with pathologies such as obesity and dyslipidemia. HTA regulation is controlled by the renin-angiotensin system, especially by the angiotensin-converting enzyme (ACE). For control of AHT, the angiotensin-converting enzyme inhibitors have been used as first line treatment, notwithstanding, these compounds produce secondary reactions in patients, therefore in the last years, the interest of searching alternatives for the treatment of AHT using natural sources has been increased. Several vegetal species of *Salvia* family have shown a hypotensive effect, associated to the presence of antioxidant components. In this study, using a rat model with hypertension, we analyzed the effect of an ethanolic extract of chia (*Salvia hispanica* L.) seed on the expression of genes involved in AHT regulation mechanisms: *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* and *Bdkrb2*.

In the first phase of this work, an ethanolic extract of chia seed (EESH) was obtained; the total polyphenols and flavonoids were quantified, and the IC₅₀ of ACE I enzyme was determined. A model of rats with induced hypertension was also generated by the administration of L-NAME (nitric oxide synthesis inhibitor). Hypertensive rats (12) were allocated to three different treatments; the first group received captopril, the second group received EESH and the last group remained with the administration of L-NAME, during 6 weeks. Control group (healthy group, 4 rats) was treated with distilled water during the whole study. In the second phase, the gene expression analysis was realized by RT-PCR in samples of cardiac tissue, using specific oligonucleotides designed for *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh* genes; the comparisons of level expression between the groups was performance using statistical analyses with ANOVA test.

The amount of polyphenols and flavonoids in the EESH was 1.55 g/100 g of chia seed and 23% of quercetin, respectively. The IC₅₀ value for ACE enzyme inhibition was 9.37 mg/ml. Rats treated with L-NAME have increased blood pressure: between 310 to 328 mmHg, while the control group showed values of 100 mmHg. After the administration of the different treatments, rats receiving L-NAME showed an increment on blood pressure levels (31.2%), while administration of captopril and EESH decreased 0.2% of blood pressure levels. Gene expression analysis showed that the administration of L-NAME decreased significantly the expression of *Ace* gene, while the levels of *Agtr1a* and *Nos3* were incremented significantly, with respect to basal levels (healthy rats). In the hypertensive rats treated with captopril there are not changes in the expression of *Ace*, *Agtr1a* and *Nos3* genes, with respect to basal levels. The administration of

EESH produced a similar effect as captopril in *Agtr1a* expression levels, however Ace levels expression presented statistic equality with captopril treated rats but not with basal levels. *Bdkrb2* gene expression did not show significative changes in the different treatment groups.

The EESH shown to have an inhibitory effect on ACE I; *in vivo*, its administration showed a similar effect to the captopril, on the blood pressure of hypertensive rats. Besides, a regulatory effect of the expression of the genes involved on the modulation of blood pressure was observed. The EESH might be used as a coadyuvant agent on hypertensive treatment.

I. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial (HTA) es un síndrome multifactorial de origen genético que se ha constituido como uno de los problemas de salud más importantes ya que se ha relacionado con el incremento de las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. En adultos, la HTA se ha relacionado a la presencia y/o antecedentes familiares de patologías tales como sobrepeso, obesidad, hiperlipidemia, etc. (de Dios, 2011; Sellén et al., 2009).

El sistema renina-angiotensina juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del medio interno (volumen sanguíneo y concentración de electrolitos) y por ende, de la presión arterial. Éste es un sistema hormonal, que inicia con la renina procedente principalmente de la corteza suprarrenal y cuyo producto final activo es la angiotensina II. Los componentes de la cascada de este sistema, necesarios para la generación de angiotensina II son la renina, el angiotensinógeno y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), ésta última es excretada principalmente de los pulmones y es la responsable de romper dos aminoácidos de la angiotensina I para formar angiotensina II, la cual desarrolla sus funciones de vasoconstricción a través de receptores específicos (AT1 - AT2).

En el tratamiento de la HTA, la terapia farmacológica es la más utilizada mediante los fármacos inhibidores de la ECA, los cuales producen un bloqueo específico en la formación de Angiotensina II. Algunos de los fármacos de primera línea son el captopril, el enalapril, el lisinopril, el fosinopril, entre otros; sin embargo, la administración de estos fármacos conlleva la aparición de efectos adversos que van desde leves como la tos, el vómito, el dolor de cabeza, hasta efectos de mayor gravedad como potenciar el efecto hipotensor y edema angioneurótico (Reyes-Moreno, 2010; Vázquez, Cruz, Vázquez, & Milián, 1998).

Por lo que, debido a esto surge el interés por la búsqueda de inhibidores naturales que no presenten efectos secundarios, como alternativa para el

tratamiento de la HTA se han evaluado especies vegetales que presentan efectos hipotensores y considerable contenido de compuestos fenólicos.

En diversos estudios se ha descrito el efecto inhibitorio de extractos de *Salvia hispánica* L. sobre la ECA *in vitro*, así como la presencia de compuestos fenólicos como la myricetina, quercetina, kaempferol y ácido cafeico (González, 2011; López & Ortega, 2014). En otro estudio con ratones que no producían ECA a nivel endotelial, encontrando que la ECA es importante, pero no esencial para la regulación de la presión arterial (Santeliz et al., 2008). En 2007, Steinkamp-Fenske y cols. observaron un aumento en la expresión de RNAm de la ONSe con la administración de extracto de *Salvia miltiorrhiza*.

La regulación de la PA está dada por diversas vías que tienen funciones dinámicas entre sí; el determinar los mecanismos y/o cambios específicos involucrados en el efecto hipotensor, y de expresión de genes que participan en la regulación de la PA, permite avanzar en el conocimiento de las vías regulatorias de la PA, ya que son pocos los estudios que han analizado la modulación por tratamientos con fuentes naturales de la HTA a nivel genético. Además de brindar nuevas opciones para el uso de terapias alternativas como adyuvantes en el tratamiento de la HTA con beneficios directos a la salud.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es la enfermedad crónica de mayor prevalencia a nivel mundial (Bell, 2011). En México, para el año 2000 se presentaba una prevalencia de 30.05% en población de 20 a 69 años, es decir, más de 15 millones de mexicanos para este grupo de edad, siendo los estados del norte de la república los más afectados (Rosas, Pastelín, Martínez, Herrera-Acosta, & Attie, 2004). Según datos reportados por la ENSANUT 2012, la prevalencia de hipertensión en la población mexicana se ha mantenido relativamente constante desde el año 2006, mostrando valores de 33.3% para hombres y 30.8% para mujeres en el año 2012 (Gutiérrez et al., 2012).

En este trastorno, varios de los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede dañarlos. Los valores normales de presión arterial (PA) se han establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), Asociación Internacional de Hipertensión y el Comité para la Detección, Evaluación y Tratamiento de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (CDETH), en: <90 mmHg como presión arterial diastólica (PAD) y cifras inferiores a 140 mmHg para presión arterial sistólica (PAS) (Cruz, 2001), siendo categorizado con diagnóstico de hipertensión a cualquier persona de 18 años o más de edad que refiera padecer de hipertensión y consume medicamentos antihipertensivos de forma regular, o que presente cifras de 140 mmHg y/o 90 mmHg en al menos dos tomas sucesivas (Ordúñez et al., 2010).

La HTA es uno de los principales factores involucrados en la génesis de los trastornos cardiovasculares, que a su vez constituyen la primera causa de mortalidad en personas de edad media y ancianos (Gómez & Guerrero, 2009). Diversos estudios indican que cuanto más alta es la tensión arterial, es mayor la probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular (Granados et al., 2007).

Los datos obtenidos de la encuesta Nacional de Salud del año 2000 mostraron que el 61% de las personas que padecen hipertensión no tienen conocimiento de

su estado, siendo de gran preocupación, ya que pueden transcurrir años sin buscar atención médica, repercutiendo en el daño en órganos blanco, sólo el 8% de la población mantiene control sobre la enfermedad (Rosas et al., 2005). Según datos establecidos por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el año 2012, en el estado de Nuevo León la prevalencia de HTA con diagnóstico médico previo se ubicó en el 16.8% (Gutiérrez et al., 2012). Lo anterior explica la amplia tasa de urgencias hipertensivas y eventos cerebrovasculares, insuficiencia renal crónica, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca y retinopatía (Rosas et al., 2005). Datos obtenidos de la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición muestran que en el estado de Nuevo León existe una prevalencia de hipertensión en sujetos de 20 a 59 años de 12.97%, mientras que en mayores de 60 años se presenta en un 45.58%. Dentro de las personas que dijeron no padecer hipertensión, se encontró que el 46.27% de éstas la padecían sin tener conocimiento al respecto (Instituto Nacional de Salud Pública, 2013).

Una variedad de factores puede explicar la estrecha relación entre presión arterial alta y la enfermedad coronaria, esta asociación ha tratado de dilucidarse a través de tres componentes fundamentales: a) anomalías vasculares intrínsecas, en la cual el sistema renina angiotensina (SRA) es, claramente, el escenario para el desarrollo de cambios patológicos en las paredes de las arterias; b) factores de riesgo con un componente predominantemente hereditario y c) la variabilidad de la presión sanguínea en diferentes mediciones que es característica de la hipertensión. Estos componentes parecen desempeñar un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad ateromatosa, todo lo cual contribuye a explicar las complicaciones de la hipertensión (Contreras et al., 2000).

La HTA como enfermedad crónica exige el cumplimiento de un tratamiento de forma permanente y sistémica, lo que implica cambios en el estilo de vida ya sea combinados o no con el uso de fármacos (Granados et al., 2007).

Debido a los mecanismos de compensación, la enfermedad puede evolucionar de forma asintomática, incluso presentando valores de presión arterial diastólica de 120 mmHg. Las manifestaciones suelen ser inespecíficas o se deben a las complicaciones que ésta conlleva, por lo cual se estima que hasta el 25 % de las personas afectadas fallece por las secuelas si no es diagnosticada a tiempo (Bell, 2011). Valores elevados de PA puede resultar en enfermedades coronarias y cambios en la función y estructura ventricular, además de ser un factor de riesgo para incidencias de fallo cardiaco (Ringoir et al., 2014).

Es necesario tener en cuenta el riesgo que tienen los pacientes con hipertensión en relación con las enfermedades cardiovasculares, el cual se determina no sólo por el nivel de su presión arterial, sino también por la presencia o ausencia de daño en órganos diana o de la presencia de otros factores de riesgo como el tabaquismo, dislipidemias y diabetes (Macías et al., 1999).

2.2 Clasificación y criterios para el diagnóstico

Sánchez y cols. (2010) proponen que el periodo de tiempo requerido para la evaluación inicial de un paciente con hipertensión es de por lo menos 30 minutos. Se han establecido objetivos principales para el diagnóstico que se dirigen a:

- Confirmar la existencia de cifras elevadas de presión arterial.
- Determinar el grado de hipertensión y la existencia de daño de órganos blanco.
- Evaluar la presencia de comorbilidades.
- Identificar tratamientos previamente recibidos o en uso actual.
- Cuantificar el riesgo global incluyendo sus componentes sociales.
- Diagnosticar o descartar posibles causas de hipertensión secundaria.

Se han establecido valores de referencia para el control de la presión arterial, categorizándolos según el estadio para el diagnóstico y seguimiento en adultos mayores de 18 años (Macías et al., 1999) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos.

Tensión arterial	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Normal	menor a 120	menor a 80
Pre-hipertensión	120 - 139	80 - 89
Hipertensión	140	90
Hipertensión etapa 1	140 - 159	90 - 99
Hipertensión etapa 2	mayor a 160	mayor a 100

(Joint National Committee, 2004)

2.3 Fisiopatología

Aún no se conocen con exactitud los mecanismos fisiopatológicos de la hipertensión arterial sistólica (HAS), sin duda es fundamental el estado de la pared de los grandes vasos, (estos nacen en los ventrículos y consisten principalmente en laminillas elásticas, también se conocen como arterias elásticas, la sangre que llega a ellos desde los ventrículos en contracción, estira la elastina de sus paredes). En algún momento, a medida que aumenta la edad, en las arterias (grandes y pequeñas) se producen cambios estructurales y cambios funcionales. En las grandes arterias como la aorta, se incrementa el depósito de matrix extracelular, de calcio, de colesterol, etc., aumentando el grosor de la pared, lo que resulta en esclerosis. Con la edad ocurren otros cambios fisiopatológicos importantes: disminuye la sensibilidad de los baroreceptores, aumenta la norepinefrina plasmática, disminuye la actividad de la bomba de Na-ATPasa, incrementando la resistencia vascular periférica, se presenta alteración hemodinámica capital de los hipertensos diastólicos (tono vasomotor de las arteriolas). Ocurren también cambios en el árbol arterial periférico como degeneración hialina de la capa media arteriolar, que daría lugar a una disminución de su distensibilidad, contribuyendo probablemente a la elevación de la resistencia vascular periférica que presentan los ancianos, sin que por ello presenten necesariamente hipertensión diastólica (Quiróz, 1997).

Son muchos los factores fisiopatológicos que han sido considerados en la génesis de la hipertensión esencial (que surge sin causa específica identificable): como el incremento en la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) (Brook & Julius, 2000), tal vez relacionado con excesiva exposición o respuesta al estrés psicosocial del impacto de la vida moderna, la sobreproducción de hormonas ahorradoras de sodio y vasoconstrictoras, la alta ingesta de sodio, la inadecuada ingesta de potasio y calcio, el incremento en la secreción o la inapropiada actividad de la renina (con resultante incremento en la producción de angiotensina II y aldosterona), la deficiencia de vasodilatadores (como la prostaciclina, el óxido nítrico (ON) y los péptidos natriuréticos), la alteración en la función del sistema calicreína-cinina (SCC), que afecta el tono vascular y el manejo renal del sodio, las anomalías en los vasos de resistencia (incluyendo lesiones en la microvasculatura renal), la diabetes mellitus, la resistencia a la insulina, la obesidad, el incremento en la actividad de factores de crecimiento, las alteraciones en los receptores adrenérgicos que influyen la frecuencia cardíaca, el inotropismo cardíaco y el tono vascular, y las alteraciones celulares en el transporte iónico. El incremento en la actividad del SNS incrementa la presión sanguínea y contribuye al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión a través de la estimulación del corazón, vasculatura periférica y riñones, causando incremento en el gasto cardíaco, en la resistencia vascular y en la retención de líquidos (Gamboa, 2006).

Las crisis hipertensivas pueden producirse en pacientes con HTA previa o aparecer sin antecedentes de PA elevada. Cualquier alteración en los múltiples sistemas de control de la PA (sistema nervioso autónomo, SRA, equilibrio endotelio-óxido nítrico, sustancias vasodilatadoras-vasoconstrictoras, resistencias vasculares periféricas, entre otras) pueden desencadenarlas (Ribera & Caballero, 2014).

2.4 Tratamiento

Todos los pacientes, bien sean prehipertensos o hipertensos, deben adoptar todas las modificaciones de estilo de vida saludable. Estas recomendaciones

incluyen: suspender el tabaquismo, mantener un IMC entre 18.5 y 24.9, seguir una dieta rica en potasio, calcio, frutas, vegetales, baja en sodio y con bajo porcentaje de grasas saturadas, reducir el consumo de sal a 6 g por día, realizar actividad física regular aeróbica como caminar 30 minutos al día la mayoría de los días de la semana y, por último, disminuir el consumo de alcohol a máximo 30 ml de etanol por día, a la vez que se inicia el manejo farmacológico. Este último se inicia en los estadios 1 y 2 de HTA (García et al., 2004).

La elección de la medicación dependerá de la causa de la enfermedad y las complicaciones asociadas, ya que la PA debe disminuir gradualmente y es frecuente la necesidad de asociar dos o más fármacos antihipertensivos para lograr mayor eficacia antihipertensiva sin dosis elevadas, menos efectos adversos y sinergia en protección de órganos blanco (de Dios, 2011).

Los grupos farmacológicos que han demostrado un mayor efecto antihipertensivo, así como la disminución de la morbimortalidad, son los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), los antagonistas de los receptores de la angiotensina (ARA) II, los antagonistas cálcicos, los beta-bloqueantes y los diuréticos (de Dios, 2011).

Adicionalmente a los fármacos, se requiere de una orientación al paciente para que tenga apego al tratamiento, ajuste su dieta, controle su peso, realice actividad física, utilice el automonitoreo de la presión arterial y reconozca las señales de alarma, es decir, incorpore hábitos más saludables a su estilo de vida. Si la persona tiene información acerca de qué debe hacer respecto a su enfermedad, tendrá mayor posibilidad de controlarla clínicamente y retrasar la frecuencia de complicaciones (Bell, 2011).

2.5 Enzima Convertidora de la Angiotensina I

La investigación sobre las propiedades básicas de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se remonta a la década de los 50's. Skeggs encontró un factor (enzima) en plasma de caballo que convierte el decapeptido hipertensina I al

octapeptido hipertensina II, estos péptidos fueron nombrados tiempo después, angiotensina I a angiotensina II (Erdös, 1990).

La ECA es una peptidasa de la membrana celular, que funciona como una ectoenzima, con su sitio catalítico expuesto en la superficie extracelular. Es una metalopeptidasa de zinc con una especificidad de sustrato amplia, fue descrita inicialmente por sus propiedades catalíticas sobre dos péptidos vasoactivos, angiotensina I y la bradicinina; en estos dos péptidos, la conversión de angiotensina I a angiotensina II (octapéptido activo), además de la bradicinina en péptidos inactivos degradantes por dos divisiones sucesivas, la enzima actúa como una dipeptidil carboxipeptidasa (Villard & Soubrier, 1996).

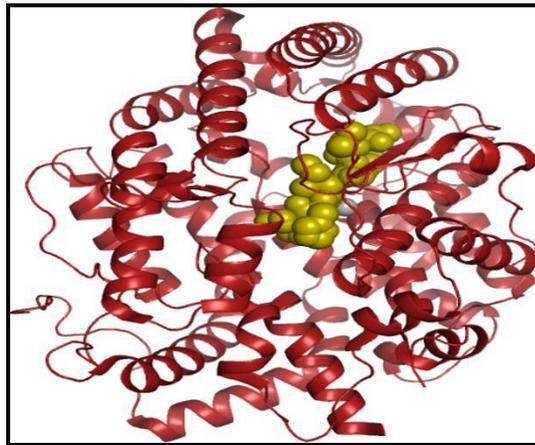


Figura 1. Estructura terciaria de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (rojo) unida al péptido Angiotensina II (amarillo). Adaptado de University of Bath (Bath, s.f.)

2.6 Papel del sistema renina-angiotensina sobre la presión arterial

El Sistema Renina-Angiotensina (SRA) juega un papel clave en el desarrollo y fisiopatología de la HTA y enfermedades cardiovasculares (Marchesi et al., 2008), siendo la hipertensión la alteración renal más importante debido al desajuste del SRA respecto del nivel de sodio corporal (Feldstein & Romero, 2007).

En 1898, Robert Tigerstedt y el estudiante sueco Per Bergman describieron la renina, basados en experimentos realizados en los años 1896 y 97 (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008); posteriormente, en 1957 Skedds presenta un esquema básico

de funcionamiento de este sistema al describir el angiotensinógeno como sustrato de la renina, tras haber definido previamente la ECA, como la enzima responsable de sintetizar la Angiotensina II (AGII) a partir de Angiotensina I (AGI) (Morales & Estañ, 2010).

El SRA es considerado un sistema endocrino cuyos metabolitos activos tienen una amplia variedad de funciones en diferentes órganos y tejidos (Lima et al., 2010), tiene un papel crítico en el control homeostático de la presión arterial, el balance hidroelectrolítico y el desarrollo renal en los mamíferos (Feldstein & Romero, 2007). Este sistema es una cascada proteolítica conectada a un sistema de transducción de señales; su activación se inicia en el riñón, único sitio conocido donde la pro-renina es convertida en renina y la única fuente de renina plasmática (figura 2) (Bader & Ganten, 2008; Santeliz et al., 2008).

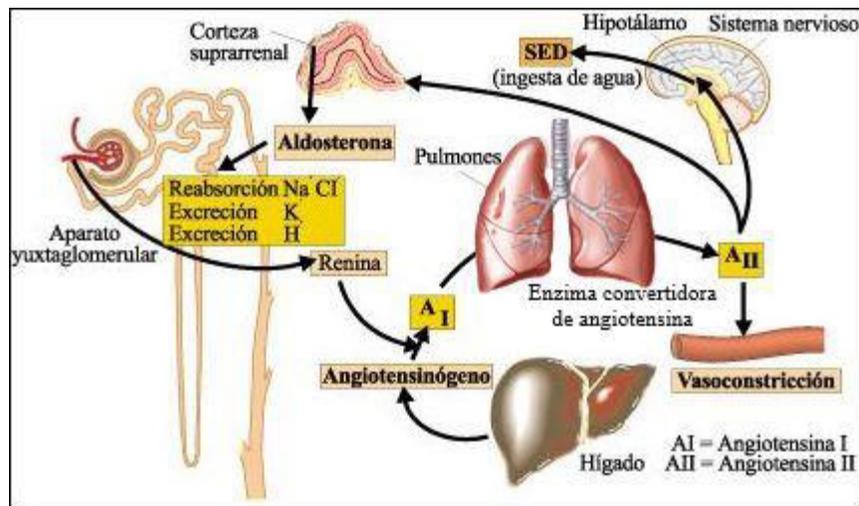


Figura 2. Sistema renina angiotensina-aldosterona, efecto de la ECA sobre la angiotensina I. Adaptado de Universidad Nacional de Colombia, 2007 (Colombia, s.f.)

La renina que es sintetizada por las células del aparato yuxtaglomerular del riñón y liberada a la circulación, está regulada principalmente por 4 factores interdependientes: 1) un mecanismo baro-receptor renal en la arteriola aferente que detecta cambios en la presión de perfusión renal, 2) cambios en el intercambio de NaCl (detectados como cambios en la concentración de Cl⁻) en las células de la mácula densa del túbulo distal (que se encuentran cerca de las

células yuxtaglomerulares y que, juntos, forman el "aparato yuxtaglomerular"), 3) la estimulación del nervio simpático a través de receptores beta-1 adrenérgicos, y 4) retroalimentación negativa por una acción directa de Ang II en las células yuxtaglomerulares (Atlas, 2007). La renina actúa sobre el angiotensinógeno, una globulina de origen hepático de 14 aminoácidos, que es transformada en un decapeptido (la Angiotensina I) al separar el dominio N-terminal (Morales & Estañ, 2010).

Una vez obtenida la AGI a partir del angiotensinógeno por la acción de la renina, ésta es convertida proteolíticamente por la ECA principalmente a nivel pulmonar en AGII (Santeliz et al., 2008), ésta ejerce efectos fisiológicos en varios tejidos, incluyendo corteza suprarrenal, riñón, músculo liso vascular y el cerebro. Tras su síntesis, la AGII se une a sus receptores o se escinde y genera productos de degradación, algunos de ellos son otros péptidos biológicamente activos, incluyendo la angiotensina 1–7, un heptapéptido con efecto vasodilatador y antiproliferativo, así como la angiotensina III y IV, éstos últimos influyen en procesos tales como el aprendizaje y la memoria (de Kloet et al., 2010; Morales & Estañ, 2010). No obstante, ahora se conoce que diversos tejidos como los vasos sanguíneos, riñón, corazón y cerebro son capaces también de generar AGII en forma local a través de vías que no dependen de la ECA (vías no-ECA) como la vía de la quimasa, carboxipeptidasa, catepsina G, (teniendo como sustrato la angiotensina I) y/o a través de la vía de catepsina, tonina y activador del plasminógeno (teniendo como sustrato el angiotensinógeno) (Santeliz et al., 2008).

El receptor AT1 confiere la mayoría de las acciones clásicas del péptido, tales como la vasoconstricción, la liberación de aldosterona de la zona glomerulosa suprarrenal, la retención de sal en los túbulos proximales renales, y la estimulación del sistema nervioso simpático a través de receptores en el cerebro (Bader & Ganten, 2008). En cambio, los receptores AT2 median la vasodilatación, la liberación de óxido nítrico (NO) y por lo general, la inhibición del crecimiento celular (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008).

2.7 Papel del sistema calicreína-cinina (SCC) sobre la presión arterial

Los elementos básicos del SCC fueron descritos por primera vez por Werle en 1937 (Levinsky, 1979), éste sistema juega un papel clave en la regulación de la presión sanguínea y el sodio corporal, y ha sido implicado en la patogénesis de la sensibilidad a la sal. En el SCC, las cininas, que se derivan por acción enzimática de la calicreína sobre el cininógeno, causan vasodilatación, diuresis y natriuresis (Gu et al., 2012).

En 1926, Frey y Kraut realizaron trabajos con una sustancia vasodilatadora extraída de la orina, describiendo que era de origen pancreático, la cual llamaron calicreína. Las calicreínas son un grupo heterogéneo de proteasas de serina que se producen en el plasma, así como en varios tejidos, tales como el páncreas, riñón, intestino delgado y las glándulas salivales (Hillmeister & Persson, 2012). Gracias a investigaciones posteriores, ahora se sabe que la calicreína es el elemento iniciador del sistema calicreína-cinina, escindiendo el cininógeno para liberar cininas, entre las cuales, la bradicinina, es el nonapéptido mejor conocido (Bader, 2009).

Se han identificado dos receptores de membrana para la bradicinina que median el efecto de las cininas: el receptor B1, cuya expresión es muy baja en condiciones fisiológicas y que es inducido ante un daño tisular, y el receptor B2, que algunos autores han considerado como constitutivo. Este conjunto de moléculas (calicreína, cininógeno, cininas y receptores, como se muestra en la figura 3) comprende el SCC (Hillmeister & Persson, 2012). La interacción de la bradicinina con su receptor produce una serie de efectos entre los que se incluyen vasodilatación, inflamación, relajación y contracción de músculo esquelético y la génesis del dolor (Velarde, 2002).

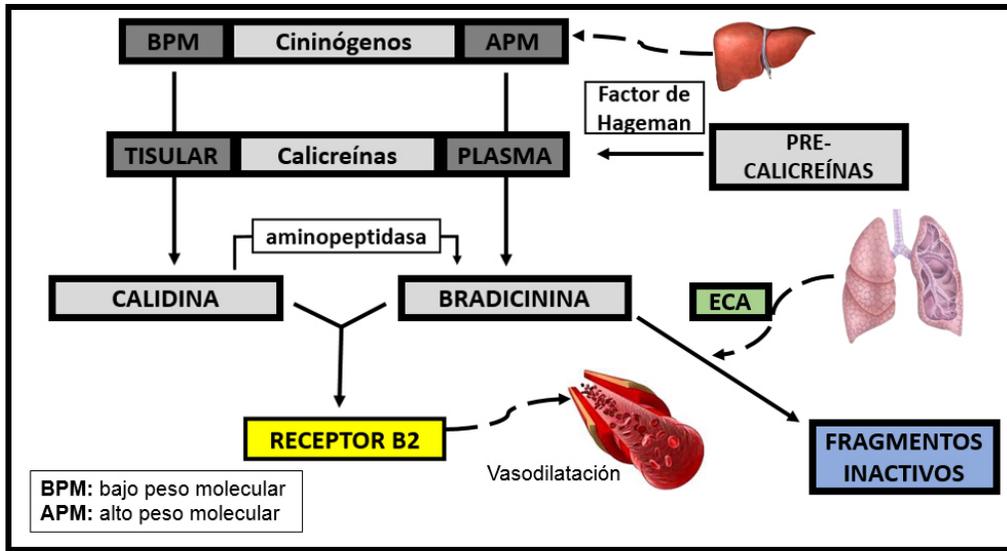
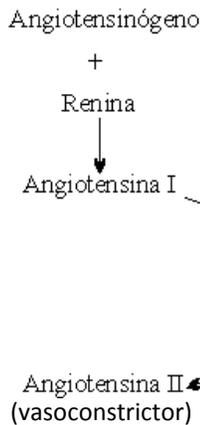


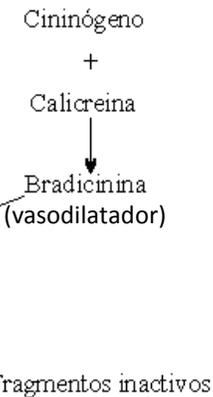
Figura 3. Sistema caliceína-cinina, efecto de la ECA sobre la bradicinina.
 Adaptado de Medina, 2014.

La participación de la ECA en los procesos de la regulación de la presión arterial es de relevancia por la función que ejerce dentro de los sistemas renina angiotensina y el sistema caliceína-cinina.

Sistema renina angiotensina



Sistema caliceína cininas



**ECA =
 Cininasa II**

Figura 4. Sistemas renina-angiotensina y caliceína-cininas, efecto de la ECA sobre sus sustratos. Adaptado de García & Toruncha, 1997 (García & Toruncha, 1997).

2.8 Papel del óxido nítrico sobre la presión arterial

El óxido nítrico (ON) es una molécula muy versátil que actúa como un mensajero intracelular y transcelular; de ella se empezó a hablar en 1980, gracias

a los estudios realizados por Furchgott y Zawadzki quienes inicialmente la denominaron factor relajante del endotelio, actualmente se sabe que interviene en diferentes procesos fisiológicos y patológicos (Benavides & Pinzón, 2008).

Existen por lo menos tres isoformas de la ONS que son capaces de reaccionar con formas reactivas del oxígeno y moléculas biológicas para formar una gran cantidad de productos finales (Gorocica et al., 1999).

Las primeras evidencias del rol del óxido nítrico (ON) como un compuesto biológicamente activo provienen de estudios en el músculo liso vascular, en los cuales se demostró que actúa como un factor relajante. Posteriormente se describieron acciones de este compuesto en el músculo esquelético y cardíaco. El ON es un radical libre gaseoso que es sintetizado *in vivo* por una familia de enzimas denominadas ON sintasas (ONS). Estas enzimas catalizan la reacción entre el aminoácido L-arginina y el oxígeno produciendo ON y L-citrulina (Vila, 2000).

El ON tiene vida media y acción biológica muy cortas, ya que es rápidamente oxidado a nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). La cantidad de ON producida está estrechamente relacionada a algunos eventos biológicos como la función cardíaca, la presión arterial, el funcionamiento neuronal, entre otras (Gorocica et al., 1999).

El ON producido por el endotelio vascular es responsable de la respuesta vasodilatadora esencial para la regulación de la presión arterial. Tiene efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria, además de que protege contra la hipoxia pulmonar y participa en el control de la circulación colateral (Gorocica et al., 1999).

La mayor parte del ON en el corazón es producido por las células del endotelio vascular, y su liberación sustenta primariamente una función autorregulatoria al promover la relajación del músculo liso vascular y, en consecuencia, modulando el tono y el flujo coronario. Recientemente ha sido demostrada la liberación de ON desde las células endoteliales cardíacas (endocardio) y su producción por los propios miocitos cardíacos (Vila, 2000).

Cambios en la viscosidad sanguínea producen estímulos sobre la pared vascular que inducen la producción de ON gracias a la acción de la óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe), por activación de canales iónicos que permiten un aumento de las concentraciones de calcio intracelular. Se ha demostrado una vía de activación de su síntesis independiente de la concentración del calcio, al activar la proteína serina/treonina cinasa que fosforila y activa la ONSe, incrementando hasta seis veces su concentración después de una hora de exposición del endotelio al estrés hemodinámico (Benavides & Pinzón, 2008).

Las características fisicoquímicas del ON favorecen diversas reacciones bioquímicas, por lo cual puede modular una gran cantidad de procesos positivos o negativos para el organismo, de los cuales algunos son dependientes y otros independientes de la guanilato ciclasa. Una función primaria del ON es activar a la enzima guanilato ciclasa soluble para incrementar los niveles de GMPc en algunos sistemas incluyendo el vascular y el nervioso. La acción del ON también puede ser totalmente independiente de la activación de la guanilato ciclasa (Gorocica et al., 1999). El ON aumenta la concentración de GMPc en las células musculares lisas a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa citoplasmática e inhibe la entrada de calcio y la liberación intracelular del mismo a las células musculares lisas, por lo cual se produce una disminución del calcio citosólico libre (antagonista del calcio endógeno), además, el aumento del GMPc activa proteínas quinasas, las cuales a través de fosforilaciones de proteínas producen por ambas vías relajación muscular y vasodilatación (Leiva et al., 2000).

2.9 Inhibidores de la ECA I

En 1979 fueron aislados por primera vez unos péptidos inhibidores de la ECA a partir de un hidrolizado de gelatina obtenido con colagenasa. Desde entonces han sido encontrados en proteínas de leche, y conocidos como casoquininas (Vioque et al., 2000).

Los inhibidores de la ECA (IECAs) como fármaco para la regulación de la PA son bien tolerados y muy efectivos, pueden ser el tratamiento de primera elección

en situaciones como HTA vascularrenal (a excepción de la causada por estenosis bilateral de arterias renales, o unilateral sobre riñón único), diabetes mellitus o disfunción ventricular izquierda asociada (Reverte et al., 1998).

Los bloquean específicamente el SRA. Según el grupo químico que interactúa con el zinc de la ECA, estos agentes se clasifican como:

- Compuestos sulfidrílicos - captopril
- Compuestos carboxílicos - enalapril
- Compuestos fosfóricos - fosinopril/ceranapril

Hay mecanismos diferentes entre los IECAs que dependen de su estructura química, por lo cual tienen diferentes acciones clínicas y no son intercambiables. Los IECAs inhiben la ECA que hidroliza la angiotensina I (relativamente inactiva) en angiotensina II (activa), bloqueando la producción de ésta última, como resultado de la unión directa del grupo funcional de los IECAs (sulfhidrido, carboxilo o fosforilo) con el sitio del ión zinc de la enzima; disminuyen la producción de AGII. Estos fármacos son altamente selectivos, no interactúan directamente con otros componentes del SRA (Pascuzzo-Lima, 2008).

La inhibición de la ECA se materializa mediante la unión de un grupo químico, característico en cada caso, con el átomo de Zn^{2+} de la ECA, formándose un complejo de inhibición que posteriormente se disocia. Las características de este proceso van a determinar en gran medida la duración de acción de los distintos fármacos, la dosis y pauta posológica empleadas. La inhibición de la ECA provoca una disminución de los niveles plasmáticos de angiotensina II y aldosterona, por ende, una supresión de las acciones vasculares e hidroelectrolíticas de la angiotensina II y la aldosterona, respectivamente (Fernández & Gallego, 1995).

En adición, los IECA previenen la degradación de bradicininas (sustancias vasodilatadoras) por inhibición de la cininasa II (una enzima que inactiva la bradicinina), como resultado, los niveles de bradicinina se incrementan, conduciendo a la síntesis de varias prostaglandinas (las cuales también actúan

como vasodilatadoras). Por lo que, los inhibidores de ECA tienen una acción combinada disminuyendo la generación de angiotensina II e incrementando los niveles de bradicinina y varias prostaglandinas. Los distintos inhibidores de ECA difieren en la duración de acción y modo de eliminación, por lo tanto, en su frecuencia de administración. Ellos producen algún grado de natriuresis y retención de potasio como resultado de la disminución de la secreción de aldosterona. La presión sanguínea disminuye debido al efecto vasodilatador y reducción de la resistencia periférica. El gasto cardíaco no se afecta a pesar de la reducción de la presión arterial y usualmente hay un ligero incremento en la frecuencia cardíaca (Espinoza & Castillo, 1997). En resumen, los Inhibidores de ECA actúan a través de un doble mecanismo: reduciendo los agentes hipertensivos y aumentando los vasodilatadores.

Cuando se reduce la formación de angiotensina II, se obtiene acumulación de bradicinina, un potente vasodilatador que causa liberación de óxido nítrico y prostaciclina del endotelio vascular, lo cual tiene efectos benéficos sobre endotelio y corazón. Es precisamente el tratamiento con inhibidores de la ECA lo que permite restablecer la función endotelial a través de los mecanismos anteriormente señalados (Trevethan, 2001).

2.10 Fuentes naturales de IECAs

El concepto de "productos saludables" incluye lo que se conoce como "alimentos funcionales"; éstos se definen como los alimentos que se utilizan para prevenir y tratar ciertos trastornos y enfermedades, además de su valor nutricional "per se" (Jiménez-Colmenero et al., 2001).

Los alimentos funcionales podrían definirse como "cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona" (Chasquibol et al., 2003; Rivera et al., 2010).

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en Japón durante la década de los '80 (Granato et al., 2010; Millone et al., 2011) como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población cada vez mayor en edad, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición (Chasquibol et al., 2003).

Sin embargo, de acuerdo con la definición aceptada por el resto del mundo, "alimento funcional" es acuñado para describir alimentos o nutrientes cuya ingestión conduce a importantes cambios fisiológicos en el cuerpo que son separados y distintos para aquellos asociados con sus roles como nutrientes (Granato et al., 2010). Se entiende como alimentos funcionales a los componentes integrales de la dieta que sirven para contribuir adicionando beneficios a la salud y son sujeto de búsqueda extensa e intensa en prevención de enfermedades (Zeng et al., 2012).

El Instituto Nacional de Ciencias de la Vida (ILSI) establece que se puede considerar que un alimento es funcional si se logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, que mejora el estado de salud y de bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad (Margaret, 2004).

En Japón se estableció que los "alimentos funcionales" deben poseer las siguientes características:

1. Alimentos a base de ingredientes naturales.
2. Alimentos que deben consumirse como parte de la dieta diaria.
3. Alimentos, que al consumirse cumplen un papel específico en las funciones del cuerpo humano como: mejoramiento de los mecanismos de defensa biológica, prevención o recuperación de alguna enfermedad específica, control de las condiciones físicas y mentales, y retardo en el proceso de envejecimiento (Chasquibol et al., 2003).

2.11 Compuestos bioactivos y biomarcadores

Todos los alimentos son funcionales en algún nivel fisiológico, debido a que proporcionan nutrientes u otras sustancias que proporcionan energía, sostienen el crecimiento, o mantienen/reparan procesos vitales. Sin embargo, los alimentos funcionales aportan más allá de esas necesidades, proporcionando beneficios adicionales a la salud que pueden reducir el riesgo de enfermedades y/o promover una salud óptima. En los alimentos funcionales se incluyen alimentos convencionales, alimentos modificados (fortificados, enriquecidos, o mejorados), alimentos medicinales, y alimentos para uso dietético especial (Granato et al., 2010).

La aceptación de estos alimentos se relaciona con diversos factores: gusto, calidad, precio, comodidad, familiaridad con el producto, naturaleza de la compañía oferente, forma de comunicar los efectos en la salud y de los conocimientos y conciencia que se tengan sobre los mismos; reflejando la importancia y necesidad de comunicar e informar a los consumidores con mensajes sencillos, claros y de fácil comprensión (Millone et al., 2011).

Las sustancias nutracéuticas (cualquier alimento o ingrediente de los elementos que ejercen acción benéfica en la salud) con valor comercial pueden ser obtenidas de alimentos funcionales que han demostrado un beneficio fisiológico o son capaces de promover alguna clase de protección contra una enfermedad crónica o infecciosa (Rivera et al., 2010).

A diferencia de los agentes farmacéuticos, que para demostrar su eficacia se requiere tiempo y es costoso, ya que en general, se debe disponer de puntos finales claros para establecer el efecto (eliminación de la enfermedad, restauración de la función corporal, etc.); para probar la eficacia de los alimentos funcionales es necesario basarse en parámetros no definidos entre la exposición y la enfermedad o la salud que se pueden denominar "marcadores" o "biomarcadores", los cuales pueden subdividirse en biomarcadores de: (1) exposición; (2) efecto y (3) susceptibilidad (Verhagen et al., 2004).

El término biomarcador ha sido adaptado de la epidemiología molecular por los biólogos de radicales libres para describir un cambio en una molécula biológica que ha surgido del ataque de especies reactivas de oxígeno, nitrógeno o haluro. Se aplica igualmente a productos derivados de lípidos, DNA, proteínas y consumo de antioxidantes (Griffiths et al., 2002).

La epidemiología nutricional se centra en la comprensión de la relación entre la dieta y el riesgo de enfermedad. La evaluación de la exposición dietética y nutricional es un desafío metodológico complejo. Tradicionalmente, las evaluaciones de la dieta se han hecho por medio de datos dietéticos, tales como recordatorios de 24 horas y frecuencia de alimentos o cuestionarios de la historia de la dieta; sin embargo, todos estos métodos tienen algunas debilidades o limitaciones inherentes debido a la precisión limitada en la medición de la ingesta de alimentos, nutrientes o fitoquímicos. Hoy en día, los biomarcadores nutricionales se han convertido en un enfoque alternativo atractivo (Andres-Lacueva & Zamora-Ros, 2010).

De acuerdo con la definición convencional, un biomarcador nutricional puede ser cualquier espécimen biológico que sea un indicador del estado nutricional con respecto a la ingesta o metabolismo de los constituyentes de la dieta. Puede ser un índice bioquímico, funcional o clínico del estado de un nutriente esencial u otros componentes dietéticos. Los biomarcadores nutricionales suelen ser componentes externos, como componentes alimenticios u otras sustancias externas metabolizadas por el organismo (metabolitos), analizadas en las muestras biológicas de los participantes y utilizadas para determinar su exposición a la ingesta de un alimento (alimento o grupo de alimentos específicos) o componente (nutriente o no nutriente) (Andres-Lacueva & Zamora-Ros, 2010).

Además, los alimentos, como las frutas, las verduras, el vino tinto y el café, suelen ser mezclas complejas de una gran diversidad de moléculas, nutrientes y no nutrientes, presentes accidentalmente o intencionalmente, todos con potenciales efectos metabólicos. Por lo tanto, el análisis a largo plazo de los

ingredientes bioactivos es un tema que exige el desarrollo de metodologías analíticas robustas, eficientes, sensibles y rentables (Puiggròs et al., 2011).

2.12 Inhibidores naturales de la ECA I

El principal objetivo del tratamiento de la hipertensión es reducir la alta morbi-mortalidad, así como reducir la presión arterial. Un importante objetivo del tratamiento es controlar otros factores de riesgo para enfermedad cardiovascular. El estilo de vida brinda el potencial para prevenir la hipertensión, mostrando ser efectiva en disminuir la presión sanguínea, para reducir otros factores de riesgo para enfermedad cardiovascular a un bajo costo y un riesgo mínimo. Incluso si la modificación del estilo de vida por sí sola no es suficiente para el control de la hipertensión, puede aminorar el número y dosis de medicamentos antihipertensivos necesarios para el manejo de la condición (Barbosa-Filho et al., 2006).

Reducir la presión sanguínea con fármacos disminuye claramente la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular. La protección ha sido demostrada para accidentes cerebrovasculares, eventos coronarios, falla cardíaca, progresión de enfermedad renal y progresión para hipertensión más severa. Existe una gran cantidad de alternativas disponibles para el tratamiento de la hipertensión arterial, tanto en esquemas de monoterapia y/o combinación de terapias. La eficacia, seguridad y efectos de los diferentes fármacos son un criterio fundamental para ser considerados en la elección del esquema para el tratamiento antihipertensivo en cada paciente (Barbosa-Filho et al., 2006).

La inhibición de la ECA se considera un enfoque terapéutico útil en el tratamiento de la presión arterial alta, tanto en pacientes diabéticos y no diabéticos (Apostolidis et al., 2007). La búsqueda de inhibidores no tóxicos de la ECA es de gran interés entre los investigadores y muchos inhibidores naturales de la ECA han sido aislados de alimentos funcionales y biorecursos naturales (Sang-Hoon et al., 2010).

2.12.1 Péptidos bioactivos

Los péptidos derivados de alimentos funcionales son considerados más suaves y seguros comparados con fármacos sintéticos. Además, estos péptidos usualmente tienen propiedades multifuncionales y son fáciles de absorber. Los péptidos bioactivos, que son inactivos dentro de la secuencia de la proteína parental, podrían ser liberados por hidrólisis enzimática y exhibir varios efectos regulatorios tal como antioxidantes, defensa inmune, opioide y actividad antihipertensiva (Sang-Hoon et al., 2010).

Diversos estudios en ratas espontáneamente hipertensas sugieren una significativa supresión de la hipertensión con una dieta rica en péptidos inhibidores de la ECA derivados de especies marinas (Sang-Hoon et al., 2010). Algunos péptidos inhibidores de la ECA han sido aislados de diversas proteínas marinas como el heshiko, también de músculo de atún listado, músculo de sardina, carne de tiburón, piel de abadejo de Alaska, camarones marinos, merluza del Pacífico, salmón chum, gelatina de piel de abadejo de Alaska, musculo oscuro de atún patudo, ostras y limandas (Wilson et al., 2011).

Otros péptidos inhibidores de la ECA han sido identificados en hidrolizados enzimáticos de varias fuentes tales como suero de leche, gelatina de piel bovina (Sang-Hoon et al., 2010). También se han aislado péptidos bioactivos de proteínas de soya y pechuga de pollo, ajo y vino. Por otra parte, se han encontrado huevos que contienen estos compuestos (péptidos bioactivos) con funciones antihipertensivas tales como la ovocinina, derivadas de un digerido enzimático de la ovoalbúmina. Además, se ha encontrado que las papas y sus productos derivados/desechos contienen una alta potencia inhibitoria de la ECA I posterior a una hidrólisis controlada (Wilson et al., 2011).

2.12.2 Compuestos fenólicos

Diversos estudios indican que los alimentos y plantas ricos en compuestos fenólicos también tienen la capacidad de inhibir la actividad de la ECA, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto abre la posibilidad de que el consumo de alimentos ricos

en compuestos fenólicos puede imitar a los IECAs sintéticos y proporcionar beneficios para la salud, pero sin efectos secundarios adversos. Los metabolitos fenólicos secundarios son sintetizados por las plantas con el fin de protegerse de las tensiones biológicas y ambientales, y forman una parte importante de las dietas humanas y animales. Algunos estudios han demostrado que los fitoquímicos fenólicos tienen una alta actividad antioxidante y ciertas propiedades terapéuticas, incluyendo la actividad antidiabética y antihipertensiva, se pueden obtener a través de plantas, especias, frutas, y verduras (Apostolidis et al., 2007).

En estudios previos se ha demostrado que la administración de extractos de diversas plantas de la familia de las salvias produce una reducción de los niveles de presión arterial en ratas con hipertensión. Entre estas plantas se encuentra la *Salvia scutellarioides*, de la cual, una fracción de extracto de tallos obtenida con acetato de etilo mostró capacidad inhibitoria de la ECA; de esta fracción fueron identificados metabolitos como taninos, glicósidos cardiotónicos, cumarinas y quinonas, posibles responsables de este efecto inhibitorio (Arenas-Carvajal et al., 2009).

En otro estudio, la administración de *Salvia scutellarioides* en una dosis de 2 g/kg de peso en ratas con hipertensión, produjo una reducción significativa de la presión arterial diastólica y sistólica en comparación con el grupo sin tratamiento. En el mismo estudio, el tratamiento con la salvia mostró una reducción de la presión tanto diastólica como sistólica comparable con el grupo control que recibió enalapril a 25 mg/kg (Ramírez et al., 2006).

González (2011) estudió el efecto de un extracto metanólico de semilla de *Salvia hispánica* L. en un modelo de ratas con hipertensión inducida por L-NAME., después de 3 semanas de administrar el extracto, las ratas mostraron una disminución entre 8.1 y 16.7 % en los valores de PAS en comparación con las ratas que no recibieron tratamiento. El análisis *in vitro* del extracto, también mostro inhibir la ECA con un IC50 de 63 µg/ml.

2.13 *Salvia hispánica* L.

2.13.1 Generalidades

La *Salvia hispanica* L. es un importante material crudo para la obtención de alimentos funcionales debido a sus características especiales y ofrece ventajas sobre las fuentes disponibles de ácidos grasos ω -3 (Ixtaina et al., 2008).

Las semillas de la especie *Salvia hispánica* L. es comúnmente conocida como “chía”, “chía salvia” o “salvia española” (Reyes-Caudillo et al., 2008). El término “chía” o “chan” es un vocablo náhuatl que agrupa varias especies botánicas de los géneros *Salvia*, *hyptis*, *amaranthus* y *chenopodium*; su cultivo y utilización fueron considerados por Kirchhoff (1960) como un elemento esencial de la cultura mesoamericana. La *Salvia hispánica* L., una especie de ese grupo. es una planta herbácea anual de la familia Lamiaceae, nativa del sur de México y norte de Guatemala, ha sido cultivada en regiones desde tropicales hasta subtropicales (Ixtaina et al., 2008; Peiretti & Gai, 2009).

Se encuentra en áreas de bosque de encino o de pino-encino y se distribuye en ambientes semicálidos y templados del Eje Neovolcánico Transversal, de las Sierras Madre Occidental y Sur, y de Chiapas en altitudes entre 1400 y 2200 m sobre el nivel del mar (Hernández & Miranda, 2008). El género *Salvia* consiste en cerca de 900 especies, algunas de ellas cultivadas y usados alrededor del mundo en aromatizantes y medicina tradicional. Estos géneros han sido objeto de numerosos estudios químicos que describen el aislamiento de diterpenoides, tanshinonas y polifenoles de diferentes partes de la planta (Reyes-Caudillo et al., 2008).

La planta es sensible a la luz del día y produce pequeñas semillas blancas y oscuras, su forma es ovalada y miden alrededor de 2 × 1.5 mm. La mayor población de chía que se cultiva actualmente contiene un bajo porcentaje de semilla blanca. Este tipo de semilla proviene de las plantas que sólo producen flor y semilla blanca, que son codificadas por un gen recesivo (Ixtaina et al., 2008).

En la época prehispánica fue una planta importante y sus semillas, harina o su aceite fueron apreciados por sus usos medicinales, alimenticios, artísticos y religiosos. Eran un alimento básico importante, fuente de aceite y sustancias terapéuticas para los mesoamericanos en los tiempos precolombinos. Las semillas tostadas y molidas se comían como atole y el aceite se utilizaba como un emoliente y barniz de cerámica (Reyes-Caudillo et al., 2008).

La semilla de chía era antiguamente usada por las tribus aztecas. De aquí su importancia no sólo como alimento, sino también como medicamento y pintura. Esta semilla es consumida tradicionalmente en México y el suroeste de Estados Unidos y en una menor extensión en Sudamérica; aunque no es ampliamente conocida en Europa (Ixtaina et al., 2008). Debido a que su denominación es en lengua indígena y a que existen descripciones precisas de sus formas de uso, es probable que el conocimiento y la domesticación de estas plantas se remonte a una etapa previa a la época prehispánica (Hernández & Miranda, 2008).

Las propiedades curativas de las semillas eran también apreciadas, por ejemplo, para el tratamiento de la obstrucción de ojos, infecciones y malestares respiratorios. Las semillas remojadas en agua de jugo de frutas eran y actualmente siguen siendo consumidas en algunas regiones en la preparación de una bebida nutritiva y refrescante; con el aceite extraído de sus cotiledones se elaboran lacas artesanales (Reyes-Caudillo et al., 2008). Los factores predominantes que influyen la diversidad genética en la chía son los atributos biológicos de las especies y los patrones geográficos, así como la selección humana (Cahill, 2004). Su mayor diversidad genética se presenta en la vertiente del Océano Pacífico (Hernández & Miranda, 2008).

2.13.2 Presencia de compuestos fenólicos

Los residuos del proceso de extracción de aceite de semillas oleaginosas contienen compuestos fenólicos con actividad antioxidante, éstos compuestos fenólicos funcionan como antioxidantes naturales para grasas y aceites (Reyes-Caudillo y cols, 2008). La semilla de chía contiene algunos componentes como la

miricetina, quercetina, kaempferol y ácido cafeico, compuestos con potente actividad antioxidante, sin contener factores tóxicos (Peiretti & Gai, 2009). La actividad antioxidante de extractos de diferentes plantas es particular al tipo y concentración de los compuestos fenólicos que contienen (Reyes-Caudillo et al., 2008).

Los antioxidantes naturales del aceite de chía evitan los procesos oxidativos en alimentos (Taga et al., 1984); el mucílago de la testa de la semilla de chía es un polisacárido útil como fibra soluble y dietética (Hernández & Miranda, 2008). La presencia de ácido cinámico, clorogénico y cafeico, junto con los flavonoides, miricetina, quercetina y kaempferol en los extractos también han sido reportados (Reyes-Caudillo et al., 2008).

2.13.3 *Salvia hispánica* L. e hipertensión

El extracto metanólico de la semilla *Salvia hispánica* L. ha mostrado que posee compuestos químicos con efecto de inhibición de la ECA *in vitro*, y su administración a ratas con hipertensión produjo un efecto hipotensor *in vivo*, además de no mostrar efectos tóxicos a nivel hepático y renal; se identificaron como posibles responsables del efecto a los glucósidos de terpenos y glucósidos unidos a compuestos fenólicos (González, 2011).

La administración de extracto metanólico de semillas de chía en anillos aórticos de rata en estudios de órgano aislado mostró diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje promedio de la relajación inducida por el extracto y disminución de la contracción máxima cuando se administraba adrenalina conjuntamente con el extracto, comparado con la contracción máxima de adrenalina. Además, se encontró un elevado contenido de flavonoides en el extracto (14.6 % de quercetina) (Mota, 2012).

Sin aún tener identificada una vía específica por la cual se lleva a cabo el efecto hipotensor por la administración de extractos de chía, se han propuesto posibles mecanismos de regulación de la presión arterial basados en los estudios

previos, entre los cuales se encuentran la inhibición enzimática, degradación de enzimas claves, efecto sobre los sustratos y regulación de la expresión génica.

2.14 Expresión génica

Los cuatro procesos celulares fundamentales implicados en la expresión génica son la transcripción, la degradación del RNAm, la traducción y la degradación de la proteína. Ahora está claro que cada paso de esta cascada es controlado por eventos de un gen regulador. Aunque cada proceso individual ha sido estudiado, no está totalmente dilucidado cómo el efecto combinado de todos los eventos reguladores conforma la expresión génica. Por tanto, la cuestión fundamental de cómo se procesa la información genómica en diferentes niveles para obtener un proteoma celular específico no es del todo claro (Schwanhausser et al., 2011).

Debido a la falta de esta información y para esclarecer los mecanismos específicos implicados, es necesario el estudio a fondo de cada uno de ellos, para así conocerlos en su totalidad. La expresión de ciertos genes está controlada por elementos de RNAm que forman receptores para metabolitos de destino. La fijación selectiva de un metabolito por un "riboswitch" como el RNAm, permite un cambio en la conformación de una estructura alternativa que finalmente resulta en la modulación de la síntesis de proteínas (Winkler et al., 2002).

Ya que con sólo la represión traduccional más ligera se observa la desestabilización del RNAm, es posible que la mayor parte de la síntesis de proteínas pudiera resultar afectada directamente, ocasionando una disminución en el contenido de proteínas (Djuranovic et al., 2012). Esta acción puede producir un cambio significativo en la producción de las proteínas y como consecuencia alterar la función específica de las mismas. En la última década, se han utilizado pruebas de alto rendimiento para medir las concentraciones de proteína y RNAm simultáneamente permitiendo estudios sistemáticos de la regulación de la expresión de la proteína a escala del proteoma (de Sousa et al., 2009).

2.14.1 Expresión génica e hipertensión

Existen pocos estudios sobre expresión génica en tratamientos hipertensivos. Fernández-Alfonso y cols. (1994) evaluaron la expresión de la ECA en un grupo de ratas con hipertensión (con respecto al grupo control: normal), y encontraron un aumento significativo en el contenido de RNAm de la ECA en arteria mesentérica.

Campbell y cols., en 2004, encontraron que la administración del IECA lisinopril en ratones genéticamente modificados produce cambios en los niveles de bradicininas en sangre, donde uno presentaba nula expresión de ECA (grupo identificado como ECA.1), y el otro sólo presentaba producción de ECA a nivel testicular (grupo identificado como ECA.4), estos fueron comparados con un grupo control sano. Se observaron marcadas reducciones en la proporción de la AGII/AGI indicaron que la ECA es responsable de al menos el 90 % de conversión de AGI en AGII en sangre, riñón, corazón, pulmón y cerebro, y al menos 77% en adrenal. Los niveles de bradicinina tipo 1-7 en sangre (forma activa) se incrementaron 3.2 veces en ratones ECA.4, y los niveles de bradicinina 1-9 (forma activa) se incrementaron 6.4 veces en ratones ECA.1, 8.2 veces en ratones ECA.4, y 8.4 veces en ratones tratados con lisinopril.

En 2010, Miguel-Carrasco y cols., encontraron un incremento significativo en la expresión del gen que codifica para la ECA y el receptor AT1 de angiotensina (1.6 y 3.4 veces, respectivamente) en un modelo de ratas hipertensas en comparación con ratas normotensas, estos parámetros se normalizaron después de la administración crónica de L-carnitina y captopril. Estos datos demuestran que algunos de los fármacos utilizados para el control de HTA no sólo actúan a nivel químico, sino que están ejerciendo un efecto a nivel molecular, lo que ayuda a mantener la estabilidad de los sistemas biológicos involucrados.

También se han realizado algunos estudios comparando la actividad biológica que ejercen algunas plantas en el control de la HTA. En un estudio realizado en 2007, Steinkamp-Fenske y cols., encontraron que tras la administración de un extracto acuoso y uno metanólico de *Salvia miltiorrhiza* L. en una línea celular

derivada de células endoteliales umbilicales humanas, se aumentó la actividad del promotor de ONSe, la expresión del gen que codifica para la proteína ONSe, así como la producción de ON endotelial, concluyendo que el constituyente(s) activo(s) de la *Salvia miltiorrhiza* responsable de la regulación positiva de ONSe son hidrofílicos y/o solubles en alcohol; uno de los compuestos fue identificado como ácido ursólico, el cual es un triterpeno pentacíclico común en la familia de las salvias.

En otro estudio realizado en el 2007 por Tang y cols., se evaluó el efecto de la tanshinona (TAN) IIA (derivado del fenantreno-quinona) en la regulación de la producción de endotelina (ET)-1, los niveles de RNAm de ET-1, la enzima convertidora de endotelina-1 (ECE-1), receptor A de endotelina (ETA) y en el receptor B de endotelina (ETB) inducida por TNF- α en las células endoteliales microvasculares de cerebro de rata (BMVEC); encontrando una respuesta dependiente de la liberación de ET-1 por la inducción de TNF- α y la TAN IIA, así como un aumento en la expresión de RNAm de ECE-1 dependiente de la dosis de TAN IIA.

You y cols. (2012) evaluaron los efectos del tratamiento con *Salvia miltiorrhiza* en el daño renal inducido por N(G)-nitro-D-arginine (D-NNA). Después de 12 semanas de administración, las ratas mostraron complicaciones relacionadas con estrés oxidativo y función renal. Después de 4 semanas de tratamiento con un extracto etanólico de *Salvia miltiorrhiza*, la actividad de SOD, GSH-Px, iNOS y la producción de ON fueron significativamente mayores; además, se mostró protección histopatológica en la dilatación tubular, congestión, infiltración de células mononucleares y desmoplasia intersticial.

III. HIPOTESIS

La administración de extracto etanólico de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) en un modelo de ratas con hipertensión modifica la expresión de los genes que codifican para la enzima convertidora de angiotensina I, el receptor AT1 de angiotensina, el receptor B2 de bradicinina y la óxido nítrico sintasa.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Analizar el efecto del extracto etanólico de semilla de chía (*Salvia hispanica* L.) sobre la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* y *Bdkrb2* en un modelo de ratas con hipertensión.

4.2 Específicos

- Caracterizar un extracto etanólico de semilla de chía *Salvia hispanica* L.
- Generar un modelo de ratas con hipertensión con la administración de L-NAME.
- Evaluar el efecto del extracto etanólico de semilla de *Salvia hispanica* L sobre la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* y *Bdkrb2*
- Comparar el efecto del EESH en la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* y *Bdkrb2* en ratas hipertensas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Estrategia general de trabajo

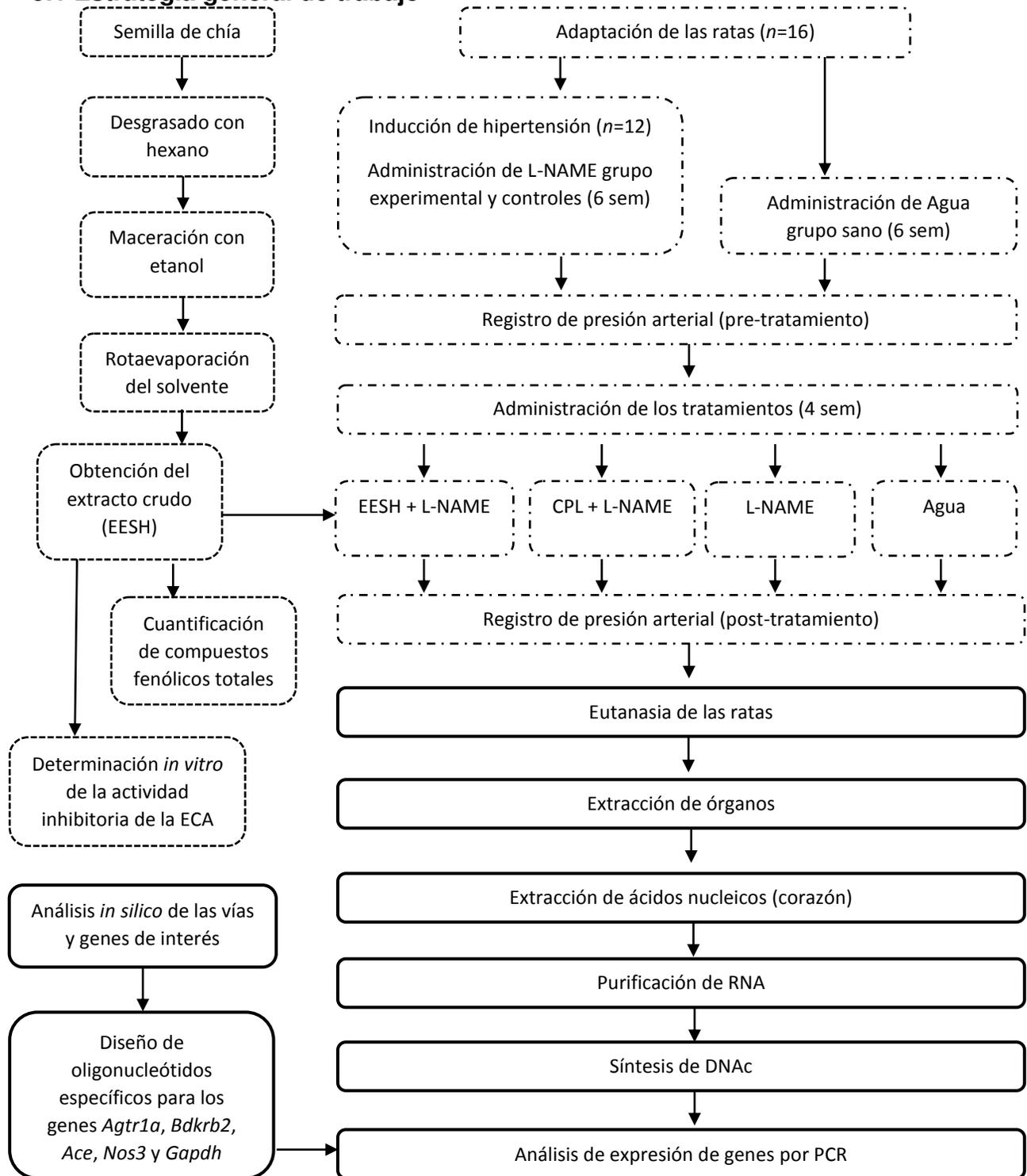


Figura 5. Fases de desarrollo del proceso experimental. Este trabajo se desarrolló en tres etapas que consistieron en: fase 1 (---), obtención del EESH y el análisis de la capacidad inhibidora de la ECA; fase 2 (---), desarrollo del bioensayo: administración de los diferentes tratamientos (L-NAME, CPL, EESH, Agua) en ratas con hipertensión; fase 3 (—), análisis de la expresión de genes involucrados en la regulación de la HTA en las ratas del bioensayo.

5.2 Material biológico

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó semilla de chía (*Salvia hispánica* L.) adquirida en Monterrey, N.L., y para el bioensayo se utilizaron 16 ratas macho adulto Wistar proporcionadas por el bieterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UANL.

5.3 Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo experimental.

El desarrollo del proyecto se desarrolló en los Laboratorios de Alimentos y Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL.

5.4 Obtención del extracto etanólico de semilla de *Salvia hispánica* L. (EESH)

La semilla de chía (*Salvia hispánica* L.) se pesó y secó en un horno (FELISA FE-292 D) a 60 °C durante 24 h. Posteriormente se trituró con un molino automático (IKA M20) por 1 min y el producto molido se almacenó en contenedores de vidrio sellados que se mantuvieron en un lugar fresco y seco hasta su uso (22°C).

Siguiendo el protocolo descrito por López & Ortega (2014), se pesaron 50 g de las semillas de chía (seca y molida) que se colocaron en frascos de 500 ml; para extraer los lípidos contenidos en la semilla, se agregaron 400 ml de hexano y se incubaron a 27 °C durante 24 h con agitación constante (Incubadora Shel Lab 1575) por 24 h. Posteriormente, el material se filtró utilizando embudos Büchner con filtro de papel (Whatman No. 1) de 47 mm. El material sólido recuperado se sometió a maceración en las condiciones descritas, pero en esta segunda maceración, el hexano se sustituyó por 250 ml de etanol y el tiempo de maceración se extendió a 72 h; el macerado se filtró nuevamente bajo las condiciones ya descritas, y el líquido obtenido (250 ml aproximadamente) se concentró con rotaevaporador (Hanhnevapor HS-2001) a 40 °C y 100 rpm hasta alcanzar un volumen de 10 ml. Posteriormente, el concentrado se mantuvo a 35

°C por 12 h en oscuridad en una incubadora con recirculación de aire (Shel Lab) para lograr la evaporación completa del solvente.

5.5 Análisis de los compuestos fenólicos del EESH

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se partió del EESH seco y se analizó el contenido de flavonoides y polifenoles totales como se describe a continuación.

5.5.1 Cuantificación de flavonoides totales del EESH

Para la cuantificación de flavonoides se siguió el método propuesto por Kostennikova (1983) con algunas modificaciones, el cual se describe a continuación:

Se pesaron 0.5 g de extracto etanólico seco en un vaso de 250 ml y se adicionaron 20 ml de ácido sulfúrico al 10 % y 20 ml de etanol al 50 % en agua destilada, la muestra se reflujo por 2 h en una placa de calentamiento (Thermo, HP130915Q) a 100°C. Transcurrido el tiempo, la muestra se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se filtró con un embudo Büchner y un filtro de fibra de vidrio de 125 mm de diámetro (Whatman). El residuo sólido obtenido se lavó con 30 ml de etanol al 50 %, y se sometió a evaporación en una placa de calentamiento hasta que el líquido se redujo a la mitad del volumen inicial. El líquido restante se enfrió en un baño de agua a 5 °C por 30 min y se filtró nuevamente; los residuos presentes en el papel filtro se recuperaron por lavados sucesivos con 4 porciones de 10 ml de agua destilada fría (10 a 15 °C). Posteriormente, el residuo que permaneció en el filtro se disolvió adicionando 70 ml de etanol al 96 % (en agua destilada y previamente calentado a 50 °C) y se aforó a volumen final de 100 ml con etanol al 96 %.

Como blanco para la reacción se sustituyó el EESH con 0.5 g de etanol al 50% y se sometió a las condiciones previamente descritas. Las absorbancias de las muestras de EESH y el blanco se determinaron a 258 nm en un espectrofotómetro (Thermo Evolution 300).

Como patrón de referencia se utilizó una solución que contenía 0.08 g de quercetina disuelta en 100 ml de etanol al 96 % (en agua destilada); de esta solución, se tomó 1 ml y se disolvió en 100 ml de etanol al 50 % (en agua destilada), obteniendo una concentración final de 264 nM de quercetina. Posteriormente, la dilución también fue sometida al tratamiento de reflujo con ácido sulfúrico y la absorbancia se midió a 258 nm. La ecuación empleada para determinar el contenido de flavonoides totales fue:

$$X = \frac{Am \times PR \times 5}{AR} \times 100$$

Donde: X corresponde al contenido de flavonoides totales; Am es la absorbancia de la muestra; PR se refiere al peso de la sustancia de referencia en gramos (quercetina) y AR es la absorbancia de la solución de quercetina. Los valores fueron sustituidos y expresados como % de quercetina.

5.5.2 Cuantificación de polifenoles totales

La cuantificación total de polifenoles se realizó siguiendo el método estandarizado 952.03 de la AOAC usando una curva de calibración de ácido gálico de 5 puntos de diferentes concentración (AOAC, 2000).

Para la preparación del estándar se pesó 1 mg de ácido gálico y se disolvió en 10 ml de agua destilada [0.1 mg/ml]. A partir de esta solución se tomaron alícuotas de 100, 200, 500, 1000, 1500 y 2000 μ l y se colocaron en matraces de aforación de 10 ml, a cada matraz se le agregaron 500 μ l de reactivo de Folin-Denis[®] (Fluka Analytical, SIGMA) y 1 ml de Na₂CO₃ al 20 % (en agua destilada). Los matraces se aforaron a un volumen final de 10 ml con agua destilada y se incubaron en oscuridad por 30 min. La concentración de polifenoles se cuantificó midiendo su absorbancia a 750 nm.

Para el análisis del EESH se realizó la reacción antes descrita, sustituyendo la solución de ácido gálico por una solución de 1 mg/ml de EESH. El análisis del EESH se realizó por triplicado.

5.6 Cuantificación de la actividad inhibitoria de la ECA I *in vitro*

Para determinar la capacidad inhibitoria del EESH sobre la actividad enzimática de la ECA, se tomó como referencia el método establecido por Wu y cols. (2002), la cual se fundamenta en la degradación del compuesto Hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL) por acción de la enzima convertidora de angiotensina I obteniendo como producto ácido hipúrico y la cuantificación de éste último.

Inicialmente se realizó una curva de calibración utilizando ácido hipúrico como estándar disuelto en buffer de boratos en concentraciones de 25 a 100 μM a fin de cuantificar el producto de la reacción enzimática.

Para el análisis del EESH se utilizaron soluciones de: ECA I aislada de pulmón de conejo ([40 mU]; Sigma), HHL ([2mM]; Sigma) y EESH (25, 50, 75, 100, 150 y 200 mg/ml); éstas se disolvieron con 1 ml de buffer de boratos ([100 mM]; Sigma) con NaCl (300 mM) ajustado a pH 8.3 y se incubaron a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, en cada una de las muestras se siguió el siguiente proceso: en un tubo de 1.5 ml, se mezclaron volúmenes de 10 μl de una solución de EESH, 10 μl de una solución de ECA I (40 mU), 40 μl de una solución de HHL (2 mM) y se incubaron a 37 °C con agitación a 300 rpm durante 60 min. Para inactivar la reacción, se agregaron 50 μl de una solución de HCl (2 N) y la mezcla se filtró con un acrodisco de 45 μm de poro; el contenido de ácido hipúrico producto de la reacción se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Bajo las mismas condiciones, se realizó una curva dosis-respuesta utilizando captopril como agente inhibitor de la ECA en incrementos de concentraciones de 5 a 100 nM. En ambos procesos, como control negativo se preparó una reacción sustituyendo la solución de captopril y EESH por buffer de boratos, y se utilizó una reacción sin ECA como blanco.

Las condiciones para el análisis del ácido hipúrico por HPLC fueron tomadas del método descrito por Eriz y cols. (2011) empleando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución equipado con detector de UV/Vis (Thermo Scientific,

Spectra System); la absorbancia de las muestras se midió a 228 nm. Como fase estacionaria se utilizó una columna Synchronis C-18RP (150 mm x 4.6 mm; 5 µm; Restek), y como fase móvil se utilizaron: (A) una solución de ácido trifluoracético al 0.05 % en agua desionizada (previamente tratada con una resistividad de 18.2 Ω a 25 °C en un equipo de ultrapurificación (Millipore Simplicity) y (B) una solución de ácido trifluoracético al 0.05 % en acetonitrilo (TEDIA). Se siguió una elución isocrática de la fase móvil de 75 % de solución A y 25 % de solución B con un flujo de 0.70 ml/min. Para el análisis se inyectaron 20 µl de cada una de las muestras.

5.6.1 Determinación de la concentración inhibitoria máxima media (IC50)

La determinación de la IC50 se realizó mediante la transformación logarítmica de los valores de inhibición de la ECA obtenidos de la curva dosis-respuesta del EESH y el captopril. La IC50 se obtuvo mediante el programa computacional ED50plus v1.0.

5.7 Bioensayo

Para el bioensayo se utilizaron 16 ratas Wistar machos de 8 semanas de edad con peso de 250 a 300 g que se distribuyeron en grupos de 4 animales por jaula para su manipulación bajo las condiciones estándares del bioterio: humedad relativa entre 40 y 70 %, temperatura ambiental de 20 a 22 °C, 12 h de luz artificial y 12 h de oscuridad, y consumo de alimento *ad libitum*. El bioensayo se dividió en dos etapas experimentales: la etapa 1 o pre-tratamiento que consistió en la inducción de la hipertensión a 12 ratas (3 grupos de 4 animales), y la etapa 2 en la que se administraron los diferentes tratamientos (tabla 2).

5.7.1 Inducción de la hipertensión (Semana 0-6)

A las ratas se les indujo la hipertensión con la administración diaria del agente N-nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME, Sigma) a dosis de 40 mg/kg/día por vía oral, durante 6 semanas consecutivas. El L-NAME se administró en solución con agua destilada estéril hasta que la presión arterial alcanzó valores superiores a los mostrados por las ratas del grupo Sano (ratas sin hipertensión), las cuales recibieron agua destilada.

La administración del L-NAME se realizó por vía oral a cada animal, el cual se sostuvo firmemente, manteniendo extendidos la cabeza y el cuello en línea recta con el dorso, se colocó un abatelenguas en el hocico del animal y a través de éste, con movimientos circulares, se introdujo una sonda plástica flexible incorporada a una jeringa de 5 cc; una vez administrado el L-NAME, se retiró la sonda y las ratas se colocaron en las jaulas correspondientes (Machholz et al., 2012)

5.7.2 Medición de la presión arterial en las ratas

Para medir la presión arterial, se sedaron previamente para garantizar su inmovilidad y evitar señales de distorsión en las lecturas de la presión arterial sistólica (PAS). Para sedar a las ratas se utilizó xilazina de 10 mg/ml como agente sedante disociativo y ketamina de 100 mg/ml como anestésico general; las dosis fueron calculadas con respecto al peso corporal de las ratas y se administraron por vía intraperitoneal con jeringas de 1 cc. Una vez que la rata permanecía inmóvil (3 min después de la administración de los sedantes), se colocó en la cola del animal el transductor de señal y el manguito de goma del tensiómetro para registrar las pulsaciones cardiacas y los valores de presión arterial.

La presión arterial sistólica (PAS) se midió con un equipo de toma de presión arterial no invasivo (NIBP por sus siglas en inglés) ADInstruments y un tensiómetro de cola con un transductor conectado a un amplificador de pulsos. El controlador NIBP se conecta directamente a un sistema PowerLab (ML 125) que permite seleccionar los rangos de pulso e inflar y desinflar el manguito de goma automáticamente. Las señales análogas de presión y pulso se digitalizaron utilizando el software LabChart 7 (figura 6).



Figura 6. Ejemplo de registro de presión arterial en ratas. En la parte superior de la imagen se muestra la frecuencia cardiaca de la rata, y en la parte inferior se muestra el registro de PAS.

Se realizaron mediciones de la presión arterial a los animales en la semana 6 y 10 del bioensayo, periodo correspondiente al inicio y final de la administración de los diferentes tratamientos. La medición de la presión arterial se realizó por triplicado a cada animal con un rango de 2 h de diferencia entre cada medición; las ratas fueron consideradas hipertensas cuando presentaron cifras de presión arterial mayores a 140 mmHg (González, 2011).

Para el análisis de los datos de presión arterial se aplicaron pruebas de estadística descriptiva determinando las medias de presión arterial (PA) por rata. Posteriormente, en base a los valores de presión arterial inicial obtenidos, las ratas se distribuyeron mediante una Prueba de puntaje z (z-score) utilizando el valor de referencia para hipertensión arterial como base (140 mmHg), también se comprobó la homogeneidad e igualdad de las medias de las cifras de PAS entre los grupos mediante el test de Levene y ANOVA para la comparación de las medias, además de un análisis *post hoc* (prueba de Tukey para determinar cuál tratamiento es el diferente), sin encontrar diferencias significativas.

Los animales hipertensos se dividieron en 3 grupos de 4 animales cada uno para conformar los grupos de tratamiento (tabla 2).

5.7.3 Administración de los tratamientos (Semana 7-10)

El grupo L-NAME permaneció con la administración de 40 mg/kg/día de L-NAME, al grupo Captopril se les administraron 50 mg/kg/día de captopril y 40 mg/kg/día de L-NAME, el grupo EESH recibió 200 mg/kg/día de extracto etanólico de semilla de chía y 40 mg/kg/día de L-NAME; al grupo Sano (ratas sin hipertensión) se le mantuvo con la administración de 2 ml de agua destilada al día.

Tabla 2. Tratamiento administrado a cada grupo de ratas

Grupo	Tratamiento	Dosis
Sano	Agua destilada	2 ml
L-NAME	L-NAME	40 mg/kg/día
Captopril	L-NAME + captopril	40 mg/kg/día 50 mg/kg/día
EESH	L-NAME + EESH	40 mg/kg/día 200 mg/kg/día

Se muestran los diferentes tratamientos y dosis administradas a los grupos de 4 animales cada uno. Los grupos L-NAME, Captopril y EESH estaba conformado por ratas con hipertensión (cifras de PA mayores a 140 mmHg).

5.8 Eutanasia y recolección de tejido

La eutanasia de las ratas se llevó a cabo por el método de decapitación por guillotina siguiendo los lineamientos planteados por el Consejo Canadiense de Protección de los Animales en el Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación de 1998 (Consejo Canadiense de Protección de los Animales, 1998).

Una vez realizado el procedimiento, el cuerpo del animal se colocó en posición invertida y con la ayuda de tijeras, se realizó un corte submuscular desde la parte central de la base del abdomen en forma recta hasta la base del cuello para la recuperación de los diferentes órganos.

Para el aislamiento del corazón se realizó un corte sobre las costillas para liberar la cavidad torácica, y haciendo un corte de las arterias, se retiró el corazón y los pulmones. Posteriormente, se extrajo el hígado haciendo cortes para liberarlo del diafragma y tejido adiposo; después se retiraron los intestinos para realizar cortes en que permitieran la extracción los riñones de tejido adiposo. Los órganos se lavaron en una solución isotónica de NaCl (300 mOsm) para eliminar restos de sangre y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm³ que se colocaron en tubos de polipropileno de 1.5 ml, los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido (durante 3 min) para su criopreservación. Las muestras fueron almacenadas hasta su uso a -80 °C en un ultracongelador (SANYO, U52VC).

5.9 Selección de los genes a analizar

Tomando como referencia las vías principales involucradas en la regulación de la presión arterial, se seleccionaron las enzimas y receptores que intervienen en el proceso de vasodilatación y vasoconstricción arterial.

Se seleccionó el gen *Ace* (que codifican para la síntesis de la ECA, los genes *Agtr1a* y *Bdkrb2* (que codifican para la síntesis de los receptores que participan en la captación de angiotensina II y bradicinina, respectivamente) y el gen *Nos3* (que codifica para la óxido nítrico sintasa endotelial). Se seleccionó el gen *Nos3* (que codifica para la enzima óxido nítrico sintasa endotelial, responsable de la generación de óxido nítrico, un poderoso vasodilatador generado a nivel de endotelio). Como gen constitutivo se seleccionó el gen *Gapdh* (que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

5.10 Identificación de las secuencias que codifican para los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*.

La búsqueda de las secuencias de los genes que codifican para el receptor de angiotensina I (*Agtr1a*), el receptor B2 de bradicinina (*Bdkrb2*), la enzima óxido nítrico sintasa (*Nos3*), la enzima convertidora de angiotensina I (*Ace*) y la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la especie *Rattus Norvegicus* (rata Norway) se realizó utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información

y Biotecnología de Estados Unidos (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y del Repositorio Universal de Proteínas (UniProt) (<http://www.uniprot.org/>); de la misma manera se obtuvieron las secuencias correspondientes al DNAC de cada gen..

5.10.1 Diseño de oligonucleótidos específicos

A partir de las secuencias de cada gen, se identificaron los exones e intrones utilizando la herramienta ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) (NCBI) y se seleccionaron regiones conservadas en DNA genómico y RNA mensajero. Sobre estas regiones se diseñaron oligonucleótidos específicos que cumplieran con los criterios estándar para el diseño de oligonucleótidos: 17 a 22 nucleótidos, diferencia ≤ 3 °C en la temperatura de alineamiento entre el oligonucleótido forward y reverse, contenido de GC entre 40 y 60 %, y presencia de G o C en los extremos inicial y terminal, de cada oligonucleótido.

Las secuencias de los oligonucleótidos se sometieron a un análisis virtual utilizando la herramienta Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para comprobar su especificidad en los diferentes genes y las temperaturas teóricas de alineamiento (información en el anexo 1). Una vez comprobada su especificidad, los oligonucleótidos se solicitaron a la empresa Integrated DNA Technologies. Previo a su uso en el análisis de expresión de los genes, las condiciones de amplificación por PCR se estandarizaron utilizando DNA genómico de corazón de rata Wistar.

5.11 Análisis de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*

5.11.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de tejido de corazón obtenido de los animales del bioensayo:

En un tubo de polipropileno se colocaron 200 mg de tejido de corazón, el equivalente a 100 μ l de volumen de perlas de vidrio de 0.2 mm de diámetro y 400 μ l de buffer de lisis TNST (10 mM de Tris base a pH 8, 100 mM de NaCl, 1 % de SDS, 2 % de Tritón X-100 y 1 mM de EDTA a pH 8) con β -mercaptoetanol al 1 %. El tejido se colocó en hielo por 5 min, y posteriormente, se adicionaron 400 μ l

de una mezcla de fenol:cloroformo (50:50 v/v), se incubó en hielo por 3 min más y el tubo se sometió a agitación en vortex por 3 min, con intervalos de 1 min manteniendo las muestras en hielo.

Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm (Eppendorf, 5415D) para obtener la separación de los componentes celulares. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se les adicionó 1/10 del volumen (con respecto a la fase recuperada) de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubaron a -20 °C por 30 min. Después, los tubos se centrifugaron por 15 min a 12000 rpm para precipitar los ácidos nucleicos; el sobrenadante se eliminó por decantación y los ácidos nucleicos se lavaron 2 veces con 500 µl de etanol al 70 % en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), centrifugando por 2 min a 12000 rpm. Los tubos se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (21 °C) para permitir la evaporación de los residuos del etanol y los ácidos nucleicos se resuspendieron en 30 µl de agua bidestilada estéril.

La concentración de ácidos nucleicos (DNA y RNA) se determinó mediante espectrofotometría en un NanoDrop (Thermo, 2000). Esta medición se llevó a cabo al finalizar cada uno de los procesos para ajustar las concentraciones de las muestras con agua bidestilada estéril: extracción de ácidos nucleicos (500 ng/µl), purificación de RNA (400 ng/µl) y síntesis de DNAC (200 ng/µl).

5.11.2 Aislamiento y purificación de RNA

El RNA de las muestras se aisló utilizando el Kit Isolate II RNA Mini (Bioline) siguiendo las instrucciones del fabricante en un proceso de dos etapas que consistieron en la eliminación del DNA y la purificación del RNA.

Para la eliminación del DNA, las muestras de ácidos nucleicos se sometieron a digestión con DNase I siguiendo el protocolo que se describe a continuación: en un tubo de polipropileno se adicionaron 500 ng/ml de ácidos nucleicos, 1 µl de buffer RDN® (Kit Isolate II RNA Mini, Bioline) y 1 µl de enzima ajustando el volumen final a 10 µl con agua bidestilada estéril. La reacción se incubó a 70 °C

durante 60 min y después se agregó 1 μ l de EDTA [25 mM] para detener la reacción.

Una vez finalizado el proceso de digestión del DNA, se adicionaron 200 μ l del Buffer RW1[®] (Kit Isolate II RNA Mini, Bioline) y el volumen final se transfirió a una columna RNA Mini Spin (Kit Isolate II RNA Mini, Bioline) que se colocó en un tubo de colecta (polipropileno de 2 ml). La columna se centrifugó 30 seg a 11000 rpm y el líquido filtrado se desechó. Posteriormente, se agregaron 600 μ l de Buffer RW2[®] (Kit Isolate II RNA Mini, Bioline), se centrifugó 30 segundos a 11000 rpm desechando nuevamente el líquido filtrado. Finalmente, se agregaron 250 μ l de Buffer RW2[®] y se centrifugó durante 2 min a 11000 rpm.

Para recuperar el RNA retenido en el filtro de la columna, se agregaron 30 μ l de agua bidestilada estéril (libre de RNasas) a la columna y se centrifugó por 1 min a 11000 rpm. El RNA recuperado se fraccionó en alícuotas de 25 μ l, y una fracción fue sometida inmediatamente a reacciones de síntesis de DNAc (manteniéndolo en hielo) y el resto fue almacenado a -80 °C para su uso posterior.

5.11.3 Síntesis de DNAc

Para la síntesis de DNAc a partir de RNAm, se utilizó el Sistema de Transcriptasa Reversa GoScript (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En un tubo de polipropileno se mezclaron 11 μ l de RNA (200 ng/ μ l) y 1 μ l de Oligo dT, la mezcla se incubó a 70 °C por 5 min y después se transfirió a hielo durante 5 min mientras se preparaba la segunda reacción.

Para la preparación de la segunda reacción de síntesis de DNAc, en un tubo de polipropileno nuevo se preparó una mezcla con 4 μ l de buffer GoScript 5x, 2 μ l de MgCl₂ (25 mM), 1 μ l de dNTP's (10 mM) y 1 μ l de enzima RT (160 U/ μ l; Promega). Después de homogenizar la mezcla, se adicionó todo el volumen de la primera reacción (RNA con oligo dT). Posteriormente, la mezcla se incubó en las siguientes condiciones: 5 min a 25 °C, 60 min a 42 °C y 15 min a 70 °C en un termociclador (Axygen, Maxygene). El DNAc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.11.4 Amplificación de fragmentos de DNAC por PCR

La amplificación de los fragmentos correspondientes a cada gen se realizó por PCR en punto final en un termociclador en gradiente (Axygen, Maxygene Gradient) utilizando DNA complementario (DNAC) como molde para las reacciones de PCR. Para cada reacción, en un tubo se mezclaron: 0.5 µl de deoxinucleótidos trifosfatados ([10 nM]; Bioline), 2.5 µl de buffer 5x para la enzima Taq Polimerasa, 0.5 µl de cloruro de magnesio ([25 nM]; Promega), 1 µl de oligonucleótidos específicos ([10 mM]; IDT), 0.06 µl de enzima Taq Polimerasa ([5 U/µl]; Promega) y 500 ng de DNAC. La reacción fue llevada a un volumen final de 13.24 µl con agua bidestilada estéril libre de DNAsas.

Para llevar a cabo la PCR, las condiciones de amplificación establecidas para el termociclador fueron: 95 °C por un periodo de 5 min en un ciclo, seguido de 27 ciclos a: 95 °C por 1 min, 1 min en las correspondientes temperaturas de alineamiento de cada par de oligonucleótidos y un paso de extensión a 72 °C por 1 min; finalmente, la reacción se mantuvo a 72 °C por 10 min. El número de ciclos de replicación por PCR (27 ciclos) se determinó en experimentos previos, en los cuales se observaron diferencias en los fragmentos amplificados por PCR a diferentes concentraciones de DNA.

5.11.5 Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR se utilizaron geles de agarosa (Bioline) al 2 % en buffer TAE 1X teñidos con 1 µl de bromuro de etidio ([10 mg/ml]; BioBasic Inc), utilizando un marcador de pares de bases de 100 a 1000 pb (Hyperladder IV, Bioline). Para la separación de los productos, la electroforesis se realizó en una cámara horizontal utilizando una corriente de 20 volts por 5 min y posteriormente 80 volts por 60 min. La visualización y análisis de los fragmentos amplificados se realizó con un fotodocumentador (GelDoc-it Imaging System; UVP) equipado con lámpara de luz ultravioleta.

5.11.6 Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*

A partir del gel de agarosa sometido a electroforesis y mediante análisis de densitometría, se obtuvieron los valores que corresponden a cada fragmento amplificado de las muestras analizadas por PCR.

La densidad de las bandas obtenidas en cada experimento se determinó con el software Launch VisionWorksLS (GelDoc-It, UVP). Para esto, se seleccionó el área de las bandas de cada muestra y se determinó el número de píxeles correspondientes a la intensidad de lavanda presente. El tamaño los perímetros seleccionados para cada banda se igualaron en dimensión para minimizar las variaciones en los valores obtenidos.

En cada experimento se utilizó el gen *Gapdh* como control de expresión. Se obtuvieron los valores de densidad total de las bandas, los cuales se normalizaron usando los valores del gen constitutivo *Gapdh* (para eliminar las variaciones entre cada experimento). Finalmente, los valores de los grupos de ratas con hipertensión (L-NAME), tratadas con captopril y EESH se analizaron usando los datos del grupo de ratas sanas como referencia y así obtener valores absolutos de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Bdkrb2* y *Nos3* en los diferentes grupos de ratas tratados. Cada experimento de expresión se realizó por triplicado y con los valores obtenidos se calculó el valor absoluto de nivel de expresión de cada gen en cada uno de los grupos.

5.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS V.22 (IBM, Chicago Illinois, EE.UU.) mediante pruebas de estadística descriptiva. La normalización de los datos de densitometría se obtuvo al convertir los valores a logaritmo natural. Para determinar la homogeneidad de varianzas se aplicó la prueba de Levene. Las diferencias en los tratamientos se determinaron con pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y *post hoc* de HDS de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

6.1 Obtención del extracto etanólico de semilla de *Salvia hispánica* L. (EESH)

El rendimiento del extracto etanólico de semilla de chía previamente desgrasado con hexano fue de 1.9 % de extracto libre de solvente.

6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos totales del EESH

El contenido de polifenoles totales en el extracto etanólico se calculó por extrapolación utilizando la curva de calibración de ácido gálico (en concentraciones de 0.0010 a 0.020 mg/ml) con un coeficiente de determinación de $R^2=0.9905$. (figura 7).

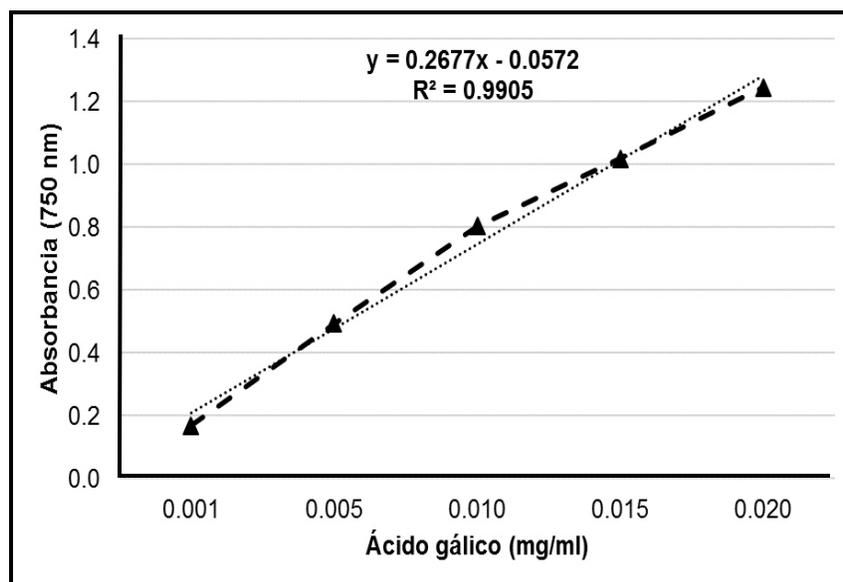


Figura 7. Curva de calibración de ácido gálico.

Se determinó que el contenido de polifenoles fue de 1.55 ± 0.04 g/100 g (mg EAG/g) de semilla seca. Mientras que el contenido de flavonoides en el extracto etanólico de la semilla de *Salvia hispánica* L. expresado como porcentaje de quercetina fue de 23 %.

6.3 Determinación de la actividad inhibitoria de la ECA I *in vitro*

El ensayo de inhibición de actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se realizó utilizando concentraciones de 25 a 200 mg/ml de EESH en agua destilada. Se observó que el extracto produjo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la ECA y que este efecto es dependiente de la cantidad del extracto utilizado (figura 8), es decir, conforme se aumenta la concentración de EESH, hay un aumento en la inhibición de la ECA llegar a la dosis máxima utilizada de EESH (200 mg/ml), se inhibió el 58.4 % de la actividad de la ECA.

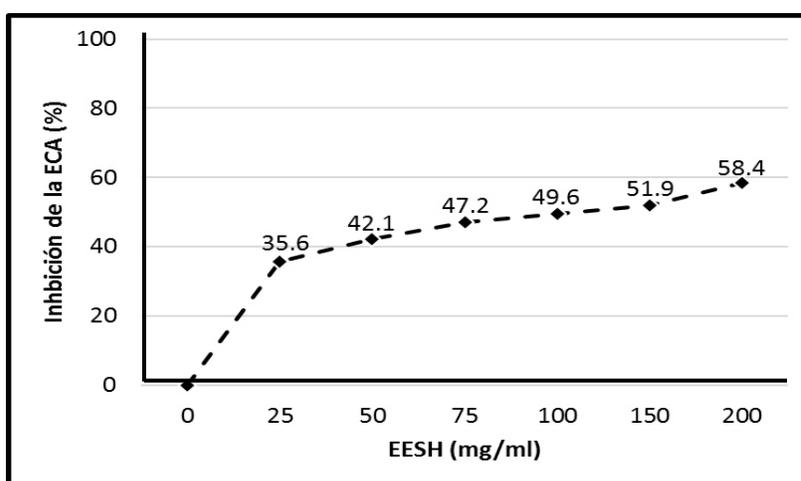


Figura 8. Efecto inhibitorio del EESH sobre la actividad de la ECA. Se observa que al aumentar la concentración del EESH, disminuye la actividad enzimática.

Aunado a esto, la pendiente mostró una tendencia directamente proporcional de la inhibición de la ECA con el aumento de la concentración de EESH.

Siguiendo la misma metodología, se realizó el ensayo de inhibición de la ECA con captopril (grado farmacéutico). Se probaron dosis de 5 a 100 nM, y se observó que la dosis más alta produjo una inhibición de 66.2 % de la ECA.

Extrapolando los valores obtenidos de las curvas dosis-respuesta, se determinó la concentración necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la ECA (IC₅₀) obtenida por parte del EESH y el captopril de cada dosis analizada (tabla 3).

Tabla 3. Valores de IC50 de EESH y Captopril para inhibición de la ECA.

<i>Muestra</i>	<i>IC50</i>
EESH	9.37 mg/ml
captopril	65.44 nM/ml (0.0142 µg/ml)

6.4 Bioensayo

6.4.1 Obtención del modelo de ratas con hipertensión

Para el desarrollo del bioensayo se tomaron 16 ratas adultas Wistar macho con peso de 250 a 300 g. Se les tomó registro del peso y a los datos obtenidos se les aplicó la prueba estadística de puntaje Z tomando como referencia la media de peso de las 16 ratas. Partiendo de este valor, las ratas se distribuyeron en 4 grupos de 4 animales manteniendo medias estadísticamente iguales en cada grupo.

Aleatoriamente se seleccionó uno de los grupos para mantenerlo como control durante el desarrollo del estudio (grupo Sano), a este grupo se le administró agua como tratamiento placebo durante todo el estudio. Al resto de los grupos se les administró L-NAME diariamente en dosis de 40 mg/kg/día durante 6 semanas.

Posterior a las 6 semanas de administración del L-NAME, se realizó el registro de la PAS de los 4 grupos de ratas por triplicado. Las ratas a las que se les administró L-NAME presentaron valores de PAS elevada obteniendo cifras promedio de 310.7 mmHg a 328.2 mmHg en los grupos. El grupo Sano presentó valores de PAS de 100 mmHg, conforme a lo esperado, ya que a este le administró agua en lugar de L-NAME.

En base a los valores obtenidos, se analizaron los grupos de ratas con hipertensión mediante la prueba de ANOVA para comprobar diferencias en las medias de los valores de PAS en cada grupo. El grupo sano permaneció en las mismas condiciones de tratamiento el resto del bioensayo, mientras que al resto

de los grupos se les asignó aleatoriamente la administración de los diferentes tratamientos a los grupos.

Como se observa en la tabla 4, se generó un incremento significativo de la PAS de los grupos de ratas tratados con L-NAME con respecto al grupo Sano. Considerando estos valores se determinó a los grupos L-NAME, Captopril y EESH como grupos de ratas con hipertensión para el inicio de los tratamientos.

Tabla 4. Presión arterial sistólica en los diferentes grupos de ratas al inicio de la administración de los tratamientos

Grupo	PAS inicial (mmHg)
Sano	100.0 ± 5.4 ^b
L-NAME	310.7 ± 27.3 ^a
Captopril	328.2 ± 26.2 ^a
EESH	318.3 ± 22.1 ^a

Los grupos L-NAME, Captopril y EESH fueron tratados durante 6 semanas con 40 mg/kg/día de L-NAME para inducir la hipertensión; al grupo Sano se le administró agua en lugar de L-NAME. Valores promedio ± desviación estándar de tres mediciones independientes de presión arterial para cada grupo de ratas al inicio de los tratamientos. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre las medias de los grupos.

6.4.3 Efecto de los tratamientos sobre la presión arterial

A partir de la semana 7 del bioensayo, a las ratas de los grupos L-NAME, Captopril y EESH se les siguió administrando L-NAME a dosis de 40 mg/kg/día. En conjunto con este tratamiento, a un grupo de ratas (grupo Captopril) se les administró captopril en dosis de 50 mg/ml/kg diariamente y a otro se les administró 200 mg/kg/día de extracto etanólico de semilla de chía (grupo EESH). El grupo de ratas sanas permanecieron con la administración de agua.

Al inicio de los tratamientos, el grupo de ratas sanas mostró valores menores de PAS estadísticamente significativos comparado con los grupos de ratas hipertensas (L-NAME, Captopril y EESH), manteniendo valores inferiores a 100 mmHg. Después de la administración de los tratamientos, las ratas del grupo

L-NAME presentaron los mayores valores de PAS (414.2 ± 7.1 mmHg); el grupo de ratas tratadas con captopril presentó valores de PAS de 327.8 ± 26.2 mmHg y, el grupo de ratas tratado con EESH mostró valores de 317.8 ± 22.1 mmHg.

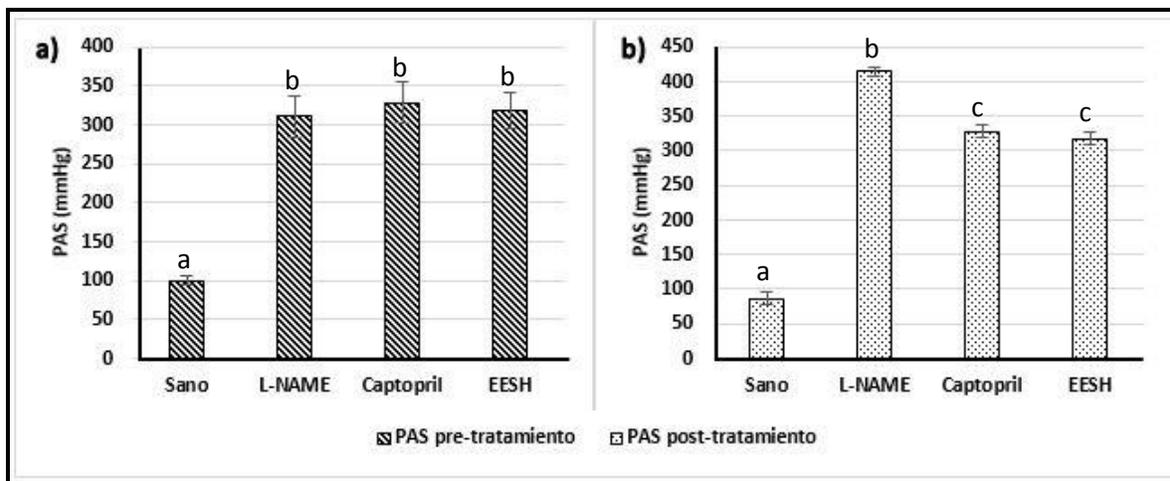


Figura 9. Comparación de los valores de PAS en los diferentes grupos al inicio y final de los tratamientos. Valores promedio \pm error estándar de los valores de PAS. a) b) c) * Diferencias significativa mediante prueba t de Student ($p < 0.05$). Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados mediante ANOVA ($p < 0.05$).

Después de 4 semanas de administración de los tratamientos, el grupo de ratas tratado con L-NAME (ratas hipertensas sin ningún compuesto inhibidor de la ECA adicional) tuvo un aumento del 31.2 % en los valores de PAS, mientras que en los grupos Captopril y EESH los valores de PAS disminuyeron 0.2 % (figura 9). En las ratas hipertensas tratadas durante 4 semanas con captopril (50 mg/kg/día) y EESH (200 mg/kg/día) no se observaron diferencias significativas en los valores de PAS.

6.4.4 Efecto de los tratamientos sobre el peso de los animales

Una vez concluido el tratamiento se realizó el registro del peso corporal de los animales; encontrando una disminución del 2.7 % en el grupo tratado con L-NAME, mientras que en el grupo tratado con captopril el peso promedio se incrementó 2.2 %. Los animales tratados con EESH perdieron el 6.0 % del peso corporal, y en el grupo Sano se observó un aumento del 7.9 %. Solo en el grupo Sano hubo un incremento significativo del peso corporal después de finalizar el

tratamiento ($p < 0.05$); en el resto de los grupos no se encontró diferencia significativa (tabla 5).

El peso de los animales se registró cada semana, previo a la administración de los tratamientos; se encontró una media de 340.2 ± 39.3 g en el grupo L-NAME, 313.0 ± 56.1 g para el grupo Captopril, así mismo, 331.5 ± 60.2 g para el grupo tratado con EESH, y 313.2 ± 33.0 g para el grupo de ratas sanas (tabla 5). Al concluir los diferentes tratamientos, el peso de las ratas de los grupos L-NAME, Captopril y EESH (375.7 ± 66.7 g, 351.0 ± 69.0 g y 355.7 ± 41.0 g, respectivamente) no mostraron diferencias significativas con respecto a los pesos registrados previos a los tratamientos. El grupo de ratas sanas (Sano) mostró un incremento significativo en el peso hasta valores de 412.7 ± 18.8 g

Tabla 5. Comparación del peso corporal de las ratas al inicio y final de los tratamientos.

Grupo	Inicio Tx (g)	Final Tx (g)
Sano*	382.6 ± 23.9	412.7 ± 18.8^b
L-NAME	386.1 ± 39.5	375.7 ± 66.7^a
Captopril	343.5 ± 63.8	351.0 ± 69.0^a
EESH	378.5 ± 64.6	355.7 ± 41.0^a

Valores promedio \pm desviación estándar del peso corporal de las ratas por grupo al inicio y final de la administración de los tratamientos. Se analizaron los cambios en el peso corporal de las ratas al inicio y final de los tratamientos. Superíndices diferentes indican diferencias significativas por ANOVA al inicio y final de los tratamientos. * Diferencia significativa por t-student.

6.4.5 Efecto de los tratamientos en el peso de los órganos

La administración de los diferentes tratamientos no produjo cambios en el peso de los principales órganos de las ratas: riñón, hígado, corazón y pulmón (tabla 6). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los pesos de los órganos en los grupos.

Tabla 6. Comparación del peso promedio de los órganos.

Grupo	Riñón	Hígado	Corazón	Pulmón
<i>Sano</i>	2.89 ± 0.24	12.69 ± 0.17	1.62 ± 0.29	2.19 ± 0.55
<i>L-NAME</i>	2.62 ± 0.37	11.28 ± 0.42	1.48 ± 0.41	1.88 ± 0.37
<i>Captopril</i>	2.35 ± 0.43	10.57 ± 2.28	1.32 ± 0.38	2.14 ± 0.91
<i>EESH</i>	2.43 ± 0.39	10.45 ± 1.32	1.56 ± 0.43	2.11 ± 0.61

Valores promedio ± DE de 4 animales por grupo. Los valores están expresados en gramos.

6.5 Análisis *in silico*: identificación de las secuencias de gens y diseño de oligonucleótidos específicos

A partir de las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y el Repositorio Universal de Proteínas (UniProt), se obtuvieron las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*, responsables de la regulación del tono vascular.

En un primer análisis, y con ayuda de la herramienta BLAST (NCBI), se buscó por la identidad, en ratas de especie Norway, las secuencias nucleotídicas de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*.

Partiendo de las secuencias de cada gen seleccionado, con ayuda del programa ORF-finder (NCBI) se determinó la presencia de intrones y exones de cada gen.

Como resultado del análisis, se identificaron los genes: ***Ace***, ID: 24310 (cromosoma 10, q32.1); ***Agtr1a***, ID: 24180 (cromosoma 17, p12), ***Bdkrb2***, ID: 25245 (cromosoma 6, q32), ***Nos3***, ID: 24600 (cromosoma 4, q11) y ***Gapdh***, ID: 24383 (cromosoma 4, q42), y se diseñaron oligonucleótidos sobre fragmentos correspondientes a los exones de los genes, correspondientes a RNAm. Cada oligonucleótido propuesto fue analizado con ayuda de la herramienta Primer-Blast para comprobar, mediante PCR virtual, su amplificación y homología con los productos de interés. Para determinar las características físico-químicas de cada oligonucleótido, se utilizaron las herramientas Oligo Calc, IDT Oligo Analyzer 3.1 y DNA Sequence Reverse and Complement. Todos estos softwares están

disponibles en acceso libre en internet. Las secuencias y características principales de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis de oligonucleótidos específicos diseñados para los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*.

Oligonucleótido	Secuencias (5' → 3')	Tm de amplificación (°C)	Amplicon DNAc (pb)
<i>Ace-F</i>	CAG GAG TTT GCA GAG GTC TGG GGC	62	577
<i>Ace-R</i>	CCA GCA GAT GAG CGG GAA TAG GAC C		
<i>Agtr1a-F</i>	CAC CTA TGT AAG ATC GCT TCG GCC	60	355
<i>Agtr1a-R</i>	GGG TAT AGC TGG TGA GAA TGA TAA GG		
<i>Nos3-F</i>	GAC CCT CCG CCA TCC ACA GAG CCT G	64	514
<i>Nos3-R</i>	GCA CCG GGT CTC CTG CCT TGA GTT GG		
<i>Bdkrb2-F</i>	GCT CAT AAC GGG ACC TTT TCA GAG G	63	700
<i>Bdkrb2-R</i>	CAG TGG CCT TCT TCT CCG TCT GG		
<i>Gapdh-F</i>	CCC ACG GCA AGT TCA ACG GC	64	840
<i>Gapdh-R</i>	CCA TGT AGG CCA TGA GGT CCA CC		

6.6 Estandarización de condiciones para análisis de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2* y *Gapdh*

La temperatura óptima de alineamiento de cada par de oligonucleótidos se obtuvo experimentalmente mediante PCR en gradiente, realizando reacciones de PCR sobre DNA genómico con cada par de oligonucleótidos, la temperatura de alineamiento se programó en base a la temperatura teórica de amplificación (calculada con el programa Oligo Calc), usando 4 °C por debajo y por encima de las temperaturas de cada par de oligonucleótidos. El gradiente se realizó con diferencia de 2 °C en cada reacción. Se determinó como temperatura óptima aquella en la cual se encontró una banda con mayor intensidad, específica y cuyo tamaño correspondía al seleccionado en el análisis *in silico* para cada gen (tabla 7).

Para ver diferencias en la cantidad de producto de PCR amplificado con diferentes concentraciones de DNAc (400, 200 y 100 ng/μl), se determinó el número de ciclos necesarios de amplificación sin que se produjera saturación del sistema (25, 27 y 30 ciclos). Se determinó utilizar 27 ciclos de replicación en la PCR para el análisis de las muestras (figura 10).

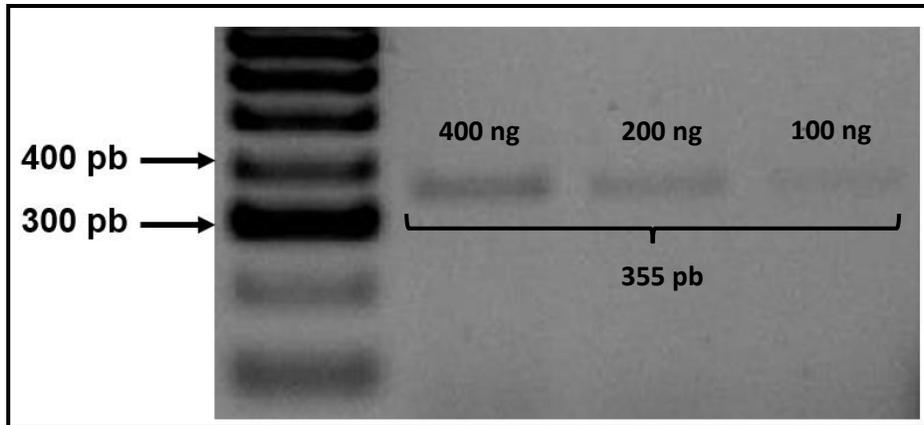


Figura 10. Amplificación de un fragmento (355 pb) del gen *Agtr1a* usando como molde diferentes concentraciones de DNAg (400, 200, 100 ng/μl). La imagen es un ejemplo representativo del resultado obtenido al usar 27 ciclos de PCR que permite comparar las diferencias en la cantidad de producto amplificado.

6.7 Extracción de ácidos nucleicos a partir de tejido cardiaco de rata

La extracción de ácidos nucleicos se realizó por triplicado en cada muestra de tejido utilizando el método fenol-cloroformo modificado por Hoffman & Wiston (1987) que combina el rompimiento de las células por detergentes y acción mecánica como se describe en el apartado 5.11.1. Para comprobar la calidad de la extracción de ácidos nucleicos, las muestras fueron sometidas a electroforesis. Posteriormente se determinó la concentración de ácidos nucleicos y cada muestra se ajustó a 500 ng/μl.

6.7.1 Aislamiento y purificación de RNA

Para eliminar el DNA, las muestras que presentaron una mayor pureza e intensidad de las bandas de RNA se sometieron a digestión con DNasa I® utilizando diferentes combinaciones de tiempo, concentración de muestra y concentración de enzima. Para determinar las mejores condiciones de tratamiento para degradar el DNA, las muestras tratadas con DNasa se sometieron a PCR con oligonucleótidos específicos. Se determinó que incubando 4000 ng/μl de muestra con 1 μl de DNasa a 37 °C por 60 min no se encontraba amplificación del fragmento correspondiente a los oligonucleótidos utilizados, lo cual indicaba que ya no había restos de DNA en la muestra. Previo al tratamiento con transcriptasa

reversa para la síntesis de DNAC, la concentración de las muestras se ajustó a 400 ng/μl.

6.7.2 Síntesis de DNAC

Dado que el protocolo del Sistema de Transcriptasa Reversa GoScript (Promega) refiere utilizar una concentración dentro del rango de 100 ng/μl a 5000 ng/μl para determinar la concentración óptima de RNA necesaria para la síntesis de DNAC, se utilizaron concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000 ng/μl de RNA purificado.

En la reacción 1 (RNA + Oligo dT) se utilizaron diferentes concentraciones. Para la reacción 2, los volúmenes se siguieron de acuerdo a las indicaciones del fabricante (ver material y métodos).

Se determinó que usando 1000 ng/μl de RNAm se obtuvo una concentración de DNAC adecuada para el proceso de PCR. Las concentraciones de las muestras de DNAC obtenidas de la reacción de RT se ajustaron a 200 ng/μl para su posterior análisis por PCR.

6.8 Análisis de expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3*, *Bdkrb2*

Para el análisis de expresión de los diferentes genes de interés, se partió del DNAC sintetizado a partir de RNA obtenido de tejido de corazón de los diferentes grupos de ratas tratados.

Utilizando DNAC como templado, se hicieron reacciones de PCR bajo las condiciones previamente determinadas para cada par de oligonucleótidos; los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se analizaron por densitometría.

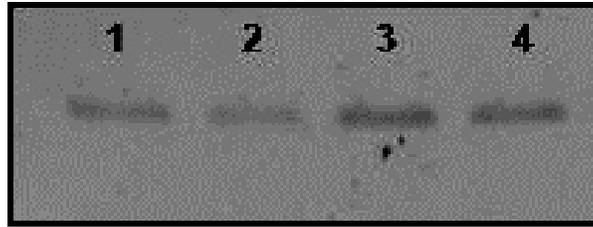


Figura 11. Amplificación de un fragmento del gen *Gapdh* en los diferentes grupos de ratas. La imagen es un ejemplo representativo del resultado obtenido al usar 27 ciclos de PCR usando DNAc como molde: 1) grupo Sano, 2) grupo con hipertensión, 3) grupo Captopril, 4) grupo ESSH.

Para comparar las variaciones en la expresión de los genes en cada grupo, se utilizaron los valores obtenidos del gen *Gapdh* para ajustar los valores de los otros genes analizados, a partir de esto, la comparación se realizó con los promedios y las desviaciones estándar en 3 muestras independientes de cada animal (anexo 2).

6.8.1 Expresión del gen *Ace*

La expresión relativa de RNAm del gen *Ace* con respecto al constitutivo (*Gapdh*) en las ratas sanas fue de 31.6 ± 11.7 ; este valor se tomó como valor de referencia (basal) para analizar el efecto que los diferentes tratamientos causaron sobre su expresión.

En las ratas con hipertensión (grupo L-NAME), la expresión del gen *Ace* fue significativamente menor (4.9 ± 2.5), encontrándose una reducción de más de 6 veces (poner el valor exacto) en la expresión de dicho gen con respecto al grupo de ratas sanas.

Tanto la administración de captopril como del EESH a las ratas con hipertensión, produjo un incremento en la expresión del gen *Ace* alcanzando valores de 22.7 ± 6.2 y de 12.0 ± 1.7 , respectivamente (Fig. 18). En el grupo captopril, los niveles de *Ace* fueron iguales ($p > 0.05$) a los presentados por el grupo de ratas sanas (31.6 ± 11.7) mientras que en la expresión del grupo tratado con EESH se observó una disminución significativa en la expresión de *Ace* con

respecto al grupo de ratas sanas (31.6 ± 11.7); la expresión de *Ace* entre los grupos captopril y EESH fue estadísticamente igual ($p > 0.05$) (figura 12).

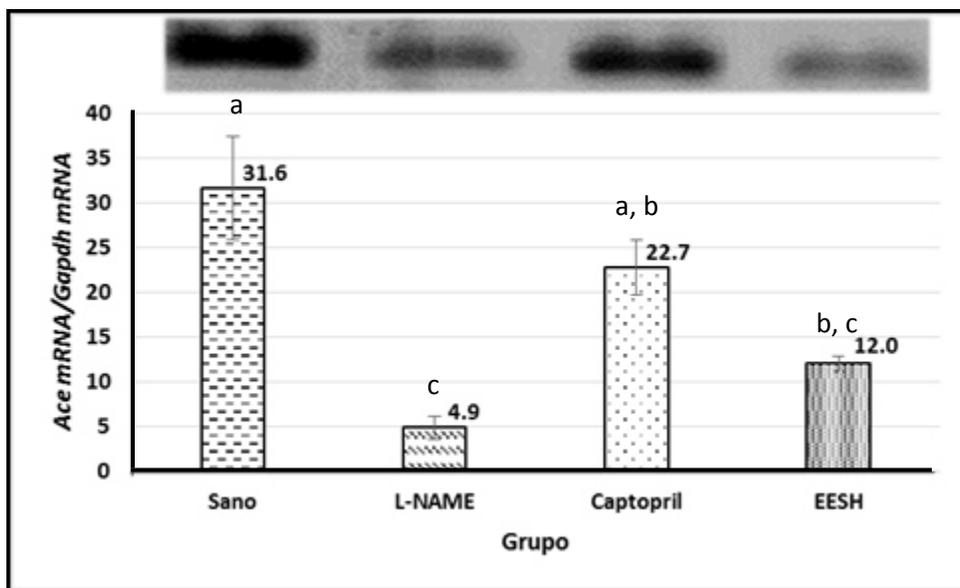


Figura 12. Comparación de la expresión del gen *Ace* en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes ($n = 4$ animales por grupo); la barra en la parte superior de cada columna representa el error estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados mediante ANOVA y post hoc de Tukey.

6.8.2 Expresión del gen *Agtr1a*

En las ratas sanas, el RNAm del gen *Agtr1a* mostró un valor de expresión relativa con respecto al gen *Gapdh* de 2.31 ± 1.6 , el cual se tomó como referencia para la comparación en los niveles de expresión en la administración de los diferentes tratamientos.

En las ratas hipertensas (grupo L-NAME) se encontró un incremento de ~ 5.5 veces en la expresión del gen *Agtr1a* (12.8 ± 5.6) con respecto a las ratas sanas.

Al administrar captopril, la expresión del gen *Agtr1a* disminuyó a 3.2 ± 1.4 con respecto a las ratas hipertensas, valores estadísticamente iguales a los presentados por las ratas sanas. De manera similar, cuando las ratas hipertensas recibieron EESH como tratamiento, el RNAm del gen *Agtr1a* disminuyó su

expresión a 5.8 ± 1.5 con respecto a las ratas con hipertensión; niveles que también mostraron igualdad estadística con respecto a las ratas sanas.

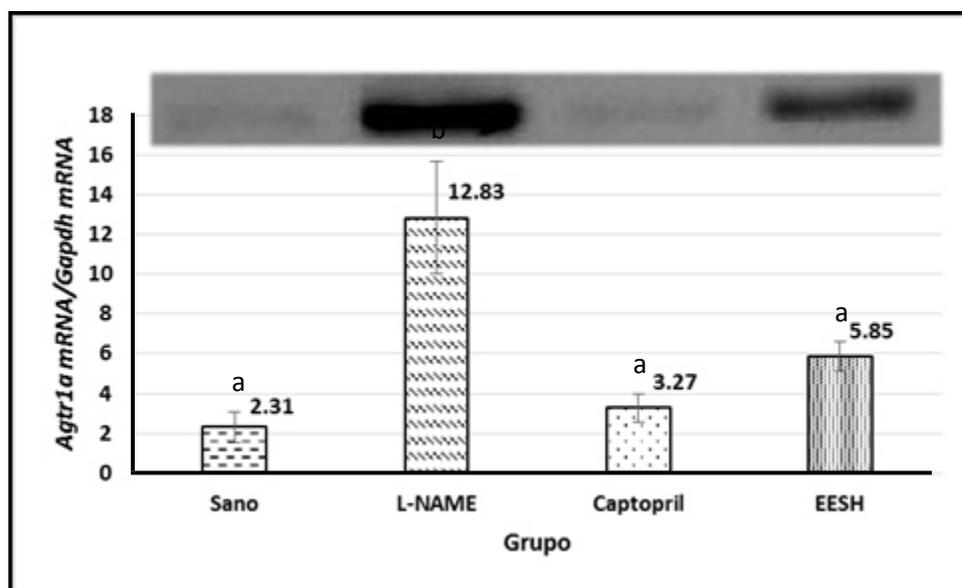


Figura 13. Comparación de la expresión del gen *Agtr1a* en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes ($n= 4$ animales por grupo); la barra en la parte superior de cada columna representa el error estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados mediante ANOVA y post hoc de Tukey.

6.8.3 Expresión del gen *Nos3*

El grupo de ratas sanas mostró una niveles de expresión basal del gen *Nos3* de 14.2 ± 2.7 , y con la administración de L-NAME en ausencia agentes antihipertensivos, los niveles de expresión del gen *Nos3* mostraron una disminución de 88% (1.7 ± 0.3) estadísticamente significativa. La administración de captopril durante 4 semanas al modelo con hipertensión produjo un incremento estadísticamente significativo en la expresión del gen (13.2 ± 0.9) comparado con las ratas hipertensas sin antihipertensivos (1.7 ± 0.3); estos valores mostraron igualdad estadística con respecto a las ratas sanas (14.2 ± 2.7).

Con la administración de EESH se observó un efecto similar al producido por el captopril; las ratas presentaron un incremento en la expresión del gen *Nos3* (10.9

± 1.9) con respecto a las ratas hipertensas (1.7 ± 0.3). Los niveles de expresión del gen *Nos3* en las ratas sometidas al tratamiento con EESH mostraron diferencia significativa, pero con una tendencia hacia el nivel presente en el grupo de ratas sanas (figura 14).

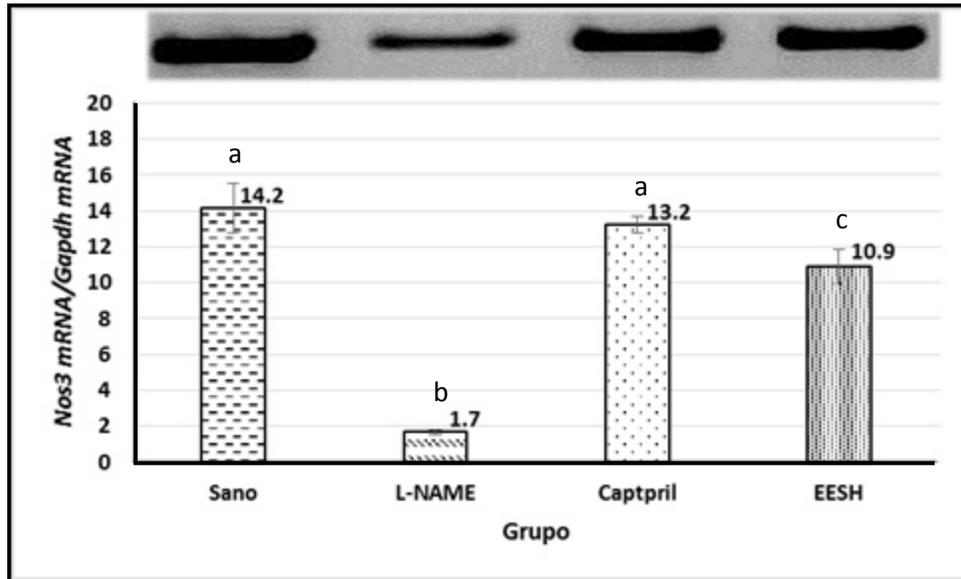


Figura 14. Comparación de la expresión del gen *Nos3* en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes ($n= 4$ animales por grupo); la barra en la parte superior de cada columna representa el error estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados mediante ANOVA y post hoc de Tukey.

6.8.4 Expresión del gen *Bdkrb2*

La expresión basal de RNAm del gen *Bdkrb2* (grupo Sano) fue de 10.6 ± 1.6 . En las ratas con hipertensión y los grupos tratados con captopril y EESH, se encontraron valores menores de expresión (7.5 ± 0.88 , 8.6 ± 1.2 y 10.5 ± 1.3 , respectivamente) Aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (figura 15).

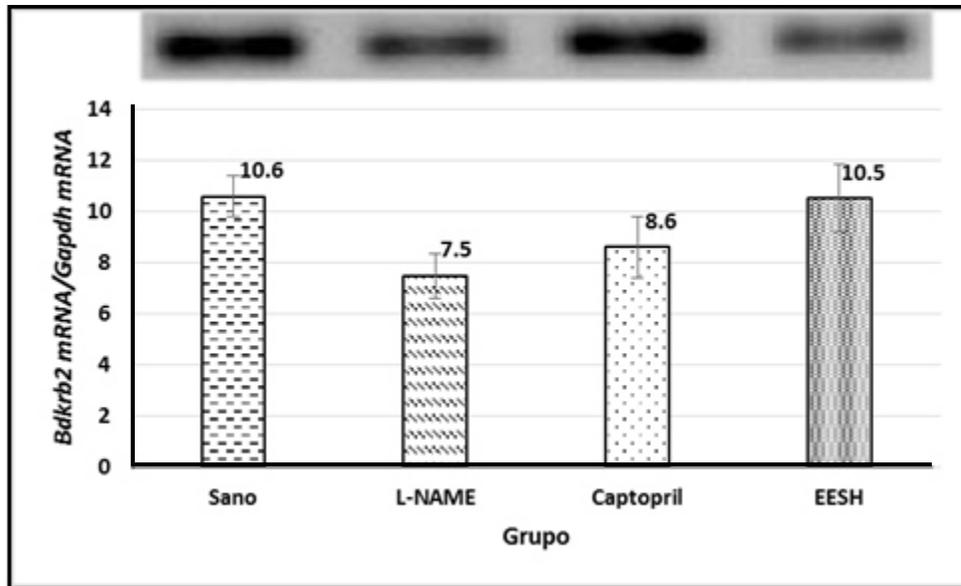


Figura 15. Comparación de la expresión del gen *Bdkrb2* en ratas hipertensas sometidas a diferentes tratamientos. Se indica el valor promedio de tres experimentos independientes (n= 4 animales por grupo); la barra en la parte superior de cada columna representa el error estándar. En la parte superior de la gráfica se muestra una imagen representativa de los productos obtenidos por RT-PCR en cada grupo. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los grupos comparados mediante ANOVA y post hoc de Tukey.

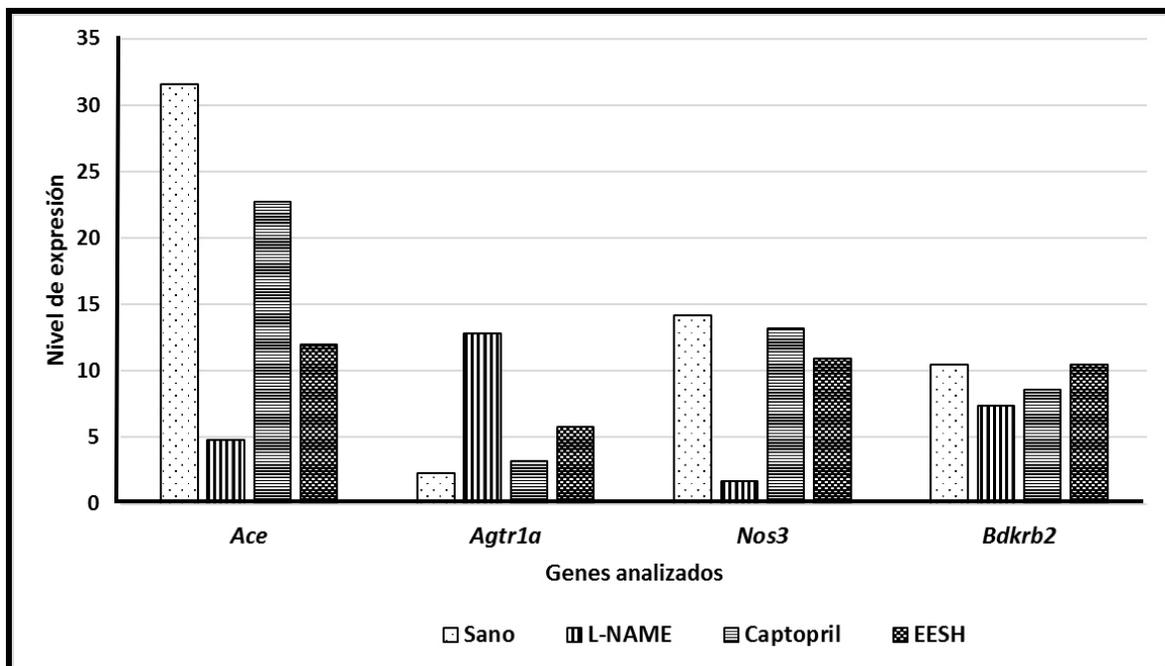


Figura 16. Comparación de la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a*, *Nos3* y *Bdkrb2* en tejido cardíaco de ratas sometidas a diferentes tratamientos.

Con la administración de L-NAME, la expresión de los genes *Ace* y *Nos3* disminuyó significativamente con respecto a los valores obtenidos por las ratas sanas, mientras que la expresión del gen *Agtr1a* tuvo un incremento significativo en relación al grupo de ratas sanas. Cuando se administró captopril a los animales con hipertensión, la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a* y *Nos3* alcanzaron valores estadísticamente iguales a los obtenidos por las ratas sanas. Este efecto también se observó cuando se administró EESH a ratas con hipertensión, las de las cuales mostraron ser estadísticamente a las ratas sanas en la expresión de *Agtr1a* y *Nos3*; la expresión del *Ace* mostró ser estadísticamente igual a la presentada en las ratas tratadas con captopril y las hipertensas, mientras que fue estadísticamente diferente a la expresión del gen *Ace* en las ratas sanas. La expresión del gen *Bdkrb2* no mostró diferencias estadísticas en las ratas sometidas a los tratamientos.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del extracto etanólico de semilla de chía (EESH)

En la primera fase del estudio se obtuvo el extracto etanólico de semilla de chía (EESH), al que se le realizó la extracción de la porción lipídica con hexano. Con el método utilizado para la elaboración del EESH se obtuvo un rendimiento que se encuentra en un rango menor (1.9 %) al obtenido en otros estudios realizados en especies de la familia Lamiaceae (3.4 a 7.6 %) (Marinova & Yanishlieva, 1997). Se ha descrito el rendimiento y la concentración de los compuestos fenólicos de interés en los extractos son dependientes de diversos factores, entre los que se encuentran el método de extracción, el solvente utilizado, tamaño de las partículas, temperatura de extracción y el tratamiento previo de la muestra (Alimpić et al., 2014; Durling et al., 2007; Marinova & Yanishlieva, 1997; Stanojević et al., 2009).

López & Ortega (2014) encontraron un rendimiento de 3.82 % en el extracto etanolico secuencial de semilla de *Salvia hispánica* L., mientras que en el extracto etanólico directo obtuvieron el 5.97 %; sin embargo, estos extractos no presentaban tratamiento previo para la eliminación de los lípidos, por lo que el rendimiento fue mayor al obtenido en nuestro estudio. Por tanto, las variaciones en los diferentes rendimientos dependen del método utilizado y las características de la semilla usada para la elaboración del mismo, que pudo haber comprometido el rendimiento final obtenido.

En el caso de semillas o productos con alto contenido de grasa (como es el caso de la semilla de chía) el proceso de desgrasado puede tener un efecto importante en el rendimiento. El contenido de grasa en la semilla de chía varía entre 25 y 34 % (Ayerza, 2011).

7.1.1 Contenido de compuestos fenólicos del EESH

La elaboración de extractos tiene la finalidad de concentrar compuestos de interés presentes en la materia vegetal. En diversos estudios se ha reportado que

los extractos elaborados utilizando alcoholes como solventes tienen mayor capacidad de solubilizar compuestos de origen fenólico; sin embargo, la concentración presente dependerá de las mismas características de extracción, las condiciones de cultivo, polaridad del solvente de extracción y el genotipo de la especie vegetal (Durling et al., 2007).

Trabelsi y cols. (2010) describieron el efecto de diversos solventes en el aislamiento de compuestos fenólicos en extractos, encontrando que en los extractos alcohólicos había mayor contenido de polifenoles.

Nuestros resultados muestran que, por el método seleccionado (con previo desgrasado con hexano) se obtuvo una concentración de compuestos fenólicos de 1.55 ± 0.04 g/100 g de semilla seca; esto puede tener relación con las características de cultivo y el rendimiento final del extracto, ya que al tener un rendimiento menor que el reportado por otros estudios, en el extracto se podría encontrar una mayor concentración de compuestos fenólicos.

7.1.2 Actividad inhibitoria de la ECA *in vitro*

El ensayo realizado con captopril (grado farmacológico) mostró valores de IC₅₀ (0.065 μ M) los cuales se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura para este compuesto (0.021 μ M a 0.58 μ M); además se ha reportado que el efecto del captopril puede variar como resultado del proceso de producción y la interacción de sus excipientes (Fujita & Yoshikawa, 1999; Hooper & Turner, 1987; Inada et al., 1986; Megías et al., 2004).

También se ha reportado la capacidad de inhibir la actividad de la ECA por fuentes alimentarias, así como uso como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares e hipertensión. De los alimentos se han analizado tanto extractos completos, fracciones aisladas de los extractos y sus fracciones hidrolizadas. La caracterización de los extractos obtenidos de productos alimentarios ha permitido identificar la presencia de compuestos fenólicos y péptidos como posibles responsables de este efecto.

En plantas pertenecientes a las salvias, se ha estudiado la capacidad de inhibir la ECA debido a su alto contenido de compuestos aromáticos con función antioxidante (Kwon et al., 2006). Diversos estudios han señalado al ácido cafeico como responsable del efecto hipotensor, también se han encontrado el ácido rosmarínico (éster del ácido cafeico) y ácido litospérmico (molécula conformada por tres moléculas de ácido cafeico); estos compuestos han sido identificados en plantas como potencial agente hipotensor (Park et al., 2008; Petersen, 2003; Tanaka et al., 1997; Wang et al., 2007; Lu & Foo, 2001).

El ácido cafeico es uno de los principales compuestos fenólicos en la semilla de *Salvia hispánica* L. (López & Ortega, 2014). También se ha identificado la capacidad de los compuestos fenólicos derivados del ácido cafeico para inhibir la acción de la ECA, lo que podría explicar el efecto ejercido por el extracto (Tanaka et al., 1997).

7.2 Obtención de un modelo de ratas con hipertensión

El óxido nítrico (ON) derivado del endotelio es sintetizado por la ON sintasa endotelial (ONSe) a partir del aminoácido L-arginina, tiene diversos efectos fisiológicos, entre los que se incluyen: la modulación de la proliferación de células del músculo liso, la inhibición de la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos, y el control del tono vascular (Nakmareong et al., 2011). Se sabe que la producción de ON por las células del endotelio vascular es un factor importante en la regulación del flujo sanguíneo y la presión arterial en mamíferos, y que la inhibición de la síntesis de ON da como resultado una respuesta presora, ocasionando un desequilibrio en los valores de presión arterial (Cunha et al., 1993).

La inducción de HTA mediante la administración de L-NAME, del cual, tanto la dosis como el tiempo de administración serán esenciales en este método. Se ha comprobado que después de administrarse por 4 semanas, la PA se incrementa a valores mayores a 200 mmHg (Afkir et al., 2008; Arnal et al., 1992; Pechánová et al., 2004). En nuestro modelo de estudio, la administración de 40 mg/kg de

L-NAME durante 6 semanas produjo un incremento de la PA a valores mayores de 300 mmHg.

7.3 Efecto del captopril y EESH en la presión arterial

Al finalizar los tratamientos, las ratas sanas presentaron un incremento en el peso corporal con respecto al inicio de los tratamientos, mientras que las ratas hipertensas se mantuvieron igual hasta el final del bioensayo. El proceso del desarrollo físico de los animales está asociado a los cambios metabólicos, por lo cual, estas variaciones en el peso de los animales podrían estar producidos por la inducción de la hipertensión y el estrés metabólico (Harris et al., 1998; Harris et al., 2002). Bhadoriya y cols. (2011) comprobaron que algunos extractos producidos a partir de *Salvia scutellarioides* poseen efecto diurético, provocando una mayor pérdida de líquidos y sodio en las ratas tratadas; en este trabajo no se evaluó la pérdida de líquidos, y para comprobar esto sería necesario evaluar la excreción urinaria en los diferentes grupos. A pesar de las diferencias encontradas en el peso corporal de las ratas, los órganos presentaron características similares en cuanto a: coloración, tamaño, peso y estructura; lo que manifiesta que las variaciones en el peso de los animales pudieran estar asociadas directamente con la ganancia de tejido adiposo y líquidos.

El efecto de la administración del captopril sobre ratas con hipertensión ha sido evaluado extensamente, mostrando disminuciones en los valores de PA (Antonaccio et al., 1979; Dorrance et al., 2002; Lee et al., 1991); sin embargo, no se han encontrado reportes del uso de captopril farmacológico en ratas con hipertensión.

La administración de EESH detuvo el incremento de la PA en las ratas hipertensas, mostrando un efecto similar a la administración de captopril. Extractos de otras especies vegetales han mostrado poseer un efecto hipotensor al ser administradas a ratas con hipertensión, y aunque los valores de PA no disminuyen de forma significativa, los extractos detienen el incremento de la misma (Ramírez

et al., 2006). Este efecto puede estar asociado a las dosis administradas según el tipo de extracto y los compuestos presentes en los mismos.

En fracciones aisladas de extractos de plantas, también se ha observado un efecto hipotensor, principalmente asociado a compuesto antioxidantes, saponinas y péptidos. El efecto hipotensor se presenta con mayor eficacia cuando se administran fracciones aisladas ricas en flavonoides o moléculas purificadas de flavonoides. Esto podría estar influenciado por la unión de estos compuestos con el átomo de zinc presente en la ECA, en su sitio catalítico, ya que este ion parece tener la propiedad de asociarse con macromoléculas participando de esta manera en la flexibilidad de la coordinación geométrica de la enzima, otra posibilidad es la interacción de la molécula con un lugar diferente al sitio catalítico de la ECA (Arenas-Carvajal et al., 2009).

El EESH tiene un gran contenido de compuestos antioxidantes (ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol) (Ortega, 2016), por lo que es posible que el efecto observado en este modelo experimental (disminución de la PA en ratas tratadas con el EESH) se deba a la acción inhibitoria de la ECA, que han sido atribuidas a los compuestos presentes en el EESH.

Con la administración del EESH, los valores de la PA de las ratas se mantuvieron en niveles similares a los observados con la administración de captopril, lo cual sugiere que los componentes del EESH tienen un efecto regulador de la PA *in vivo* a través de la inhibición de la ECA; esto apoyado por los resultados de los ensayos *in vitro* (ver tabla 3).

7.4 Análisis de la expresión de genes en ratas con hipertensión

Un mecanismo que ha sido asociado fuertemente a la administración de extractos y los mecanismos de regulación de la presión arterial en ratas hipertensas, y que han determinado el efecto hipotensor de algunas especies vegetales, es la modificación de la expresión de algunos de los genes

responsables de codificar la síntesis de moléculas clave para la homeostasis del sistema circulatorio y daño coronario.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en las ratas con hipertensión, la expresión del gen *Ace*, responsable de la síntesis de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), disminuyó con respecto al grupo de ratas sanas; este resultado contrasta con el reportado por Linz y cols. (1999), quienes reportan que la inhibición crónica de la óxido nítrico sintasa endotelial (ONSe) produce una sobrerregulación de la expresión/actividad de la ECA, es decir, existe una relación inversa entre la ONSe y la ECA. Esta retroalimentación es generada por la guanosín monofosfato cíclico (GMPc), cuyos niveles de expresión/actividad se encuentran incrementados en ratas con hipertensión y esto estimula la expresión/actividad de la ECA. Sin embargo, Arnal y cols. (1992) analizaron la síntesis de GMPc en la pared arterial de ratas hipertensas tratadas con L-NAME, encontrando una disminución con respecto a las ratas sanas, datos que podrían relacionarse con la baja expresión del gen *Ace* encontrada en las ratas con hipertensión.

Diversas teorías han surgido respecto al remodelamiento vascular y la interacción del óxido nítrico (ON) y la ECA. Los estudios realizados en ratas hipertensas han comprobado un incremento en la actividad de los receptores 2 de angiotensina, como resultado de un incremento en la actividad de la ECA (Heeneman et al., 2007).

También se ha visto que, en ratas normotensas, la regulación de la PA está influenciada por un flujo dependiente del receptor AT₂, lo cual promueve un incremento en la producción de ON, que a su vez estimulan la vasodilatación, pero en ratas espontáneamente hipertensas este proceso cambia, dando lugar a un proceso antagonista dependiente del receptor AT₁ que produce vasoconstricción (Merlini et al., 2004). Entonces, en ratas hipertensas se incrementa la producción de receptores AT₁ y disminuye la producción de receptores AT₂, lo que promueve una disminución en la síntesis de ON. Esta reducción en la producción de

receptores AT2 podría estar asociada a la disminución en la síntesis de ECA por una baja expresión del gen *Ace* y del proceso compensatorio en la homeostasis de la PA.

En ratas hipertensas tratadas con captopril se observó que con la administración del IECA se incrementaron los niveles expresión del gen *Ace* hasta valores basales, obteniendo cifras iguales a las determinadas en las ratas sanas. Este efecto es comparable al obtenido con la administración de imidapril a ratas con hipertensión inducida por L-NAME por el grupo de investigación de Kobayashi y cols. quienes describen que podría deberse a un cambio en los diferentes sistemas encargados de regular la presión arterial, como respuesta compensatoria a la síntesis de ECA y la captación de ANGII por parte de los receptores. El bloqueo de la ECA por inhibidores induce una disminución en la producción de ANG que conduce a una estimulación en la producción de ON y bradicinina (moléculas con notorio efecto vasodilatador), lo que resulta en una modulación positiva del sistema vascular (Kobayashi et al., 2000). Debido al efecto inhibitorio de la ECA producido por el EESH, el mecanismo involucrado en el cambio de expresión del gen *Ace* podría estar asociado al observado con la administración de captopril, ya que nuestros resultados muestran que la administración del EESH ejerce un efecto similar al observado por la administración de captopril, produciendo un incremento en la expresión del gen *Ace* hasta valores iguales al mostrado por las ratas tratadas con captopril, sin embargo, este incremento no fue igual a los valores observados en las ratas sanas. Posiblemente con una mayor dosis de extracto se pueda obtener una mayor expresión del gen *Ace*.

Las ratas con hipertensión también mostraron un aumento en la expresión del gen *Agtr1a*, con respecto a las ratas sanas. Este proceso puede estar relacionado con la disminución en la producción de ANGII y receptor AT2 que, a su vez, produce una disminución en la síntesis de ON y de ECA. También se ha descrito que cuando existe un bloqueo en la síntesis del receptor AT1, se inhibe el circuito de retroalimentación negativa mediante el cual el receptor AT1 inhibe la secreción de renina de las células yuxtaglomerulares, lo que conduce a un aumento de la

secreción de renina y de los niveles de ANG II. Por lo tanto, este proceso de retroalimentación negativa se encuentra habilitado cuando el receptor AT1 aumenta (Carey & Siragy, 2003). Efectos similares se han observado en estudios con administración de fármacos antihipertensivos y la síntesis de receptores de angiotensina. En un estudio realizado por Hara y cols. (2001), se midieron los niveles de expresión del gen *Agtr1a* en ratas hipertensas que mostraban daño renal y que fueron tratadas con quinapril (un inhibidor de la ECA), encontrando que las ratas presentaban niveles de expresión del gen *Agtr1a* similares a los mostrados por las ratas sanas. Nuestros resultados muestran que al administrar captopril a las ratas con hipertensión, los niveles de expresión del gen *Agtr1a* fueron similares a los obtenidos en las ratas sanas. Estos datos también concuerdan con la respuesta obtenida en el estudio de Hara y cols. en ratas con hipertensión, ya que se ha observado que la inducción de hipertensión con L-NAME incrementa la expresión del gen *Agtr1a*, por tanto, la inhibición de la ECA estimula la producción de ON y bradicinina, ambos vasodilatadores, que producen a una retroalimentación positiva para la regulación de la PA (Hara et al., 2001).

Aunque no se ha reportado el análisis de extractos de salvas sobre la expresión de los genes *Ace* y *Agtr1a*, se ha comprobado que mediante otros mecanismos se producen cambios en la expresión y actividad de moléculas que favorecen la relajación de los vasos sanguíneos.

Mota (2012) analizó la administración de un extracto metanólico de semilla de chía sobre anillos de aorta de rata, encontrando un efecto vasorelajador similar al registrado por el grupo control.

La modulación de la PA implica una regulación dinámica en el proceso de homeostasis. Bajo condiciones experimentales con L-NAME se ha comprobado que se modifican diversos procesos de síntesis de moléculas de importancia fisiológica, siendo la síntesis de ANGII de gran relevancia para estimular la liberación de ON que, a su vez, influye en la producción de ECA y la unión de la ANGII con sus receptores (AT1 y AT2), ya que actúa como molécula de

señalización. En el estudio realizado por de Gennaro y cols. (2005), le indujeron hipertensión a ratas con L-NAME durante 8 semanas y encontraron una disminución significativa en la expresión del gen *Nos3*, y como consecuencia de ello, una disminución en la producción de ON y, por consiguiente, un desajuste en la dinámica de la regulación de la PA.

El tratamiento con captopril también produjo un aumento en la expresión de *Nos3* en las ratas con hipertensión. En 1993, Gohlke y cols. encontraron que al administrar los inhibidores de ECA ramipril y prindopril a ratas espontáneamente hipertensas, se produjo un aumento de la guanil monofosfato ciclasa (GMPc), fundamental en la regulación de la fosforilación del musculo y derivada de la síntesis de ON, datos que también fueron reportados por Wiemer y cols., en 1991, quienes encontraron que la administración de inhibidores de la ECA en una línea de cultivo celular de endotelio produjo un incremento en la producción de GMPc. Este aumento de GMPc está estrechamente relacionado con un incremento en la producción de entotelinas que, a su vez, estimulan la secreción de ON (Baltazares et al., 2005).

Se han encontrado cambios en la expresión de diversos genes involucrados en la regulación de la PA al administrar extractos de plantas de la familia de las salvias con respecto al gen *Nos3*. Steinkamp-Fenske y cols. analizaron el efecto de la administración de extracto de *Salvia milthiorriza* en una línea celular derivada de endotelio umbilical humano, encontrando una respuesta dependiente de la concentración de extracto administrado; los autores reportan una sobre regulación de la ONSe en las células tratadas, en comparación con el control y atribuyen este efecto a la presencia del ácido ursólico, el cual produce un incremento de la GMPc (Steinkamp-Fenske et al., 2007).

En un estudio similar, Zhou y cols. (2006) probaron el efecto de un derivado de la *Salvia milthiorriza* en una línea celular umbilical derivada de endotelio, en la que encontraron que la criptotanshinona (un diterpeno quinoide natural) produce una disminución en la síntesis/actividad de endotelina-1 y un aumento de la

expresión/actividad del ON basal. Estos datos sugieren que la criptotanshinona disminuye la endotelina por un mecanismo relacionado al factor de necrosis tumoral- α , sin afectar la vía del óxido nítrico, lo que ejerce un efecto vasodilatador en el endotelio vascular (Zhou et al., 2006). Aunque la ONSe se caracterizó inicialmente como una enzima expresada constitutivamente, se ha puesto de manifiesto que la expresión de la ONSe puede ser potenciada o disminuida por estímulos fisiológicos (Schmitt & Dirsch, 2009).

El efecto hipotensor de extractos de especies vegetales ha sido asociado con la presencia de compuestos antioxidante de origen fenólico que se encuentran en las salvias. La administración de resveratrol en concentraciones de 0.1 μ M en una línea celular umbilical derivada de endotelio produce una regulación en la expresión de la ONSe después de 24 h de tratamiento; y la administración de resveratrol y quercetina (0.1 μ M de cada uno) disminuye la expresión de la endotelina 1. Este efecto también se ha reportado con la administración de extractos de vino tinto ricos en polifenoles. En células endoteliales de aorta de bovino se observó que la administración de 6.25 – 25 μ g/ml de extracto de vino tinto rico en polifenoles, disminuye la transcripción de endotelina 1 (Nicholson et al., 2008).

Wallerath y cols. (2005) reportaron que la quercetina inhibió la expresión de ONSe, el ácido cinámico fue un potenciador de la expresión de ONSe, mientras que la cianidina, el ácido p-cumárico, ácido cafeico y los ácidos benzoico y vanílico, también aumentaron la expresión de ONSe moderadamente. Por lo tanto, el aumento de la ONSe en respuesta a compuestos presentes en el vino tinto implica una importante contribución del trans-resveratrol y contribuciones menores de los ácidos cinámico e hidroxicinámico, cianidina y algunos ácidos fenólicos.

La expresión del gen *Bdkrb2* no presentó cambios en el tejido cardiaco de las ratas sometidas a los diferentes tratamientos (ratas sanas, hipertensas, tratadas con captopril y tratadas con EESH). El gen *Bdkrb2* que codifica para el receptor 2 de bradicinina del sistema caliceína cinina para regular la PA ha sido propuesto

como gen constitutivo ya que no presenta cambios en su expresión en células sometidas a diferentes tratamientos (Ellis & Fozard, 2002; Fox et al., 2003; Medeiros et al., 2004), y los resultados aquí presentados coinciden con ese postulado.

VIII. CONCLUSIONES

- El rendimiento del extracto etanólico de semilla de *Salvia hispánica* L. (EESH) fue menor al reportado en otras especies vegetales; sin embargo, mostró un alto contenido de compuestos fenólicos.
- El EESH mostró tener un efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).
- La administración de EESH en un modelo de ratas con hipertensión produjo un efecto hipotensor similar al obtenido con la administración de captopril.
- El tratamiento con captopril en ratas con hipertensión modificó la expresión de los genes *Ace*, *Agtr1a* y *Nos3*; mostrando niveles estadísticamente iguales a los niveles basales (ratas sanas).
- El tratamiento con EESH en ratas con hipertensión modificó la expresión de los genes *Agtr1a* y *Nos3*; mostrando niveles estadísticamente iguales a los niveles basales (ratas sanas). La expresión del gen *Ace* no mostró cambios con respecto a las ratas hipertensas.
- La expresión del gen *Bdkrb2* no mostró diferencias estadísticas en los diferentes tratamientos.
- El EESH tiene potencial para ser usado en el desarrollo de agentes coadyuvantes en el tratamiento de la hipertensión debido al efecto sobre las enzimas y receptores que participan en la regulación de la PA.

IX. REFERENCIAS

- Afkir, S., Nguielefack, T. B., Aziz, M., Zoheir, J., Cuisinaud, G., Bnouham, M., ... Ziyayat, A. (2008). Arbutus unedo prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of Arbutus unedo in L-NAME-induced hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.029>
- Alimpić, A., Oaldje, M., Matevski, V., Marin, P. D., & Duletić-Laušević, S. (2014). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of Salvia amplexicaulis Lam. extracts. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 307–316. <https://doi.org/10.2298/ABS1401307A>
- Andres-Lacueva, C., & Zamora-Ros, R. (2010). Wanted: specific nutritional biomarkers for food consumption for the study of its protective role in health. *The British Journal of Nutrition*, 103(3), 307–308. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992327>
- Antonaccio, M., Rubin, B., Horovitz, Z., Laffan, R., Goldberg, M., High, J., & Harris, D. (1979). Effects of chronic treatment with captopril (SQ 14,225), an orally active inhibitor of angiotensin I-converting enzyme, in spontaneously hypertensive rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 29(2), 285–294. <https://doi.org/10.1254/jjp.29.285>
- AOAC. (2000). *Tannin in distilled liquors. Spectrophotometric method.*
- Apostolidis, E., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2007). Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>
- Arenas-Carvajal, R., Pachón-Gómez, E., Méndez-Callejas, G., & Guzmán- Avendaño, A. (2009). Estudio del efecto inhibitorio de extractos de Salvia scutellarioides sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina. *Universitas Scientiarum*, 14(2–3), 141–150.
- Arnal, J. F., Warin, L., & Michel, J. B. (1992). Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *The Journal of Clinical Investigation*, 90(2), 647–652. <https://doi.org/10.1172/JCI115906>
- Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8 Supp B), 9–20. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9>
- Ayerza, R. (2011). The seed's oil content and fatty acid composition of chia (Salvia hispanica L.) var. Iztac 1, grown under six tropical ecosystems conditions. *Interciencia*, 36, 620–624.
- Bader, M. (2009). Kallikrein–kinin system in neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 617 LP-619. Retrieved from <http://atvb.ahajournals.org/content/29/5/617.abstract>
- Bader, M., & Ganten, D. (2008). Update on tissue renin–angiotensin systems. *Journal of Molecular Medicine*, 86(6), 615. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0336-0>
- Baltazares, M., Rodríguez, H., Ortega, J., Sotres-Vega, A., & Baltazares, M. (2005). Sistema endotelina. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 18(4), 308–320.
- Barbosa-Filho, J., Martins, V., Rabelo, L., Moura, M., Silva, M., Cunha, E., ... Medeiros, I. (2006). Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between

- 1980 - 2000. *Revista Brasileña de Farmacognosia*, 16(3), 421–446.
- Bell, H. (2011). Hipertensión arterial conducente a enfermedad cerebrovascular por incumplimiento del plan medicamentoso. *MEDISAN*, 15(2), 204–208.
- Benavides, M., & Pinzón, A. (2008). Oxido nítrico. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0120-3347\(08\)61007-2](https://doi.org/10.1016/S0120-3347(08)61007-2)
- Bhadoriya, U., Tiwari, S., Sharma, P., Bankey, S., & Mourya, M. (2011). Diuretic activity of extract of *Salvia officinalis* L. *Asian Journal of Pharmacy & Life Science*, 1(1), 24–28.
- Brook, R., & Julius, S. (2000). Autonomic imbalance, hypertension, and cardiovascular risk. *American Journal of Hypertension*, 13(S4), 112S–122S. Retrieved from <http://ajh.oxfordjournals.org/content/13/S4/112S.short>
- Cahill, J. P. (2004). Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51, 773–781.
- Campbell, D., Alexiou, T., Xiao, H., Fuchs, S., Mckinley, M., Corvol, P., & Bernstein, K. (2004). Effect of reduced angiotensin-converting enzyme gene on angiotensin and bradykinin peptide levels in mice. *Hypertension*, 43, 854–859. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000119190.06968.f1>
- Carey, R. M., & Siragy, H. M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*, 24(3), 261–271. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0001>
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., & Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Química E Ingeniería Química*, 6(2), 9–20. Retrieved from <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4822/3893>
- Consejo Canadiense de Protección de los Animales. (1998). *Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación*. (E. Olfert, B. Cross, & A. McWilliam, Eds.). Retrieved from <http://www.ccac.ca>
- Contreras, F., Terán, L., Barreto, N., de la Parte, M., Simonovis, N., & Velasco, M. (2000). Aspectos funcionales del sistema renina angiotensina aldosterona y bloqueantes de los receptores AT1 de angiotensina II en hipertensión arterial. *Archivos Venezolanos de Farmacología Y Terapéutica*, 19(2).
- Cruz, M. (2001). Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México. *Archivos de Cardiología de México*, 71(1), 192–197.
- Cunha, R. S., Cabral, A. M., & Vasquez, E. C. (1993). Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *American Journal of Hypertens.*, 6, 806–809.
- de Dios, A. (2011). Empleo de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina en el tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Argentina de Cardiología*, 79(2), 103–105.
- de Gennaro, V., Rigamonti, A., Fioretti, S., Bonomo, S., Manfredi, B., Ferrario, P., ... Rossoni, G. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT 1-receptor antagonism equally improve endothelial vasodilator function in L-NAME-induced hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, 516(3), 253–259.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.04.004>

- de Kloet, A., Krause, E., & Woods, S. (2010). The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiology & Behavior*, *100*, 525–534. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.03.018>
- de Sousa, R., Penalva, L., Morcotte, E., & Vogel, C. (2009). Computational and systems biology themed issue. *Molecular BioSystems*, *5*, 1512–1526. <https://doi.org/10.1039/b908315d>
- Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, *336*(6078), 237–240. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/336/6078/237.abstract>
- Dorrance, M., Lewis, R., & Mills, T. (2002). Captopril treatment reverses erectile dysfunction in male stroke prone spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Impotence Research*, *14*(6), 494–497. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3900915>
- Durling, N., Catchpole, O., Grey, J., Webby, R., Mitchell, K., Foo, L., & Perry, N. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, *101*, 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.050>
- Ellis, K., & Fozard, J. (2002). Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. *Autonomic and Autacoid Pharmacology*, *22*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1046/j.1474-8673.2002.00230.x>
- Erdős, E. (1990). Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*, *16*, 363–370. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.16.4.363>
- Eriz, G., Sanhueza, V., Roeckel, M., & Fernández, K. (2011). Inhibition of the angiotensin-converting enzyme by grape seed and skin proanthocyanidins extracted from *Vitis vinifera* L. cv. País. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.034>
- Espinoza, J., & Castillo, R. (1997). Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. *Revista Peruana de Cardiología*, *23*(3), 104–106.
- Feldstein, C., & Romero, J. (2007). El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, *2*(2), 49–58.
- Fernández-Alfonso, M. S., Kreutz, R., Zeh, K., Liu, Y., Ganten, D., & Paul, M. (1994). Differential regulation of vascular angiotensin I-converting enzyme in hypertension. *Hypertension*, *24*(3), 280–286. Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/content/24/3/280.abstract>
- Fernández, C., & Gallego, C. (1995). Utilidad terapeutica de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Farmacia Hospitalaria*, *19*(1), 3–9.
- Fox, A., Wotherspoon, G., McNair, K., Hudson, L., Patel, S., Gentry, C., & Winter, J. (2003). Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptor in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain*, *104*(3), 683–691.
- Fujita, H., & Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, *44*(1–2), 123–127. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(99\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00118-6)

- Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, 264(3), 224–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x>
- Gamboa, R. (2006). Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 76–82.
- García, P., Urrego, J., D'Achiardi, R., & Delgado, V. (2004). Hipertensión arterial: diagnóstico y manejo. *Universitas Médica*, 45(2), 77–84.
- Gohlke, P., Lamberty, V., Kuwer, I., Bartenbach, S., Schnell, A., Linz, W., ... Unger, T. (1993). Long-term low dose angiotensin converting enzyme inhibitor treatment increases vascular cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate. *Hypertension*, 22, 682–687.
- Gómez, J., & Guerrero, M. (2009). Evaluación de los efectos cardiovasculares del extracto y compuestos de *Solanum tuberosum*. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 16(3), 320–326.
- González, V. (2011). *Efecto hipotensor e inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I de extractos de semillas de Salvia hispanica L. in vitro e in vivo*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/5694/1/1080224568.PDF>
- Gorocica, P., Chávez, R., Lascrain, R., Espinosa, B., & Zenteno, E. (1999). Óxido nítrico: una molécula multifuncional. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 12(4), 300–304.
- Granados, G., Roales-Nieto, J., Moreno, E., & Ybarra, J. (2007). Creencias en síntomas y adherencia al tratamiento farmacológico en pacientes con hipertensión. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 7(3), 697–707.
- Granato, D., Branco, G., Gomes, A., Fonseca, J., & Shah, N. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
- Griffiths, H. R., Møller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-freddari, C., Collins, A., ... Verhagen, H. (2002). Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, 23, 101–208.
- Gu, D., Zhao, Q., Kelly, T. N., Hixson, J. E., Rao, D. C., Cao, J., ... He, J. (2012). The role of the kallikrein-kinin system genes in the salt sensitivity of blood pressure. *American Journal of Epidemiology*, 176(7), 72–80. <https://doi.org/10.1093/aje/kws277>
- Gutiérrez, J., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., ... Hernández-Ávila, M. (2012). *Encuesta nacional de salud y nutrición. Resultados nacionales 2012*. Instituto Nacional de Salud Pública (1era ed.). Cuernavaca, México. Retrieved from <http://ensanut.insp.mx/index.php#.WAlz9PnhC00>
- Hara, K., Kobayashi, N., Watanabe, S., Tsubokou, Y., & Matsuoka, H. (2001). Effects of quinapril on expression of eNOS, ACE, and AT1 receptor in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 14(4 I), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(00\)01283-8](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(00)01283-8)
- Harris, R., Mitchell, T., Simpson, J., Redmann, S., Youngblood, B., & Ryan, D. (2002). Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1), 77–88.

- Harris, R., Zhou, J., Youngblood, B., Rybkin, I., Smagin, G., & Ryan, D. (1998). Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *The American Journal of Physiology*, 275(6 Pt 2), 1928–1938. Retrieved from <http://ajpregu.physiology.org/content/275/6/R1928.abstract>
- Heeneman, S., Sluimer, J. C., & Daemen, M. J. A. P. (2007). Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circulation Research*, 101(5), 441–454. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.148338>
- Hernández, J., & Miranda, S. (2008). Caracterización morfológica de chía (*Salvia hispanica*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(2), 105–113.
- Hillmeister, P., & Persson, P. (2012). The kallikrein-kinin system. *Acta Physiologica*, 206, 215–219. <https://doi.org/10.1111/apha.12007>
- Hooper, N., & Turner, A. (1987). Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. *The Biochemical Journal*, 241(3), 625–633. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1147610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Inada, Y., Terashita, Z., Imura, Y., Tanabe, M., Nishikawa, K., & Kikuchi, S. (1986). Inhibition of angiotensin converting enzyme by CV-3317, a non-sulphydryl compound. *Japanese Journal of Pharmacology*, 42(7), 99–108.
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2013). Hipertensión. In *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa. Nuevo León* (pp. 58–59).
- Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tom, M. C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.009>
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59, 5–13.
- Joint National Committee. (2004). *Prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2>
- Kobayashi, N., Hara, K., Watanabe, S., Higashi, T., & Matsuoka, H. (2000). Effect of imidapril on myocardial remodeling in L-NAME-induced hypertensive rats is associated with gene expression of NOS and ACE mRNA. *American Journal of Hypertension*, 13(2), 199–207. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(99\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(99)00117-X)
- Kostennikova, Z. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*, 33(6), 83–86.
- Kwon, Y., Vatter, D., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107–118. <https://doi.org/10.1210/er.19.5.583>
- Lee, R., Berecek, K., Tsoporis, J., McKenzie, R., & Triggle, C. (1991). Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension*, 17(2), 141–150. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.17.2.141>
- Leiva, L., del Pozo, H., & Pérez, D. (2000). Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial.

Revista Cubana de Medicina, 39(3), 174–179.

- Levinsky, N. (1979). The renal kallikrein-kinin system. *Circulation Research*, 44, 441–451. <https://doi.org/10.1161/01.RES.44.4.441>
- Lima, M., Nuccio, L., Villalobos, M., Torres, C., & Balladares, N. (2010). Sistema renina angiotensina y riesgo cardio-metabólico. *Revista Venezolana de Endocrinología Y Metabolismo*, 8(1), 3–10.
- Linz, W., Wohlfart, P., Schölkens, B. A., Malinski, T., & Wiemer, G. (1999). Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovascular Research*, 43(3), 549–561. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00091-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00091-7)
- López, A., & Ortega, A. (2014). *Caracterización de semilla de chía (Salvia hispanica L.): identificación parcial de compuestos fenólicos y capacidad de inhibición de la enzima conveetidora de angiotensina I*. Universidad Autónoma de NUevo León.
- Lu, Y., & Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75, 197–202.
- Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, B., & Pritchett-Corning, K. (2012). Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *Journal of Visualized Experiments*, 1–8. <https://doi.org/10.3791/2771>
- Macías, I., Cordiés, L., Landrove, O., Pérez, D., Vázquez, A., Alfonso, J., & Martín, I. (1999). Programa nacional de prevención, diagnóstico, evaluación y control de la hipertensión arterial. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 15, 46–87. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251999000100009&nrm=iso
- Marchesi, C., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2008). Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 367–374. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.003>
- Margaret, A. (2004). *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. ILSI Europe concise Monograph series. [https://doi.org/ISBN 1-57881-157-0](https://doi.org/ISBN%201-57881-157-0)
- Marinova, E., & Yanishlieva, N. (1997). Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58(3), 245–248. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00223-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00223-3)
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A. S., Pesquero, B., ... Calixto, B. (2004). Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear. *Circulation Research*, 94, 1375–1382. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000128404.65887.08>
- Medina. (2014). Sistema calicreína-cinina. Retrieved from <http://slideplayer.es/slide/5560416/>
- Megías, C., Yust, M., Pedroche, J., & Lquari, H. (2004). Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *Journal of Agricultural*, 52, 1928–1932. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf034707r>
- Merlini, P. A., Carnovali, M., & Ardissino, D. (2004). Vascular protection: paradigm for the treatment of patients at high cardiovascular risk. *Journal of Applied Research*, 4(2), 355–368.
- Miguel-Carrasco, J. L., Mate, A., Monserrat, M. T., Arias, J. L., Aramburu, O., & Vázquez, C. M.

- (2008). The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *American Journal of Hypertension*, 21(11), 1231–1237. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.271>
- Millone, M., Olagnero, G., & Santana, E. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *DIAETA*, 29(134), 7–15.
- Morales, F., & Estañ, L. (2010). Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina. *Hipertensión Y Riesgo Vascular*, 27(5), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.hipert.2009.09.002>
- Mota, J. (2012). *Determinación del efecto vasorelajador del extracto metanólico de Salvia hispanica L. en anillos de aorta en ratas*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Nakmareong, S., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Donpunha, W., Kukongviriyapan, V., Kongyingyoes, B., ... Phisalaphong, C. (2011). Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 383(5), 519–529. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0624-z>
- Nicholson, S. K., Tucker, G. a, & Brameld, J. M. (2008). Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(1), 42–47. <https://doi.org/10.1017/S0029665108006009>
- Ordúñez, P., la Rosa, Y., Espinosa, A., & Álvarez, F. (2010). Hipertensión arterial: recomendaciones básicas para la prevención, detección, evaluación y tratamiento. *Revista Científica Médica de Cienfuegos*, 10, 7–26.
- Ortega, A. (2016). *Identificación de la actividad inhibitoria presente en extractos de semilla de chía (Salvia hispanica L.) sobre la enzima convertidora de angiotensina*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Park, S. U., Uddin, M. R., Xu, H., Kim, Y. K., & Lee, S. Y. (2008). Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. *African Journal of Biotechnology*, 7(25), 4959–4965. <https://doi.org/10.5897/AJB08.088>
- Pascuzzo-Lima, M. (2008). Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. In *Farmacología básica 2008* (p. 927).
- Pechánová, O., Bernátová, I., Babál, P., Martínez, M. C., Kyselá, S., Stvrtina, S., & Andriantsitohaina, R. (2004). Red wine polyphenols prevent cardiovascular alterations in L-NAME-induced hypertension. *Journal of Hypertension*, 22(8), 1551–1559.
- Peiretti, P., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2–4), 267–275. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.04.006>
- Petersen, M. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00513-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7)
- Puiggròs, F., Solà, R., Bladé, C., Salvadó, M. J., & Arola, L. (2011). Nutritional biomarkers and foodomic methodologies for qualitative and quantitative analysis of bioactive ingredients in dietary intervention studies. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7399–7414. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.08.051>
- Quiróz, G. (1997). Hipertensión arterial sistólica. *Revista Peruana de Cardiología*, 23(3), 57–61.

- Ramírez, J., Palacios, M., & Gutiérrez, O. (2006). Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Medica*, *37*(1), 53–60.
- Reverte, D., Moreno, J., & Ferreira, E. (1998). Hipertensión arterial: actualización de su tratamiento. *Sistema Nacional de Salud*, *22*(4), 81–94.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. A. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, *107*(2), 656–663. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.062>
- Reyes-Moreno, E. (2010). Evaluación farmacológica de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Revista Salud, Historia Y Sanidad On-Line; Vol. 5, Núm. 1 (2010)*. Retrieved from <http://revistas.uptc.edu.co/index.php/shs/article/view/1884>
- Ribera, M., & Caballero, I. (2014). Crisis hipertensiva. *Actualización En Medicina de Familia*, *10*(2), 89–94.
- Ringoir, L., Widdershoven, J., Pedersen, S., Keyzer, J., & Pop, V. (2014). Symptoms associated with an abnormal echocardiogram in elderly primary care hypertension patients. *Netherlands Heart Journal*. <https://doi.org/10.1007/s12471-014-0543-y>
- Rivera, G., Bocanegra-García, V., & Monge, A. (2010). Traditional plants as source of functional foods: a review. *Journal of Food*, *8*(2), 159–167. <https://doi.org/10.1080/19476330903322978>
- Rosas, M., Lara, A., Pastelín, G., Velázquez, O., Martínez, J., Méndez, A., ... Attie, F. (2005). Re-encuesta nacional de hipertensión arterial (RENAHTA): consolidación mexicana de los factores de riesgo cardiovascular. Cohorte nacional de seguimiento. *Archivos de Cardiología de México*, *75*(1), 96–111.
- Rosas, M., Pastelín, G., Martínez, J., Herrera-Acosta, J., & Attie, F. (2004). Hipertensión arterial en México. Guías y recomendaciones para su detección, control y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*, *74*, 134–157.
- Sánchez, R., Ayala, M., Baglivo, H., Velázquez, C., Burlando, G., Kohlmann, O., ... Zanchetti, A. (2010). Guías latinoamericanas de hipertensión arterial. *Revista Chilena de Cardiología*, *29*, 117–144.
- Sang-Hoon, L., Zhong-Ji, Q., & Se-Kwon, K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, *118*(1), 96–102. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.086>
- Santeliz, H., Romano, L., González, A., & Hernández, H. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, *19*(1), 21–29.
- Schmitt, C. A., & Dirsch, V. M. (2009). Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*, *21*(2), 77–91. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.05.006>
- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., ... Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, *473*(7347), 337–342. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature10098>
- Sellén, J., Sellén, E., Barroso, L., & Sellén, S. (2009). Evaluación y diagnóstico de la hipertensión

arterial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 1(28), 1–19.

- Stanojević, L., Stanković, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ristić, D., Čanadanovic-Brunet, J., & Tumbas, V. (2009). Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Hieracium pilosella* L. extracts. *Sensors*, 9(7), 5702–5714. <https://doi.org/10.3390/s90705702>
- Steinkamp-Fenske, K., Bollinger, L., Völler, N., Xu, H., Yao, Y., Bauer, R., ... Li, H. (2007). Ursolic acid from the chinese herb danshen (*Salvia miltiorrhiza* L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells. *Atherosclerosis*, 195(1), e104–e111. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.028>
- Taga, M., Miller, E., & Pratt, D. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(5), 928–931. <https://doi.org/10.1007/BF02542169>
- Tanaka, T., Nishimura, A., Kouno, I., Nonaka, G., & Yang, C.-R. (1997). Four new caffeic acid metabolites, yunnaneic acids E-H, from *Salvia yunnanensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(10), 1596–1600. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3229>
- Tang, C., Wu, A. H., Xue, H. L., & Wang, Y. J. (2007). Tanshinone IIA inhibits endothelin-1 production in TNF- α -induced brain microvascular endothelial cells through suppression of endothelin-converting enzyme-1 synthesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 28(8), 1116–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00598.x>
- Trabelsi, N., Megdiche, W., Ksouri, R., Falleh, H., Oueslati, S., Soumaya, B., ... Abdelly, C. (2010). Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 632–639. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.11.003>
- Trevethan, S. (2001). Inhibidores de la enzima convertidora o bloqueadores de receptores AT1. *Archivos de Cardiología de México*, 71(1), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2007.05.003>
- Vázquez, A., Cruz, N., Vázquez, A., & Milián, A. (1998). Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina en el tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Cubana de Farmacología*, 32(3), 204–210.
- Velarde, V. (2002). Participación del sistema caliceina-cininas en la diabetes mellitus. *Clínica Y Ciencia*, 1(4), 15–19.
- Verhagen, H., Coolen, S., Duchateau, G., Hamer, M., Kyle, J., & Rechner, A. (2004). Assessment of the efficacy of functional food ingredients-introducing the concept “kinetics of biomarkers.” *Mutation Research*, 551(1–2), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.01.013>
- Vila, M. (2000). Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Revista de La Federación Argentina de Cardiología*, 28, 501–507.
- Villard, E., & Soubrier, F. (1996). Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*, 32, 999–1007.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. ., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas Y Aceites*, 51, 361–365. <https://doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i5.438>
- Wallerath, T., Li, H., Gödtel-Ambrust, U., Schwarz, P. M., & Förstermann, U. (2005). A blend of

polyphenolic compounds explains the stimulatory effect of red wine on human endothelial NO synthase. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 12(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.12.004>

- Wang, X., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K. H. (2007). New developments in the chemistry and biology of the bioactive constituents of Tanshen. *Medicinal Research Reviews*, 27(1), 133–148. <https://doi.org/10.1002/med.20077>
- Wiemer, G., Scholkens, B. A., Becker, R. H. A., & Busse, R. (1991). Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin. *Hypertension*, 18(4), 558–563.
- Wilson, J., Hayes, M., & Carney, B. (2011). Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chemistry*, 129, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.081>
- Winkler, W., Cohen-chalamish, S., & Breaker, R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 15908–15913.
- Wu, J., Aluko, R., & Muir, A. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950(1–2), 125–130. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00052-3)
- You, Z., Xin, Y., Liu, Y., Han, B., Zhang, L., Chen, Y., ... Xuan, Y. (2012). Protective effect of *Salvia miltiorrhizae* injection on N(G)-nitro-d-arginine induced nitric oxide deficient and oxidative damage in rat kidney. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(5), 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.10.013>
- Zeng, Y., Pu, X., Du, J., Yang, S., Yang, T., & Jia, P. (2012). Use of functional foods for diabetes prevention in China. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(35), 2570–2579. <https://doi.org/10.5897/AJPP12.119>
- Zhou, Z., Wang, S.-Q., Liu, Y., & Miao, A.-D. (2006). Cryptotanshinone inhibits endothelin-1 expression and stimulates nitric oxide production in human vascular endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.009>

ANEXO 1

Identificación de los genes a analizar

Nos3 nitric oxide synthase 3 [*Rattus norvegicus* (Norway rat)]
Gene ID: 24600, updated on 20-Feb-2017

Summary

Official Symbol Nos3 provided by RGD
Official Full Name nitric oxide synthase 3 provided by RGD
Primary source [RGD:3186](#)
See related [Ensembl:ENSRNOG00000009348](#)
Gene type protein coding
RefSeq status PROVISIONAL
Organism [Rattus norvegicus](#)
Lineage Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus

Also known as
Summary enzyme that synthesizes Nitric oxide from L-arginine [RGD, Feb 2006]
Orthologs [human](#) [mouse](#) [all](#)

Genomic context

Location: 4q11 See Nos3 in [Genome Data Viewer](#) [Map Viewer](#)
Exon count: 26

Búsqueda de la secuencia de RNAm del gen de interés

Nucleotide ▾ Nos3 rattus norvegicus
[Create alert](#) [Advanced](#)

Summary ▾ 20 per page ▾ Sort by Default order ▾ Send: ▾

See **Nos3** nitric oxide synthase 3 in the Gene database
nos3 reference sequences [Transcript \(2\)](#) [Protein \(2\)](#)

Items: 19

[Rattus norvegicus](#) nitric oxide synthase 3 (**Nos3**), mRNA
1. 3,953 bp linear mRNA
Accession: NM_021838.2 GI: 46409655
[GenBank](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

Diseño de oligonucleótidos específicos en RNAm

Rattus norvegicus nitric oxide synthase 3 (Nos3), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_021838.2

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NM_021838.2 Rattus norvegicus nitric oxide synthase 3 (Nos3), mRNA
GCTGGCATGGGCAACTTGAAGAGTGTGGGCCAGGAGCCTGGGCCACCCTGTGGCCTAGGGCTCGGGCTGG
GCCTAGGGCTATGCGGCAAGCAGGGCCCAGCCTCACCGGCACCAGAGCCTAGCCAGGCACCCAGTACCCCC
GTCCCCAACCCGACCAGCACCAGACCACAGCCCCCCCCGTTAACCCGGCCCCCAGACGGACCCAAAGTTTCCT
CGAGTAAAGAACTGGGAAGTGGGCAGCATCACCTACGATACCCTCAGTGCACAGGCTCAGCAGGATGGGC
CCTGTACCCCAAGACGCTGCTTGGGATCCCTGGTATTTCCAAGGAAGTTACAGAGCCGGCCACCCAGGG
CCCTTACCCTACTGAGCAGTATTGGGTCAAGCCCCGGGACTTCATCAATCAGTACTATAACTCGATCAAAA
AGGAGTGGTTCACAGGCTCATGAGCAGCGGCTTCAGGAAGTGGAAAGCTGAGGTGGTGGCCACGGGCACCT
ACCAGCTCCGGGAGAGTGAGCTGGTGTGGGGCCAAACAGGCTGGCGCAACGCTCCCCGCTGTGTGGG
GCGGATCCAGTGGGGGAAACTGCAGGTATTTGATGCTCGGGACTGCAGGACAGCAGGAAATGTTCAACC
TACATCTGTAACCACATTAAGTATGCAACAAACCCGAGGCAATCTTCGTTCCAGCCATCACGGTGTTCCTCC
AGCGCTACGCTGGCCGGGGAGACTTCCGGATCTGGAACAGCCAGCTGGTGCAGCTACGCGGGCTATAGGCA
GCAGGACGGCTCTGTGCGAGGGGACCCTGCCAACGTGGAGATCACTGAGCTCTGTATTCAACATGGCTGG
ACCCAGGAAATGGCCGCTTTGATGTGCTGCCCTGCTACTCCAGGCTCCCGATGAGCCCCCAGAACTCT
TCACTCTGCCCCCAGAGCTGGTCTCGAGGTGCCTCTGGAGCACCCACGCTAGAGTGGTTTGTGCCCT
TGGCCTGCGCTGGTATGCCCTCCAGCTGTGTCCAATATGCTGCTAGAAATCGGGGGCTGGAGTTCCG
GCTGCCCTTTTCAGCGGCTGGTACATGAGTTCAGAGATTGGCATGAGGGACCTGTGTGACCCCTACCGAT
ACAACATACTTGAGGATGTGGCTGTCTGCATGGATCTAGACACCCGGACAACCTCATCACTGTGGAAAGA
CAAGGCAGCAGTGGAAATTAACGTGGCTGTGCTGTACAGTTACCAGCTGGCCAAAGTGACCATTGTGGAC
CACCATGCCGCCACAGCTCCTTCATGAAGCACTTGGAAAATGAGCAGAAGGCCAGAGGGGGCTGCCCCG
CTGACTGGGCTGGATCGTGGCCCCCATCTCAGGCAGCCTCACCCCTGTCTTCCATCAAGAGATGGTCAA
CTATTTCCGTCCCTGCCCTTCCGCTACCAGCCTGACCCCTGGAAAGGAAGTGACGAAAAGGCACAGGC
ATCACCAGGAAGAAGACTTTAAGGAAGTAGCCAATGCAGTGAAGATCTCTGCCTCACTCATGGGCACGG
TGATGGCGAAGCGTGTGAAGGCGACTATCCTGTATGGCTCTGAGACTGGCCGCGCCAGAGCTACGCACA
GCAGCTGGGGAGGCTCTTTCGGAAGGCGTTTGACCCCGGGTCTGTGCATGGATGAATACGATGTGGTA
TCCCTAGAGCATGAGGCCCTGGTATGGTGGTGACCAAGCATTGGCAATGGGGATCCCCCGGAGAATG
GAGAGAGCTTTGCAGCAGCGCTGATGGAAATGTCGGGCCCTACAACAGCTCCCCCTGGCCTGAGCAGCA
CAAGAGTTACAAAATCCGATTCAACAGTGTCTCCTGCTCGGACCCACTGGTATCCTCTTGGCGGCGAAA
AGGAAGGAATCCAGTAACACAGACAGTGCAGGGGCCCTGGGCACCCTCAGGTTCTGTGTGTTTGGGCTGG
GCTCCAGAGCATACCCGCACTTCTGTGCCCTTGTGCGAGCGGTGGACACAAGGCTGGAGGAGCTGGCGGG
GGAGCGACTGTTGCAGCTGGGCCAGGGTGTGAGCTCTGCGGCCAGGAGGAGGCTTTCGAGGCTGGGCC
CAGGCAGCCTTCCAGGCTGCCTGTGAACTTTCTGTGTGGGAGAAGATGCCAAGGCTGCTGCCCGAGATA
TCTTCAGTCCCAAGCGCAGCTGGAAACGCCAGAGGTACCGGCTGAGTACCCAAGCTGAGAGCCTGCAATT
ACTGCCAGGGCTGACTCACGTGCACAGACGGAAGATGTTCCAGGCTACAATTCTTCTGTGGAGAACCTA
CAGAGCAGCAAATCCACCCGAGCCACAATCCTGGTGCCTGCTGGACTGGAAGCCAGGAGGGACTGCAGT
ACCAGCCAGGGGACCACATAGGTGTGTGCCACCCAACCGGCTGGCTAGTGGAGGCGCTGCTGAGCCG
```

ACAACATACTTGAGGATGTGGCTGTCTGCATGGATCTAGACACCCGGACAACTCATCACTGTGGAAAGA
CAAGGCAGCAGTGGAAATTAACGTGGCTGTCTGTACAGTTACCAGCTGGCCAAAGTGACCATTGTGGAC
CACCATGCCGCCACAGCCTCCTTCATGAAGCACTTGGAAAATGAGCAGAAGGCCAGAGGGGGCTGCCCCG
CTGACTGGGCCTGGATCGTGCCCCCATCTCAGGCAGCCTCACCCCTGTCTTCCATCAAGAGATGGTCAA
CTATTTCTGTCCCCTGCCTTCCGCTACCAGCCTGACCCCTGGAAAGGAAGTGACGCAAAAGGCACAGGC
ATCACCAGGAAGAAGACTTTTAAGGAAGTAGCCAATGCAGTGAAGATCTCTGCCTCACTCATGGGCACGG
TGATGGCGAAGCGTGTGAAGGCAGCTATCCTGTATGGCTCTGAGACTGGCCGCGCCAGAGCTACGCACA
GCAGCTGGGGAGGCTCTTTCGGAAGGCCTTGGACCCCGGGTCTGTGCATGGATGAATACGATGTGGTA
TCCCTAGAGCATGAGGCCTTGGTATTGGTGGTGACCAGCACATTTGGCAATGGGGATCCCCGGAGAATG
GAGAGAGCTTTGAGCAGCGCTGATGGAAATGTGGGGCCCTACAACAGCTCCCCTCGGCTGAGCAGCA
CAAGAGTTACAAAATCCGATTCAACAGTGTCTCCTGCTCGGACCCACTGGTATCCTCTTGGCGGCGAAA
AGGAAGGAATCCAGTAACACAGACAGTGCAGGGGCCCTGGGCACCCTCAGGTTCTGTGTGTTTGGGCTGG
GCTCCAGAGCATACCCGCACTTCTGTGCCTTGTCTGAGCGGTGGACACAAGGCTGGAGGAGCTGGGCGG
GGAGCGACTGTTGAGCTGGGCCAGGGTGATGAGCTCTGCGGCCAGGAGGAGGCTTTCGAGGCTGGGCC
CAGGCAGCCTTCCAGGCTGCCTGTGAACTTTCTGTGTGGGAGAAGATGCCAAGGCTGCTGCCGAGATA
TCTTCAGTCCCAAGCGCAGCTGGAAACGCCAGAGGTACCGGCTGAGTACCCAAGCTGAGAGCCTGCAATT
ACTGCCAGGGCTGACTCACGTGCACAGACGGAAGATGTTCCAGGCTACAATTCTTTCTGTGGAGAACCTA
CAGAGCAGCAAAATCCACCCGAGCCACAATCCTGGTGCCTGAGACTGGAGCCAGGAGGACTGCAGT
ACCAGCCAGGGGACCACATAGGTGTGTGCCACCCAACCGGCTGGCCTAGTGGAGGCGCTGCTGAGCCG
AGTGGAGGACCCCTCCGCCATCCACAGAGCCTGTGGCCGTGGAACAAGTGGAAAAAGGCAGCCCTGGTGGC
CCTCCCCCGGCTGGGTACGGGACCCCGGCTTCCCCATGTACGCTGCGCCAGGCTCTCACTTACTTCC
TGGACATCACTTCCCCGCCAGCCCTCGCCTTCTTCGACTGCTGAGCACCCCTGGCAGAGGAGTCCAGCGA
ACAGCAGGAGCTAGAGGCTCTTAGCCAGGACCCCGGCTACGAAGAATGGAAGTGGTTCCGCTGCCCC
ACACTGCTAGAGGTGCTGGAACAATTTCCATCCGTGGCACTGCCTGCCCCGCTGATCCTCACCCAGCTGC
CCCTGCTCCAGCCCCGGTACTACTCTGTGAGCTCAGCACCCAGCGCCACCCAGGAGAGATCCACCTCAIC
TGTAGCTGTGCTGGCATAACAGAACCCAGGATGTGCTGGGCCCTCTGCACTATGGGGTCTGTTCCACATG
ATGAGCCAACCTCAAGGCAGGAGACCCGGTGCCTGCTTCATCAGGGGGGCTCCCTCCTTCCGGCTGCCAIC
CTGATCCTAACTTGCTTGCATCCTGGTGGGCCAGGGACTGGTATTGCACCCTTCCGGGGATTCTGGCA
AGACCGATTACACGACATTGAGATCAAAGGACTGCAGCCTGCCCCATGACTTTGGTGTGGCTGCCGA
TGCTCCCAACTGGACCATCTCTACCGGGACGAGGTACTGGACGCCAGCAGCGTGGAGTGTGGACAAAG
TCCTCACCGCTTTTCCAGGGATCCTGGCAGCCCTAAGACCTATGTGCAAGACCTCTGAGGACAGAGCT
GGCCGCGGAGGTTACCGCGTGTGTGCCTCGAGCAAGGACACATGTTTGTCTGCGGTGATGTCACATAG
GCAACCAGCGTCTGCAAACCGTGCAGCGAATTTGGCAACAGAGGGCAGCATGGAGCTGGATGAAGCCG
GTGACGTATCGGCGTGTGCGGGATCAGCAACGCTACCACGAGGACATTTTCGGACTCACATTGCGCAIC
CCAGGAGGTGACGAGCCGATCCGCACCCAGAGTTTTCTTTGCAAGGAGCGACAGCTGAGGGGTGAGT
CCCTGGTCTTTGACCCGCTACCCAAGAAACACCTGGTTCTGACAATCTTCTTCCCTCCAGTTCCC
GAGAGAGGGACTGCGTCGCTTATTAGGTTGACCAAGGCCAAACACCCTCTCTGGAATGCCACAGCATC
AGTTGCGAGGCTGCCGATTTAAGAACTCTTCTCGGGGCTGGGGATTTAGCTCAGTGGTAAAGCGCTTG
CCTAGGAAGCGCAAGGCCCTGGGTTCCGTCGCCAGCTCCGGAAAAAATACTCTTCTCTCTCCA
GTTAACTAGACTGGGAGGGAGTCAACCTAAATCCTGAAGGTTCTCCGGCTGTGGTATTAGGACATCCT
GCTGCCCTCTCGTATGCTTTGATGGACTGTAG

Análisis de las secuencias de oligonucleótidos por PCR virtual

Primer pair 1					
		Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer		GACCCTCCGCCATCCACAGAGCCTG	25	70.53	68.00
Reverse primer		GCACCGGGTCTCCTGCCTTGAGTTGG	26	70.95	65.38
Products on target templates					
> XM_006235872.1 PREDICTED: Rattus norvegicus nitric oxide synthase 3 (Nos3), transcript variant X1, mRNA					
product length = 514					
Forward primer	1	GACCCTCCGCCATCCACAGAGCCTG	25		
Template	2487	2511		
Reverse primer	1	GCACCGGGTCTCCTGCCTTGAGTTGG	26		
Template	3000	2975		
> NM_021838.2 Rattus norvegicus nitric oxide synthase 3 (Nos3), mRNA					
product length = 514					
Forward primer	1	GACCCTCCGCCATCCACAGAGCCTG	25		
Template	2458	2482		
Reverse primer	1	GCACCGGGTCTCCTGCCTTGAGTTGG	26		
Template	2971	2946		

ANEXO 2

Valores de densidad total de las muestras analizadas								
Grupo	Rata	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio individual	Promedio por grupo	Desviación estándar	Error estándar
<i>Ace</i>								
Sano	1	27.9407	73.2360	12.0757	37.7508	31.6240	11.7	5.84
	2	32.7872	69.0628	19.3016	40.3839			
	3	13.7594	19.9989	9.9686	14.5756			
	4	38.7270	39.3843	23.2465	33.7859			
L-NAME	1	3.5433	2.2063	5.3616	3.7037	4.8861	2.5	1.25
	2	20.3261	3.5662	1.9125	8.6016			
	3	1.4880	9.1782	1.6532	4.1065			
	4	1.8530	6.1438	1.4008	3.1325			
Captopril	1	32.7614	52.4827	10.1101	31.7848	22.7292	6.2	3.08
	2	21.7376	21.8411	15.1585	19.5791			
	3	33.7832	11.5911	9.3998	18.2580			
	4	20.7426	22.9926	20.1498	21.2950			
EESH	1	6.6142	26.7142	8.2145	13.8476	12.0137	1.7	0.84
	2	14.3843	17.8029	5.8900	12.6924			
	3	8.2420	16.2524	5.0497	9.8480			
	4	11.4689	17.9830	5.5484	11.6668			
<i>Agtr1a</i>								
Sano	1	0.6719	3.3329	0.5563	1.5204	2.3088	1.6	0.78
	2	2.9566	0.9368	0.4236	1.4390			
	3	0.9056	3.0790	0.9021	1.6289			
	4	1.1678	11.6268	1.1466	4.6471			
L-NAME	1	5.2121	7.8514	7.7075	6.9237	12.8343	5.6	2.8
	2	10.2638	19.1929	2.8743	10.7770			
	3	18.0720	36.7083	6.0311	20.2705			
	4	13.0324	23.4447	3.6211	13.3661			
Captopril	1	6.0520	3.8188	0.5334	3.4681	3.2674	1.4	0.71
	2	4.8774	9.2060	1.1546	5.0793			
	3	7.2013	1.2288	0.1772	2.8691			
	4	2.2094	2.5443	0.2053	1.6530			
EESH	1	9.3943	12.2803	1.3345	7.6697	5.8480	1.5	0.73
	2	5.0327	7.3451	0.9886	4.4555			
	3	3.0174	9.5272	0.9752	4.5066			
	4	7.7401	8.8879	3.6525	6.7602			

Densidad total								
Grupo	Rata	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio individual	Promedio por grupo	Desviación estándar	Error estándar
<i>Nos3</i>								
Sano	1	81422.5	65837.3	76823.9	13.5793	14.1688	2.7	5.84
	2	72424.6	63643.9	82366.3	10.6167			
	3	103224.4	96437.8	83763.1	16.9854			
	4	109873.7	83278	117239.2	15.4936			
L-NAME	1	16629.5	14764.4	18374.3	2.0969	1.6812	0.3	1.25
	2	10204.1	11387.3	13272.2	1.4796			
	3	11732.3	12837.1	12918.2	1.5956			
	4	14393.2	10273.4	12383.9	1.5528			
Captopril	1	16629.5	14764.4	18374.3	12.2113	13.2396	0.9	3.08
	2	10204.1	11387.3	13272.2	13.7047			
	3	11732.3	12837.1	12918.2	14.3099			
	4	14393.2	10273.4	12383.9	12.7327			
EESH	1	81422.5	65837.3	76823.9	9.4298	10.9154	1.9	0.84
	2	72424.6	63643.9	82366.3	9.1936			
	3	103224.4	96437.8	83763.1	12.0445			
	4	109873.7	83278	117239.2	12.9936			
<i>Bdkrb2</i>								
Sano	1	1.1715	6.9638	20.8982	9.6778	10.5748	1.6	0.79
	2	0.7752	3.2427	27.7962	10.6047			
	3	3.1231	6.0406	18.5057	9.2231			
	4	4.2264	6.6917	27.4627	12.7936			
L-NAME	1	2.0221	13.4121	1.3927	5.6090	7.4750	1.8	0.88
	2	2.7293	24.8578	1.9948	9.8606			
	3	2.7733	17.6734	1.0241	7.1569			
	4	1.4133	18.4237	1.9833	7.2734			
Captopril	1	4.5891	11.9198	9.3954	8.6348	8.6038	2.5	1.2
	2	3.0917	10.4664	5.8292	6.4624			
	3	5.5978	25.6419	5.2746	12.1714			
	4	3.5920	14.0530	3.7951	7.1467			
EESH	1	3.1482	35.7066	2.8850	13.9133	10.5078	2.6	1.31
	2	12.1148	17.8884	3.7131	11.2387			
	3	5.7919	14.7690	3.8803	8.1471			
	4	9.4080	12.9454	3.8435	8.7323			

*Los valores presentados se ajustaron usando el gen *Gapdh* en cada uno de los ensayos