



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
HIPOCOLESTEROLÉMICA Y ANTITROMBÓTICA
ASOCIADA A PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE
LECHES FERMENTADAS POR *Lactococcus lactis* spp.**

Por:

Miguel Ángel Rendón Rosales

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

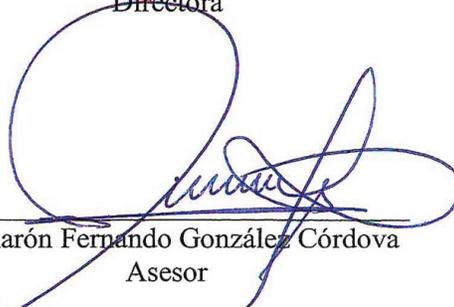
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

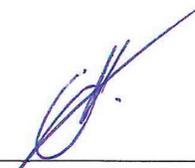
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Miguel Ángel Rendón Rosales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Belinda Vallejo Galland
Directora



Dr. Aarón Fernando González Córdova
Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza
Asesor



Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para poder realizar el proyecto de tesis en el posgrado.

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), que me abrió sus puertas para estudiar la maestría en ciencias y al Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos para realizar el presente trabajo de Investigación.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland por depositar su confianza en mí para realizar este trabajo de investigación y por haberme guiado excelentemente durante dos años para cumplir los objetivos de la presente investigación.

Al Dr. Aarón F. González por permitirme en sus inicios formar parte del laboratorio de Ciencia y Tecnología de productos lácteos. Por sus acertadas observaciones y recomendaciones para mejorar el presente trabajo de investigación.

A mi comité de tesis, Dr. Adrián Hernández Mendoza, por enseñanzas, sus constantes sugerencias, observaciones para mejorar el trabajo de investigación, además por su importante aporte para mejorar las presentaciones tanto oral como escrita. al Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano por importante colaboración en el presente trabajo de investigación, además de sus enseñanzas en el área de química de proteínas y análisis instrumental.

Agradecimiento especial a la Dra. María de Jesús Torres Llanez por sus enseñanzas y asesoramiento en el análisis instrumental cromatográfico, por sus sugerencias y por sus recomendaciones en el trabajo de laboratorio. A la M.C Carmen Estrada Montoya por su apoyo técnico y su disposición para la adquisición de material y reactivo, por sus recomendaciones y sugerencias para el mejorar el trabajo en el laboratorio.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Química y Biotecnología de productos lácteos, al M.C. Ricardo Reyes Díaz, por su disposición y apoyo en el trabajo experimental. A la Dra. Lilia Beltrán Barrientos por sus recomendación y sugerencias en la revisión del presente escrito, a la Dra. Lourdes Santiago por sus enseñanzas y recomendaciones, principalmente en el trabajo en el área de microbiología.

Agradezco a la M.C. Karen Sotelo por su apoyo técnico en la fase experimental, principalmente en la extracción de sangre para los análisis de coagulación. A Daniel

Alejandro González por su apoyo en el trabajo experimental en la parte de cromatografía.

Gracias al equipo de Programas Académicos, encabezada por la Dr. Herlinda Soto, a Verónica Araiza, Alejandra Córdova, Laura García, Héctor Galindo, Norma García, Alfonso Coronado y Argelia Marín, por su apoyo, disposición y atención siempre amable para la gestión de apoyo académico y tramites en general. Así también a Faly Gil la Madrid por su disposición y atención en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. A Denia Huez, Marovi Cortez y Perla G. Montaña de la Unidad de Transferencia e Innovación (UTI) gracias por su atención.

A los investigadores docentes de CIAD quienes por medio de sus enseñanzas académicas ayudaron a fortalecer los conocimientos, Dr. Alfonso García, Dr. Jesús Pinzón, Dra. Verónica Mata, Dr. Aida Peña, Dr. Martín Valenzuela, Dra. Teresa Gollas, Dr. Jesús Hernández, Dr. Fernando Ayala, M.C. Guillermina García, Dr. Iván Anduro, Dra. María del Carmen, Dra. Osiris Álvarez, Dra. Karina García.

Un agradecimiento especial a Lourdes Santiago, Carmen Manzanares, Aline Díaz, Isidro Méndez, Karen Ramírez, Ana María Méndez, Alejandro Santos, Wendy Mora. por todos los buenos momentos que compartí con ustedes durante mi estancia en los dos años de la maestría, además de contar con su apoyo en todo momento.

A mis compañeros de generación de la maestría, Wendy Mora, David Verdín, Erick Gabriel, Alejandro Chávez, Roció Hernández, Ofmara Ponce, Blanca Nayeli, por todas las experiencias compartidas.

Agradezco al gran equipo de lácteos, por los momentos de convivencia y trabajo en el laboratorio: Paul Fernando Cuevas, Lourdes Santiago, Carmen Manzanares, Alejandro Santos, Cinthya Utrera, Ildefonso Guerrero, Nicolás González, Lilia Beltrán, Priscilia Heredia, Aline Díaz, Lady Valero, Laura, Eleazar Aguilar, Isidro Méndez, Glen Robles, Audry, Hayde Romero, Hibraim Ramírez, Wilber Vargas, Ana María Méndez, Chistobal Toledo, Valeria Rivero, Alejandra Pajonares, Lucero Félix, Stephanie Siomara, Teresita Maldonado, Talina Guerrero, María Alejandra Ospina, Ana Karen, Daniel González, Karen Ramírez.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Miguel Rendón y Rufina Rosales, quienes estoy muy agradecido con ellos, por mostrar siempre su apoyo incondicional, ya que aumentaron en gran medida las ganas de seguir adelante y desarrollarme profesionalmente y no dejar de creer en mi. A mis hermanos, Julio Rendón, Víctor Rendón y Margarita Rendón, por mostrar siempre su apoyo para seguir adelante, a mi cuñada Roxana Ruiz, que, con sus excelentes consejos y sus grandes conocimientos ayudaron en gran medida a seguir adelante. A toda mi familia, muchas gracias por su inmensurable apoyo en todo momento.

Quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y su apoyo fue la fuerza que me ayudó a conseguirlo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	Error! Bookmark not defined.
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	12
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Escenario Actual de las Enfermedades Cardiovasculares y Factores de riesgo....	17
2.2. Hipercolesterolemia Como Factor Grave Asociada a las ECV	18
2.3. Aterosclerosis y Trombosis Como Patologías Subyacentes a las ECV	18
2.4. Estrategias Empleadas para el Control de las ECV	21
2.5. Alimentos Funcionales Como Estrategia para Reducir las ECV	22
2.6. Péptidos Bioactivos de Proteínas Lácteas	23
2.7. Leches Fermentadas Como Fuente de Péptidos Bioactivos y su Efecto Benéfico en la salud.....	23
2.8. Beneficios de los Péptidos Derivados de las BAL en la Salud Cardiovascular .	27
2.9. Péptidos Reductores del Colesterol (Hipocolesterolémicos) y Mecanismos Involucrados.....	28
2.9.1. Mecanismos Subyacentes al Efecto Hipocolesterolémico.....	28
2.9.2. Proteínas Lácteas Como Fuente de Péptidos Hipocolesterolémicos	29
2.9.3. Derivados Lácteos Fermentados con Actividad Hipocolesterolémica	30
2.10. Péptidos Antitrombóticos y Mecanismos involucrados	32
2.10.1. Péptidos Antiagregantes Plaquetarios	32
2.10.2. Péptidos Inhibidores de Trombina	33
2.10.3. Derivados Lácteos Fermentados con Actividad Antitrombótica	34
2.11. Biodisponibilidad de Péptidos Bioactivos	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Particulares.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Cepas de Estudio	39
5.3. Elaboración de Leches Fermentadas	41
5.4. Simulación Gastrointestinal <i>in vitro</i> de Leches Fermentadas	41

CONTENIDO (Continuación)

5.6.	Preparación de Fracciones Solubles en Agua.....	45
5.7.	Obtención de los Perfiles Cromatográficos de Péptidos de Leches Fermentadas con <i>L. lactis</i>	46
5.7.1.	Perfil Peptídico Mediante Cromatografía Líquida en Fase Reversa (RP-HPLC)	46
5.7.2.	Perfil Peptídico Mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaño	46
5.8.	Determinación de la Actividad Hipocolesterolémica	47
5.8.1.	Inhibición Micelar del Colesterol	47
5.8.2.	Capacidad de Unión a Sales Biliares	48
5.9.	Determinación de la Actividad Antitrombótica.....	49
5.9.1.	Actividad Inhibidora de Trombina.....	49
5.9.2.	Evaluación de la Actividad Anticoagulante en Plasma	50
5.10.	Análisis Estadístico	51
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
6.1.	Estandarización del Proceso de Propagación de las Cepas de Estudio	52
6.2.	Cuantificación de Grupos Amino (NH ₃) Libres en Leche Fermentada.....	55
6.3.	Perfil Peptídico de Leches Fermentadas Mediante Cromatografía Líquida	58
6.4.	Evaluación de la Actividad Hipocolesterolémica.....	63
6.4.1.	Inhibición Micelar del Colesterol	63
6.4.2.	Capacidad de Unión a Taurocolato de Sodio.....	67
6.4.3.	Capacidad de Unión a Ácido Cólico.....	70
6.4.4.	Correlación Entre Inhibición Micelar del Colesterol y Capacidad de Unión a Sales Biliares.....	73
6.5.	Determinación de la Actividad Antitrombótica.....	76
6.5.1.	Actividad Inhibidora de Trombina.....	76
6.5.2.	Determinación de la Concentración Máxima de Inhibición Media de Trombina.....	79
6.5.3.	Actividad Anticoagulante en Plasma: Tiempo de Trombina y Tiempo de Protrombina.....	81
7.	CONCLUSIÓN	89
8.	REFERENCIAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación simplificada de la cascada de coagulación sanguínea mediante las dos vías de activación.	21
2	Representación resumida del sistema proteolítico de <i>L. lactis</i>	27
3	Esquema general experimental para la evaluación de la actividad hipocolesterolemica y antitrombótica	43
4	Condiciones de pH y tiempo para la simulación gastrointestinal	44
5	Curvas de crecimiento de <i>L. lactis</i> en M17 suplementado con lactosa y dextrosa	54
6	Cuantificación de grupos amino (NH ₃) libres durante la fermentación y simulación gastrointestinal	57
7	Perfil peptídico cromatográfico mediante RP-HPLC de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	60
8	Perfil peptídico cromatográfico mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna de filtración en gel	63
9	Capacidad de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol por FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	69
10	Capacidad de unión a sales taurocolato de sodio por FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	70
11	Capacidad de unión a ácido cólico por FSA < 3 kDa de leches fermentadas por <i>L. lactis</i>	73
12	Asociación entre capacidad de inhibición micelar del colesterol y capacidad de unión a sales biliares por FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	76
13	Capacidad de inhibición de trombina por FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	78
14	Asociación ente IC ₅₀ de inhibición de trombina y actividad anticoagulante en plasma por FSA < 3 kDa.	87

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas	25
2	Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> bajo estudio	40
3	Composición de los diferentes jugos digestivos empleados en la simulación gastrointestinal	45
4	Valores de IC ₅₀ de inhibición de trombina por FSA < 3 kDa derivados de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	81
5	Efecto de las FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i> sobre el tiempo de coagulación en plasma (tiempo de trombina)	83
6	Valores normalizados (INR) de la actividad anticoagulante en plasma (tiempo de protrombina) por FSA < 3 kDa de leches fermentadas con <i>L. lactis</i>	86

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Determinación del porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol por fracciones peptídicas < 3 kDa	49
2	Determinación del porcentaje de inhibición de trombina por fracciones peptídicas < 3 kDa.	50

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares derivadas de la aterosclerosis son la principal causa de mortalidad a nivel mundial. Estudios previos sugieren que péptidos derivados de la proteólisis de la leche durante la fermentación con bacterias ácido lácticas (BAL) específicas pueden presentar propiedades cardioprotectoras, tales como la actividad hipocolesterolémica y antitrombótica. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad hipocolesterolémica mediante la inhibición micelar del colesterol y la capacidad de unión a sales biliares; así como la actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina y pruebas globales hemostáticas, de fracciones peptídicas de leches fermentadas con *Lactococcus lactis*. Se emplearon cinco cepas de *L. lactis* (L-571, L-572, L-598, L-599 y L-600) para la elaboración de leches fermentadas (LF) durante 24 y 48 h. Las LF fueron sometidas a simulación gastrointestinal (SGI), y posteriormente a partir de las LF con y sin SGI se prepararon fracciones <3 kDa (FSA) mediante ultrafiltración. Los resultados indicaron una mayor concentración de péptidos después de la SGI mediante análisis con cromatografía líquida de fase reversa (RP-HPLC). Así también, la concentración de grupos amino (NH₃) libres como indicador de la hidrólisis en LF fue mayor con las cepas L-571 y L-572. Con respecto a las actividades biológicas, después de la SGI, FSA-L-572 con 48 h presentó actividad hipocolesterolémica *in vitro*, al exhibir capacidad para inhibir la solubilización micelar del colesterol (55.43% ± 2.20). Además FSA-L-600 con 48 h presentó alta capacidad para unirse a taurocolato de sodio (70.120 ± 1.80) y a ácido cólico (36.30 ± 0.98 %). En relación a la actividad antitrombótica, después de la SGI, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de los valores de IC₅₀ sobre inhibición de trombina, de 0.56 a 0.045 mg/mL con LF 24 h y 0.71 a 0.049 mg/mL con LF 48 h, por L-571 y L-572 respectivamente. Ambas fracciones presentaron los valores más bajos de IC₅₀, los cuales se correlacionaron significativamente ($p < 0.05$) con mayores tiempos de coagulación mediante el tiempo de trombina (TT) y protrombina (TP/INR). Por lo tanto, estos resultados indicaron que la cepa L-572 presenta potencial para liberar péptidos con efecto cardioprotector bifuncional al exhibir actividad hipocolesterolémica y antitrombótica, mientras que las cepas L-600 y L-571, presentaron actividad hipocolesterolémica y antitrombótica, respectivamente. Lo anterior sugiere que leches fermentadas con L-572, L-571 y L-600 podrían ejercer un efecto fisiológico en un modelo *in vivo* para controlar la hipercolesterolemia y la trombosis.

Palabras clave: hipercolesterolemia, trombosis, péptidos bioactivos

ABSTRACT

Cardiovascular diseases derived from atherosclerosis are the most important cause of mortality worldwide. Previous studies suggest, that milk peptides derived from proteolysis from lactic acid bacteria during fermentation, may present cardioprotective properties such as hypocholesterolemic and antithrombotic activity. In this sense, the aim of the present study was to evaluate the hypocholesterolemic activity through the inhibition of micellar solubility of cholesterol and capacity of binding to bile salts, and the antithrombotic activity through the inhibition of thrombin and hemostasis assays in plasma. Five strains of *Lactococcus lactis* (L-571, L-572, L-598, L-599 and L-600) were used for the elaboration of milk (FM) with 24 and 48 h of fermentation. FM were subjected to gastrointestinal simulation (GIS). Udigested and digested FM were ultrafiltrated to obtain water-soluble peptidic fraction (WSF). Overall, An increase in the concentration of peptides was observed once the FM was exposed to GIS, through Reverse Phase- High performance liquid chromatography (RP-HPLC). In respect to Biological activities, after SGI of FM with 48 h, WSF-LF derived from strain L-572 demonstrated bifunctional properties, which showed the ability to inhibit the solubilization of cholesterol into micelles (55.43 ± 2.20) and antithrombotic activity, through the inhibition of the thrombin-induced coagulation of fibrinogen (IC_{50} of $0.049 \pm 0.00 \mu\text{g/mL}$ of peptidic protein). Moreover, WSF-FM of L-600 and L-571 showed high binding capacity to bile salts (Sodium taurocholate, 70.120 ± 1.80 ; cholic acid, $36.30 \pm 0.98 \%$) and antithrombotic activity (IC_{50} , $0.045 \mu\text{g/mL}$) at 24 and 48 h after GIS, respectively. Altogether, these results provide important insights into the future application in foods that have an effect in preventing some pathology related to CVD such as atherosclerosis in an *in vivo* model.

Key words: hypercholesterolemia, thrombosis, bioactive peptides

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen hoy en día uno de los problemas graves de salud a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2017, las ECV afectaron a aproximadamente 15 millones de personas en todo el mundo, representando el 31% de las causas de muertes registradas (OMS, 2017). Existen diversos factores de riesgo asociadas a las ECV, dentro de estas se encuentra los altos niveles de colesterol total y de lipoproteínas aterogénicas (LDL, VLDL) (Teufel, 2018). Las cuales da origen a la aterosclerosis, una enfermedad crónica-inflamatoria localizada en la pared arterial, y la cual se caracteriza por interacciones complejas que dan como resultado una disfunción endotelial y desarrollo posterior de una placa aterosclerótica (Hibbert et al., 2018). Tras este daño, los factores procoagulantes se activan conduciendo a la trombosis arterial, y posterior infarto del miocardio (Ouweneel, 2015).

Varios enfoques diferentes se han empleado para controlar la aterosclerosis, tales como los fármacos con efecto hipocolesterolémico, los cuales inhiben la absorción del colesterol mediante la supresión micelar del colesterol, unión a sales biliares, o bien, inhibiendo la síntesis del colesterol. Así también, se emplean anticoagulantes, los cuales tienen como objetivo inhibir o retardar la formación de trombos (Kathib y Wilson, 2018). A pesar de que el tratamiento farmacológico ha demostrado tener efecto en el control de dichas patologías, aún persiste el riesgo de presentar efectos secundarios (*e.g.*, daño hepático, hemorragias y alergias). Por tal motivo, se ha sugerido explorar nuevas alternativas no farmacológicas que no presenten tales limitaciones. En este sentido, expertos en la salud han informado que las ECV pueden prevenirse hasta en un 80%. Para lograrlo deben hacerse cambios en el estilo de vida, principalmente en la adopción de una alimentación saludable (OMS, 2015).

En las últimas décadas, diversas evidencias demuestran la relación entre salud y la alimentación, respaldando el papel protector de algunos compuestos alimentarios contra algunas enfermedades crónico degenerativas, particularmente las ECV (Erdman et al.,

2008). Es por ello que, investigaciones recientes se han enfocado en la caracterización de compuestos biológicamente activos que presenten propiedades cardioprotectoras para el desarrollo de alimentos funcionales. Dentro de estos compuestos, se encuentran los péptidos bioactivos, los cuales son liberados a partir de la hidrólisis de las proteínas de diversas fuentes alimentarias. En particular, se ha reconocido que las proteínas lácteas son fuente importante de péptidos bioactivos (Pihlanto y Korhonen, 2015), los cuales han demostrado tener efecto en modular algunos mecanismos fisiológicos conllevando al control de alguna patología. Dentro de estos péptidos se han caracterizado aquellos que tienen la capacidad para reducir el colesterol (hipocolesterolémicos), y los que pueden inhibir y/o retardar el proceso de coagulación de la sangre (antitrombóticos). Diferentes estrategias se han utilizado para la producción de péptidos, tales como el empleo de enzimas proteolíticas específicas (digestivas o microbianas), o bien el uso de bacterias proteolíticas en el proceso de fermentación (Toldrá et al., 2018). En este último, ha resaltado la fermentación realizada con bacterias ácido lácticas (BAL), ya que además de ser utilizada ampliamente para la elaboración de productos con propiedades sensoriales agradables, también ha demostrado presentar beneficios a la salud. Los cuales pueden deberse a la bacteria *per se* o bien por la producción de compuestos bioactivos tales como los péptidos.

Estudios previos han documentado el papel funcional de las leches fermentadas con efecto en la reducción del colesterol empleando BAL específicas, en donde se ha encontrado que dicho efecto requiere de una interacción directa de la bacteria y/o de sus componentes celulares (Tamine, 2006; Malpeli et al., 2015). Así también, algunos sugieren que péptidos derivados de la proteólisis de las BAL podrían estar involucrados en el efecto hipocolesterolémico de las leches fermentadas (Rodríguez-Figueroa et al., 2011; Beltrán-Barrientos et al., 2013), sin embargo, los péptidos reductores del colesterol derivados de la fermentación láctica aún no han sido completamente explorado. Estudios sugieren que péptidos con actividad antitrombótica, como los inhibidores de trombina, también pueden ser liberados durante la fermentación láctica (Rojas-Ronquillo et al., 2012). Por lo anterior, resulta interesante evaluar la producción de leches fermentadas con efecto multifuncional en la salud cardiovascular, enfocándose en el control de la patología aterosclerótica. Para ello es necesario la búsqueda de BAL

que tengan capacidad para producir péptidos que puedan modular o inhibir diferentes mecanismos simultáneamente, con la finalidad de prevenir alguna patología en específico. Por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad hipocolesterolémica y antitrombótica de leches fermentadas con cepas específicas de *Lactococcus lactis*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Escenario Actual de las Enfermedades Cardiovasculares y Factores de riesgo

Las ECV son englobadas como un conjunto de enfermedades que afectan al corazón y la red de arterias y venas que componen el sistema cardiovascular, incluyendo las válvulas y cámaras del corazón y su sistema electroquímico (Padsalgikar, 2017; Shu et al., 2017). Dentro de estas enfermedades se encuentra el infarto al miocardio, angina de pecho, cardiopatía isquémica, accidentes cerebrovasculares (ACV), trombosis venosas y embolia pulmonar (OMS, 2016). De acuerdo con informe publicado por la División de Información, Evidencia, Investigación e Innovación de las OMS/Europa (OMS, 2017). Las ECV constituyen la primera causa de mortalidad mundial, afectando por igual a países industrializados, así como aquellos en vías de desarrollo. Dicho informe señaló que en el 2015 se registraron un total de 15 millones de muertes, representando cerca del 30% de las enfermedades registradas en todo el mundo. Así mismo, las tendencias indican que para el 2030 el número de muertes aumentará a 23 millones. En México, de acuerdo con información del Instituto Nacional de cardiología (INC, 2018) y la Sociedad Mexicana de Cardiología (SMC, 2015) estas enfermedades son de igual manera la mayor causa de muerte en la población.

En tal escenario, las autoridades en materia de salud a nivel mundial han intervenido para establecer programas con el objetivo de prevenir o controlar dichas enfermedades, enfocándose principalmente en el control de los factores de riesgo, derivados del estilo de vida (alimentación, tabaquismo, baja actividad física (OMS, 2015). Tales factores de riesgo incluyen la diabetes, la obesidad, la hipertensión arterial, y la hipercolesterolémica, siendo este, uno de los más importantes. (Sharkey y Moradai, 2018). Sin embargo, a pesar de tales esfuerzos, la incidencia de ECV aún sigue siendo elevada.

2.2. Hipercolesterolemia Como Factor Grave Asociada a las ECV

El colesterol es una molécula importante dentro del organismo, ya que es un componente importante de las membranas celulares y es precursor de diferentes compuestos, tales como las hormonas esteroideas, sales biliares y vitamina D. Sin embargo, la regulación alterada de la síntesis, absorción y excreción conlleva a la hipercolesterolemia (Zárate et al., 2016). En la población, las concentraciones de colesterol total, lipoproteínas y triglicéridos no son constantes, dicha variabilidad resulta de diversas interacciones entre lo genético y ambiental. (Martín et al., 2012; Triguero et al., 2012). Sin embargo, la alta concentración de lípidos deriva principalmente por el estilo de vida, tal es el caso de la mala alimentación (Mieras et al., 2004), conllevando a la elevación de partículas aterogénicas como lo es el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), siendo la primera la más importante en cuanto a su relación con las ECV. Recientemente también se ha señalado que la lipoproteína tipo A juega un papel importante en el desarrollo de las ECV teniendo su origen en la aterosclerosis (Triguero et al., 2012).

2.3. Aterosclerosis y Trombosis Como Patologías Subyacentes a las ECV

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria progresiva, la cual se caracteriza por el desarrollo de una placa de ateroma dentro de las paredes de los vasos arteriales. Uno de los factores de iniciación de la aterosclerosis es la lesión endotelial o la acumulación de lipoproteínas LDL, los cuales dentro del endotelio son oxidados o modificados, desencadenando una respuesta inmunológica (Khyzha et al., 2017, Moriya, 2018). Dentro de esta respuesta, se encuentran la participación de los monocitos, los cuales son reclutados en el endotelio, y una vez dentro, se diferencian a macrófagos, los cuales captan lípidos transformándose en células espumosas (Wang y Butani, 2017). Otros factores que favorecen el desarrollo de la placa aterosclerótica se encuentran la

activación de las plaquetas, el reclutamiento de neutrófilos y la producción de citocinas durante el proceso inflamatorio Finalmente, el rompimiento de la placa aterosclerótica da como resultado la liberación de sustrato indispensable para iniciación de la trombosis arterial. (Badimon, 2008).

La trombosis arterial se describe como un proceso fisiopatológico la cual esta integrado por la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea. Ambos procesos son complementarios, en la cual se encuentran interconectadas por diferentes factores sanguíneos (Gaerter, 2016). La formación del trombo da inicio con la reclutación de las plaquetas, las cuales posteriormente se adhieren a la zona de lesión mediante receptores específicos (Córdova et al., 2011). Subsecuentemente, las plaquetas forman una agregado donde participa el receptor α I**IIb** β 3 (GPIIb/IIIa), la cual es una integrina que se encuentra en la membrana de las plaquetas y tiene como función adherir a las plaquetas mediante el enlace plaque-fibrinógeno-plaqueta (Ouweneel y Van, 2016).

Simultáneamente, durante la lesión endotelial, son expuestos factores (de proteínas) que activan el proceso de coagulación, como el factor tisular (FT). Una vez en contacto en el plasma interacciona con otros factores coagulantes, dando inicio a la cascada de coagulación. Este proceso se puede activar mediante dos vías, denominadas la vía extrínseca y la intrínseca (Figura 1) donde finalmente convergen en la vía común. Esta vía está determinado por la generación del factor X (FXa) el cual tiene como función la activación y liberación de la enzima trombina a partir de protrombina. La trombina o factor IIa cataliza la transformación de fibrinógeno, liberando monómeros de fibrina, que finalmente polimerizan formando una red tridimensional, la cual forma y estabiliza el coágulo (Mackman et al., 2006; Hoffman y Monroe, 2006).

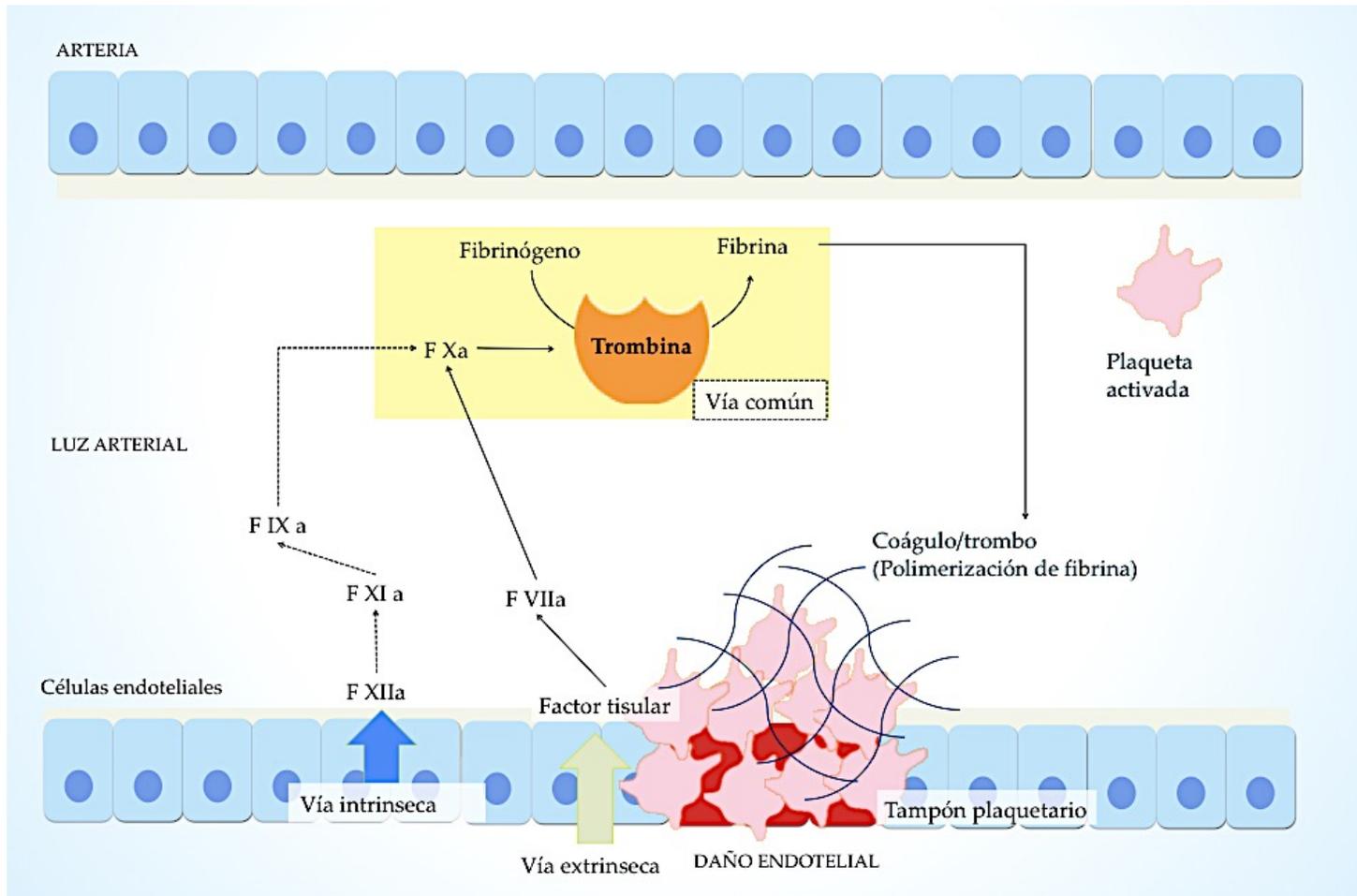


Figura 1. Representación simplificada de la cascada de coagulación sanguínea mediante las dos vías de activación (vía extrínseca e intrínseca). Adaptado de Joblin y Eyre, 2013; Mackman et al., 2006; Hoffman y Monroe, 2006).

2.4. Estrategias Empleadas para el Control de las ECV

A pesar de los enormes progresos en la prevención de las ECV, la prevalencia de estas enfermedades aún sigue siendo elevada. (Salvo et al., 2007). Generalmente, para la patología cardiovascular se recurren a tratamientos farmacológicos, los cuales tienen como finalidad de reducir los factores de riesgo como lo es la disminución de las concentraciones de colesterol, de lípidos, la presión arterial, e inhibir, retardar la formación de trombos arteriales y/o inhibir la agregación plaquetaria (OMS, 2017).

Los fármacos antitrombóticos, como los anticoagulantes, fibrinolíticos y antiplaquetarios, han mostrado tener efecto en la reducción del riesgo de padecer ECV (Sepúlveda et al., 2017). Por otro lado, los fármacos con efecto hipocolesterolémico incluyen a las estatinas los cuales inhiben la síntesis de colesterol mediante el bloqueo de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzima A reductasa (HMGCR); la colestiramina, la cual forma complejos iónicos con las sales biliares inhibiendo la absorción del colesterol y la reabsorción de las sales biliares. Estos, han mostrado eficacia al mejorar el perfil lipídico; sin embargo, aún persiste gran riesgo de padecer los efectos adversos de los fármacos, como las hemorragias, alergias, la reducción de la asimilación de algunas vitaminas liposolubles y el daño hepático (Corral, 2014; Banan-Mwide et al., 2017). Por lo anterior, se han buscado otras alternativas no farmacológicas que no presenten tales efectos secundarios.

Modificaciones en el estilo de vida, tales como la disminución del consumo de alcohol, la suspensión del uso de tabaco, la actividad física regular y la adopción a una alimentación saludable, pueden ayudar a prevenir el desarrollo de las ECV hasta en un 80% (OMS, 2015). En las últimas décadas se ha documentado una estrecha relación entre la salud y la alimentación, aunado al papel importante de los nutrientes presentes. Además, se han caracterizado componentes dietarios que contribuyen al bienestar de la salud, principalmente en las enfermedades crónica-degenerativas (Valdés y León, 2017, Erdman et al., 2008). Por lo tanto, diversas investigaciones se han centrado en la

caracterización de dichos compuestos para la producción de alimentos que además de nutrir aporten un beneficio a la salud, denominados como alimentos funcionales. (Singh et al., 2018).

2.5. Alimentos Funcionales Como Estrategia para Reducir las ECV

En las últimas décadas se ha hablado del concepto tradicional de una alimentación equilibrada y variada, en la cual se señala la importancia de los nutrientes y su implicación en el organismo. En los últimos años la ciencia de los alimentos afronta nuevos retos, donde el control de las enfermedades crónico-degenerativas se han convertido en un objetivo de interés (Aswell, 2004). Como consecuencia, diversos estudios se han realizado con la finalidad de desarrollar los denominados “alimentos funcionales”. De acuerdo con el consenso “Functional Food Science in Europe” (FUFOSE), un alimento se considera funcional cuando además de su aporte nutricional, cumple de manera satisfactoria con los requisitos para ejercer un efecto benéfico en el organismo (Carou, 2008; Lähteenmäki, 2013). Algunos estudios han sugerido que muchos alimentos son potencialmente beneficiosos en la prevención de las ECV, reduciendo los riesgos, como la reducción de colesterol, triglicéridos, presión arterial, y la eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Halser et al., 2000). Todos estos beneficios se debe a la presencia de compuestos con actividad biológica; por ejemplo, una amplia variedad de vegetales son altamente valorados por su potencial funcional debido a la presencia de fitoquímicos (polifenoles y terpenos), los cuales han demostrado tener actividad biológica (Martinez-Navarrete et al., 2008). Sin embargo, hay varias clases de compuestos de origen proteico, tal es el caso de los péptidos bioactivos, los cuales se pueden derivar a partir de la hidrólisis de diferentes proteínas, como las de origen lácteo (Szwajkowska et al., 2011).

2.6. Péptidos Bioactivos de Proteínas Lácteas

Hoy en día, las proteínas y los péptidos bioactivos forman parte de uno de los componentes más importantes dentro de los alimentos funcionales. Estos péptidos se definen como fragmentos específicos de las proteínas, generalmente de 3-20 residuos de aminoácidos (Szwajkowska, et al., 2011), o incluso hasta 50 (Hafeez et al., 2014), con propiedades biológicas. Varios estudios han demostrado que péptidos derivados de proteínas de origen lácteo, presentan actividad antioxidante, antimicrobiana, hipocolesterolémica, opiácea, antitrombótica y antihipertensiva, entre otras (Nongonierma et al., 2016). La producción de dichos péptidos se ha realizado mediante la hidrólisis enzimática de proteínas, ya sea con el uso de enzimas proteolíticas digestivas o microbianas, o durante la digestión gastrointestinal, durante el procesamiento de alimentos, así como la fermentación láctica con BAL. En la tabla 1 se enlistan algunos ejemplos de péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas y su efecto en la salud.

2.7. Leches Fermentadas como Fuente de Péptidos Bioactivos y su Efecto Benéfico en la Salud

Diversas evidencias han señalado que los productos fermentados, en especial, la leche fermentada, poseen naturalmente un valor nutricional elevado, así como diversos efectos benéficos a la salud (Pihlanto y Korhonen, 2015; Sha, 2017; Frias et al., 2017). Las bacterias ácido lácticas (BAL) son los principales actores durante la fermentación láctica. La aplicación de estos microorganismos se conoce desde hace mucho tiempo, con los trabajos de Pasteur relacionados con la fermentación y Metchnikoff sobre los posibles efectos benéficos hacia la salud (Shiby y Mishra, 2013).

Tabla 1. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas

Función	Fragmento y origen	Producción
Antihipertensivo	IPP (β -CN) VPP (β -CN)	Hidrólisis enzimática, fermentación.
Antioxidante	WV (LF, 346-347) YFYPEL	Hidrólisis enzimática
Antitrombótico	YPEPVLGPVRGPFPPPIIV f(β - CN)	Fermentación de leche con <i>Lb. casei</i>
Hipocolesterolémico	IIAEK (β -Lg)	Hidrolizados con tripsina
Opioides	RYLGYL (α_{S1} -CN) YFPF (β -CN)	Hidrolisis enzimática péptidos sintéticos
Antidiabético	IPAVF (β -Lg) TPEVDDEALEK (β -Lg)	Enzimas digestivas
Antisaciedad	β -Casomorfina-7 (TPVFVEI) (β -CN bov,	Hidrólisis enzimática
Antimicrobiano	β -CN, (f 193-209) α_{S1} -CN,(f 1-23)	Quimosina
Inmunomodulador Antiinflamatorio	α_{S1} -CN,(f 59-79) β -CN, (f 1-28)	Hidrólisis enzimática

CN, caseína; Lg, Lactoglobulina, LF, lactoferrina; Bov, bovino, Hum, humano; *Lb*, *Lactobacillus*. Recopilado a partir de FitzGerald y Meisel, 2003; Pihlanto-Leppala, 2000; FitzGerald et al., 2004; Nongonierma et al., 2016.

Actualmente, la fermentación tiene varias finalidades, como lo son la extensión de la vida de anaquel, el aumento de la digestibilidad del producto y la diversificación de productos con propiedades sensoriales agradables (Tamine, 2006; Fernández et al., 2015). Además, la fermentación se ha empleado como una estrategia para la producción de péptidos bioactivos, debido al potencial de algunas BAL para liberar fragmentos específicos a partir de la hidrólisis de las proteínas lácteas durante el proceso fermentativo. En este sentido, cepas específicas de *Lactobacillus (Lb.) helveticus* y *Lactococcus (L.) lactis*, además de su aplicación como cultivos iniciadores para mejorar la calidad sensorial y tecnológica de los productos lácteos (Ruggirello et al, 2016), también han sido caracterizados por un sistema proteolítico eficaz para la producción de péptidos con función biológica (Khemariya et al., 2016).

La capacidad de producción de péptidos bioactivos por las BAL reside en el complejo metabólico denominado sistema proteolítico (Figura 2) (Mohanty et al., 2015). El sistema proteolítico consiste en una proteinasa extracelular anclada a la pared celular (PrpP), la cual hidroliza la caseína en más de cien oligopéptidos diferentes que varían de 4 a 30 residuos de aminoácidos (Price et al., 2012). Posteriormente, los fragmentos son transportados hacia el interior de la célula mediante el sistema de transporte Opp. Una vez dentro, los fragmentos son procesados por un conjunto de peptidasas y aminopeptidasas intracelulares, generando péptidos más cortos y aminoácidos (Hafeez et al., 2014; Savijoki et al., 2006).

Fisiológicamente, la proteólisis bacteriana tiene como objetivo, la obtención de aminoácidos esenciales para su crecimiento, ya que debido a que algunos ambientes son pobres en aminoácidos y péptidos libres (ej. Leche), y además, a las bajas capacidades biosintéticas de las BAL, dependen de un sistema proteolítico que les permite la degradación y utilización de la proteína predominante en la leche (Price et al, 2012). Actualmente esta capacidad de las BAL se ha extendido al desarrollo de alimentos funcionales con la finalidad de controlar, o disminuir el riesgo de sufrir una enfermedad (Szwajkowska et al., 2011).

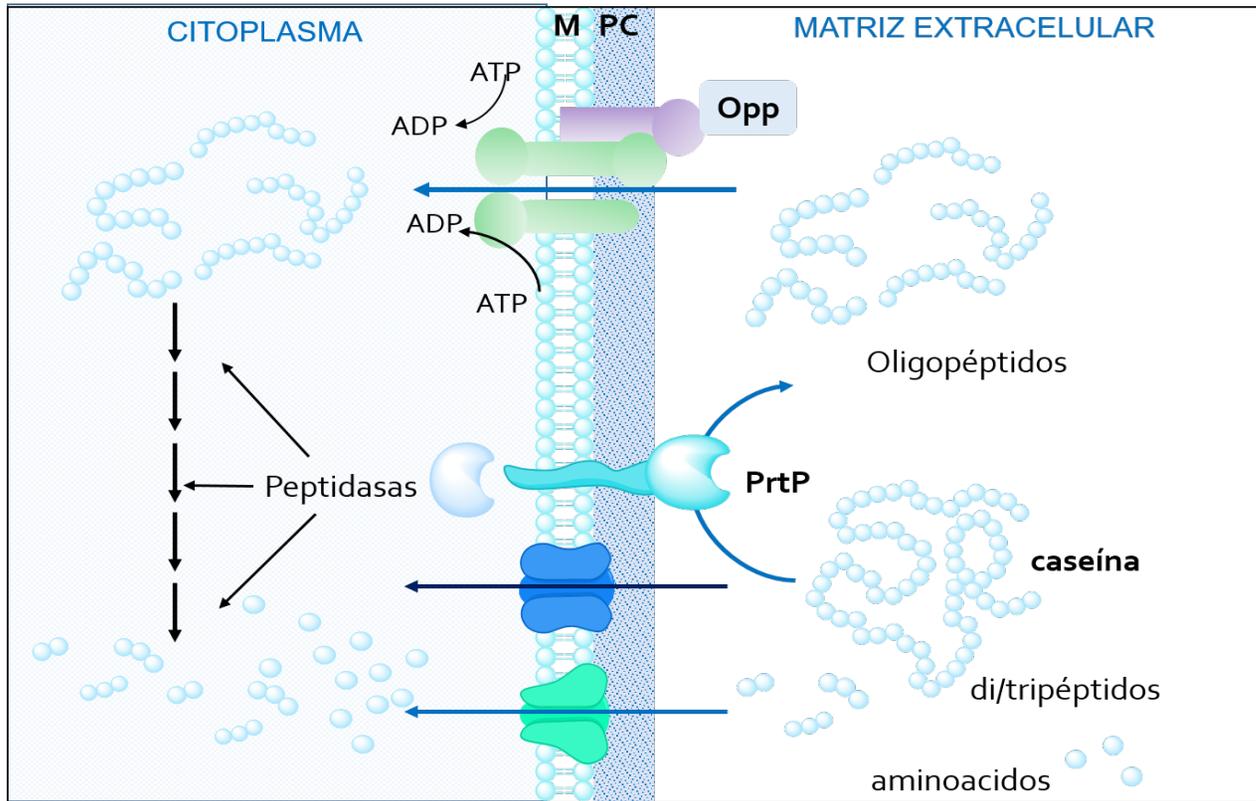


Figura 2. Representación resumida del sistema proteolítico de *L. lactis* spp. PrtP, proteinasa de la envoltura celular; Opp, sistema de transporte de oligopéptidos; M, membrana; PC, pared celular. Adaptado de Savijoki et al. (2006).

2.8. Beneficios de los Péptidos Derivados de las BAL en la Salud Cardiovascular

Desde hace varias décadas, se han identificado varios péptidos que ejercen su efecto en el sistema cardiovascular. Dentro de las principales bioactividades se encuentran, los antihipertensivos, antioxidantes, antitrombóticos o hipocolesterolémicos (Erdman et al., 2008). Diversos estudios han mostrado la liberación de péptidos bioactivos a partir de la fermentación láctea, los péptidos más caracterizados son aquellos que tienen actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Rodríguez-Figueroa et al., 2010; González-Córdova et al., 2011; Wakai y Yamamoto, 2012). La inhibición de ECA por péptidos de leches fermentadas, juega un papel crucial en la modulación de la presión arterial mediante el sistema renina-angiotensina, la cual ha sido demostrado en estudios *in vivo* y clínicos (Beltrán-Barrientos et al., 2018; Rodríguez-Figueroa et al., 2013). Así también se ha reportado péptidos con actividad antioxidante (Virtanen et al., 2007; Soleymanzadeh et al., 2016), los cuales actúan combatiendo el estrés oxidativo causado por las EROS, evitando de esta forma la iniciación o progresión de enfermedades vasculares. De igual forma, estos péptidos pueden prevenir la oxidación del colesterol LDL disminuyendo su aterogenicidad (Erdman et al., 2008). Por otro lado, estudios preliminares han señalado la liberación de péptidos antitrombóticos y reductores del colesterol (Erdman et al., 2008; Rojas-Ronquillo et al., 2012; Wang et al., 2006).

2.9. Péptidos Reductores del Colesterol (Hipocolesterolémicos) y Mecanismos Involucrados

2.9.1. Mecanismos Subyacentes al Efecto Hipocolesterolémico

Diversos estudios han documentado la liberación de péptidos con actividad reductora del colesterol obtenidos a partir de diferentes proteínas alimentarias, tales como la soya (Zhong et al., 2006; Nagaoka et al., 2010), semilla de girasol (Mejías et al., 2009), proteína de almeja (Lin et al., 2010), frijol (Kahlon y Woodruff, 2002), entre otras. Los cuales casi en su totalidad han fueron obtenidos empleando enzimas digestivas, o microbianas. Se han descrito varios mecanismos de los péptidos por los cuales subyacen al efecto hipocolesterolémico. Uno de estos es su capacidad que tienen para inhibir la formación de micelas mixtas de colesterol en el intestino, lo cual da como resultado la disminución de la absorción del colesterol aportado por la dieta (Boachie et al., 2018; Lin et al., 2016). Así también, el efecto se ha asociado a su capacidad que tienen para unirse a las sales biliares, en el intestino, lo cual resulta en una disminución de la reabsorción de las sales biliares que son secretados para la emulsificación y absorción de los lípidos. Por lo anterior, en un mecanismo compensatorio de la pérdida de las sales biliares, conlleva a la síntesis *de novo*, en donde el colesterol presente en el torrente sanguíneo es transportado al hígado para su bioconversión (Chibuike y Aluko, 2012; Arrigo et al., 2016).

Además, se ha señalado que algunos péptidos pueden inhibir la síntesis de colesterol mediante la inhibición de la actividad enzimática de la HMGCoA reductasa. Así también se han descrito péptidos con capacidad para modular la expresión de genes, como la modulación de la expresión de la proteína SREBP2-LDLr. Éste es un activador transcripcional requerido para regular la transcripción del gen del receptor LDR. Lo anterior, se ha observado que péptidos que tienen capacidad de modular dicho gen conlleva a la absorción de c-LDL para su posterior degradación por los hepatocitos (Lammi et al., 2014). También se ha señalado que algunos péptidos pueden interactuar

con la proproteína convertasa subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9), mediante la inhibición de la interacción de proteína-proteína entre PCSK9 y LDLr, dando como resultado la degradación de los receptores de LDL hepático y por lo tanto consiguiendo la disminución de c-LDL (Lammi et al., 2016; Boachie et al. 2018).

2.9.2. Proteínas Lácteas Como Fuente de Péptidos Hipocolesterolémicos

Diversos estudios han reportado la identificación de péptidos reductores del colesterol de proteínas lácteas. En un estudio realizado por Nagaoka et al. (1992) observaron que las caseínas y proteínas del lactosuero presentaban propiedades hipocolesterolémicas *in vivo*. Posteriormente, los estudios demostraron que hidrolizados tripticos de proteínas derivados de lactosuero, presentaban mejor efecto en comparación que hidrolizados de caseína. Este estudio conllevó a elucidar los mecanismos involucrados y los secuencias involucradas. Sus hallazgos demostraron que péptidos derivados de β -Lg (IIAEK, GLDIQK, VYVEELKPTPEGDLELLQK y ALPMH), presentaban capacidad para inhibir la solubilidad micelar del colesterol y capacidad para unirse a las sales biliares. Así mismo, dichos efectos fueron comprobados en células Caco-2, en la cual se observó un efecto en la inhibición de la absorción del colesterol (Nagaoka et al., 2002). Así también, los hidrolizados de β -Lg mostraron tener efecto en la reducción de colesterol en un modelo *in vivo* inducidas a una dieta rica en colesterol. De los péptidos obtenidos, señalaron que IIAEK (lactostatina) presentó el mejor efecto hipocolesterolémico. Mas tarde, en otro estudio (Morikawa et al., 2007) se demostró que IIAEK puede participar en la transcripción del colesterol 7 α -hidrolasa (CYP7A) en células HepG2, donde observaron que una sobreexpresión de CYP7A1 puede disminuir la hipercolesterolemia.

Otro de los péptidos que se han mostrado efecto hipocolesterolémico es la β -lactotensina, un péptido derivado de β -Lg (f 146-149) mediante un mecanismo que no se ha elucidado completamente. Sin embargo, demostró reducción de colesterol en ratones con una dieta rica en colesterol y ácido cólico, dicha disminución se observó 90 minutos

después de una administración de 30 mg de péptido por kg peso del animal (Yamauchi et al., 2003).

De la misma manera, Oh y Lee (2002), realizaron un estudio sobre el metabolismo de lípidos en ratas alimentadas con dietas normales o ricas en grasa, suplementadas con caseína, hidrolizados de caseína y dos tipos de fracciones peptídicas. Los autores reportaron que las fracciones que contenían péptidos con carácter hidrofóbico (derivados de caseína), presentaron la mayor actividad hipocolesterolémica e hipolipidémico. Dichas conclusiones concuerda con otros estudios recientes en los cuales han encontrado que péptidos con propiedades hidrofóbicas ejercen mejor efecto hipocolesterolémico. (Mohan y Udenigwe; 2015; Yao, y Udenigwe2018).

2.9.3. Derivados Lácteos Fermentados con Actividad Hipocolesterolémica

Diversas investigaciones han documentado los efectos terapéuticos de las leches fermentadas, entre estos se encuentran el efecto hipocolesterolémico e hipolipemiente. Muchas de estas investigaciones demostraron que BAL específicas aportaban dicho efecto, las cuales fueron caracterizadas como probióticos (Guan et al., 2016; Sha, 2017; Frías et al., 2017); tales como *Lb. acidopholis*, *Lb. Gasseri*, *Lb. casei*, y *Lb. reuteri* (Ooi y Liong, 2010; Malpeli et al., 2015) Dichos microorganismos ejercían sus efectos por diferentes mecanismos, tales como, la deconjugación de sales biliares por la presencia de la sal biliar hidrolasa (Hosono et al., 2002), la incorporación de colesterol a sus membranas, conversión de colesterol a coprostanol; producción de ácidos grasos de cadena corta; y la inhibición de la absorción del colesterol exógeno (Ooi y Liong, 2010, Frías et al., 2017).

Uno de los primeros estudios enfocados en buscar el efecto hipocolesterolémico en productos lácteos fermentados fue realizado por Heptner et al. (1979). En este estudio se probó *in vivo*, con 54 voluntarios, el efecto hipocolesterolémico del consumo de yogur con diferentes tratamientos (pasteurización, sin pasteurización y con 2% de grasa láctea).

Los resultados mostraron una reducción significativa de hasta el 10% del colesterol sérico, después de una semana de suplementación del yogur pasteurizado. De este modo, este estudio conllevó a la búsqueda más específica de los constituyentes bioactivos subyacentes al efecto y los mecanismos involucrados.

En otro estudio similar, se probó el efecto evaluando kéfir a base de leche bovina y a base de soya en modelo *in vivo* utilizando hámsters administrados con una dieta hipocolesterolémica. Ambos tratamientos mostraron una reducción significativa de los niveles séricos de triglicéridos y de colesterol total en plasma e hígado (Liu et al., 2006); sin embargo, aun se desconocen los compuestos bioactivos involucrados en dicho efecto. Rodríguez-Figueroa et al. (2013) reportó que la administración de leches fermentadas con cepas específicas de *L. lactis* disminuyen la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Además de reducir la presión arterial, también se observó que la leche fermentada tuvo la capacidad de mejorar el perfil lipídico, principalmente disminuyendo las concentraciones de c-LDL y triglicéridos en plasma. Sin embargo, este estudio no implicaba la participación de microorganismos probióticos, por lo cual, el efecto pudo deberse a otros constituyentes bioactivos.

Finalmente, en un estudio *in vitro* con leches fermentadas, investigación la posible participación de los péptidos bioactivos para reducir los niveles de colesterol. En este estudio, los extractos crudos obtenidos de leche fermentada con mezcla de BAL (*Lb. casei*, *Lb. acipophilus*, *Streptococcus (S.) thermophilus*, *Lb. bulgaricus* y *Bifidobacterium*) y de leche fermentada adicionada con proteasas (prozima) fueron probadas para conocer si los péptidos presentaban capacidad de unión a sales biliares. Los resultados sugieren un posible efecto hipocolesterolémico con ambos tratamientos (Chen et al., 2006).

Por otro lado, recientemente la producción de alimentos funcionales se ha enfocado a incrementar o extender la funcionalidad de las leches fermentadas u otros alimentos. En este contexto, incluye la evaluación multifuncional de los péptidos bioactivos o en general de los alimentos funcionales. Lo anterior representa una ventaja ya que la presencia de este tipo de péptidos puede inhibir o modular varios mecanismos al mismo

tiempo, logrando un incremento del efecto mucho mayor en una o varias enfermedades (Aguilar-Toalá et al., 2016; Mohanty et al., 2016). Para el caso particular de la aterosclerosis y las ECV, se ha señalado que los péptidos hipocolesterolémicos junto con los péptidos antitrombóticos pueden lograr un efecto mucho mayor en la reducción de estas patologías (Marcone et al., 2016).

2.10. Péptidos Antitrombóticos y Mecanismos Involucrados

2.10.1. Péptidos Antiagregantes Plaquetarios

Uno de los procesos importantes en el proceso de formación del trombo es la adhesión, la activación y la posterior agregación de las plaquetas en la zona de lesión (Lievens y Hundelhausen, 2011). Diversos compuestos bioactivos han mostrado capacidad para modular la agregación de las plaquetas (Cian et al., 2015; Vilahur y Badimon, 2013). En particular algunos fragmentos derivados de las proteínas lácteas han mostrado capacidad para inhibir la agregación de las plaquetas. El fragmento mejor conocido se denomina “casoplatelina” derivada de la parte c-terminal de k-CN (f106-116) el cual demostró capacidad para inhibir la agregación plaquetaria inducida por ADP y además unirse al fibrinógeno (Jolles et al., 1986). Su bioactividad se asoció a la similitud estructural con el fibrinógeno, los cuales fueron capaces de antagonizar el acoplamiento de fibrinógeno con su receptor la glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), ubicado en la membrana de las plaquetas.

Posteriormente, Leoinil y Molle (1990) señalaron que las fracciones 106-112, 113-116 derivadas de caseinomacropéptido (CMP) podían inhibir la agregación plaquetaria. Así también, péptidos de k-CN-CGP (parte caseinoglucopeptido) de oveja, inhibieron la agregación inducida por trombina de una manera dosis-dependiente; los péptidos identificados fueron KDQDK (f112-116), TAQVTSTEV (f163-171), QVTSTV (f165-

171). En un experimento *ex vivo* mostró que el 17% de CGP se encontró 60 min después de su inyección en bolo de cobaya (Qian y Jolles, 1995). De la misma forma, Mazoyer et al. (1990) identificó el péptido KRDS derivadas de lactotransferrina, este mismo péptido presentó capacidad para inhibir la liberación de serotonina y tromboxano (Levy-Toledano et al., 1995), los cuales son activadores plaquetarios. Así también, péptidos antiagregantes plaquetarios fueron identificados en plasma de recién nacidos después de la ingesta de leche humana y bovina, los péptidos identificados derivaron principalmente de k-CN (Chabance et al., 1995). Estudios recientes han demostrado que los péptidos antitrombóticos pueden ejercer su actividad mediante otros mecanismos, tal como la inhibición de otros factores de coagulación, tal es el caso de la trombina.

2.10.2. Péptidos Inhibidores de Trombina

Durante la trombosis, otro proceso clave es la activación de la cascada de coagulación, la cual está mediada principalmente por la activación de la trombina; una enzima tipo proteasa que tiene como papel fundamental la conversión de fibrinógeno a fibrina. Dado su papel central en la coagulación y la hemostasia, la trombina es considerada un objetivo prometedor para el tratamiento de complicaciones trombóticas (Mackman et al., 2007 Chen et al., 2015). Diversos compuestos bioactivos han sido evaluados para conocer la potencial actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina, de los cuales se incluyen hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos.

Dentro de los compuestos antitrombóticos se encuentran los hidrolizados de proteína de clara de huevo (Yang et al., 2007), en los cuales se observaron una inhibición del 90% con una concentración de proteína peptídica de 40 mg/mL. Así también, Zhang et al. (2008) usando hidrolizados de proteína de colza, demostraron que con una concentración entre 30-40 mg/mL de proteína inhibió el 90% de la coagulación inducida por trombina; no obstante, los resultados no fueron comparables con la heparina, el cual es un anticoagulante comercial. Posteriormente, Sabbione et al. (2015) demostraron que hidrolizados de proteína de amaranto exhibieron capacidad de inhibición de trombina

con un IC_{50} de 80 $\mu\text{g/mL}$ de péptido, además retardó el tiempo de coagulación en plasma. Así mismo, el análisis de péptidos mostró que la carga positiva de los aminoácidos influía en la capacidad de inhibición de trombina (Sabbione et al., 2016). De la misma forma, Zhang (2016), encontró que hidrolizados derivados de cacahuete presentaron inhibición del 86% de trombina con 50 mg/mL de proteína bajo condiciones de optimización de hidrólisis (Alcalasa 2.4 L, 5000 U/mL, pH 8.5, 2 h, 50 °C). Posteriormente, los péptidos purificados por cromatografía líquida inhibieron completamente la enzima trombina. Recientemente, en un estudio realizado por Tu et al. (2017), se investigó la relación estructura–actividad de los péptidos derivados de caseína mediante ensamblaje molecular. En sus hallazgos demostraron que los péptidos con actividad inhibidora de trombina, se unen alostéricamente al sitio de unión del fibrinógeno, a uno de los dos exóitos de reconocimiento del dicho sustrato.

2.10.3. Derivados Lácteos Fermentados con Actividad Antitrombótica

Respecto a estudios en leche fermentada, Rojas-Ronquillo et al. (2012), determinaron la actividad antitrombótica de péptidos liberados de caseína durante la fermentación de leche por *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. De estas dos cepas, solo los extractos crudos de leche fermentada con *Lactobacillus casei* tuvo la capacidad para inhibir la coagulación del fibrinógeno inducida por trombina con un 80.7% a las 27 h de fermentación. Por otro lado, se evaluó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA); de hecho, ambas cepas liberaron péptidos inhibidores de la ECA. Además, identificaron que la secuencia YPEPVLGPVRGPFPIIV (β -CN) presentó ambas actividades biológicas.

En un estudio realizado por Rendón (2016), se determinó la actividad antitrombótica mediante la inhibición de trombina de extractos acuosos crudos y fracciones péptidicas $< 3\text{kDa}$ y $< 10\text{kDa}$ provenientes de leches fermentadas por 48 h con cepas altamente proteolíticas de *Lactobacillus* spp y *Enterococcus* spp. En los resultados, la mayor

eficiencia de inhibición (% de inhibición/mg de proteína) fue presentada por los extractos < 3KDa. Cuatro cepas fueron capaces de inhibir parcialmente el coágulo de fibrina, con una concentración de proteína péptidica de 0.53-0.74 mg/mL.

2.11. Biodisponibilidad de Péptidos Bioactivos

Durante el proceso de digestión, el alimento ingerido es procesado por las diferentes secreciones exocrinas del páncreas, hígado y de la mucosa gástrica. Las cuales rompen y disuelven las moléculas alimentarias obteniendo compuestos mas pequeños que son absorbidos posteriormente en el duodeno y yeyuno intestinal (Sánchez-Rivera, et al., 2013). Para el caso específico de las proteínas, estas son hidrolizadas ampliamente por el paso del sistema gastrointestinal (GI), obteniendo oligopéptidos y aminoácidos libres (Sauer et al., 2017). En el campo de estudio de los péptidos bioactivos, mantener la actividad biológica de estos compuestos es crucial para mantener el efecto benéfico, para lo cual es importante la evaluación de la biodisponibilidad de estos compuestos. El concepto de biodisponibilidad es primordial para el desarrollo de alimentos funcionales; ya que se refiere a la porción del compuesto bioactivo se debe encontrar disponible para ejercer su efecto fisiológico (Wang y Le, 2008). Dicha definición integra los conceptos de bioaccesibilidad y la bioactividad. La primera hace referencia a los procesos que influyen desde la ingesta oral hasta llegar al metabolismo presistémico (intestinal y hepático). Por su parte, la bioactividad se refiere al transporte del compuesto bioactivo hasta llegar al tejido diana y ejercer una respuesta fisiológica (Fernández-García, 2009).

Para la evaluación de la bioaccesibilidad, se han establecido métodos *in vitro* los cuales reproducen de forma semejante las condiciones del sistema gastrointestinal ya sea en modo estático o dinámico (Cardoso et al., 2015). Las principales características de los métodos gastrointestinales son la temperatura, la composición química y enzimática de las secreciones (saliva, jugo gástrico, jugo duodenal, y jugo biliar). Los métodos más

modernos incluyen a los movimientos peristálticos, movimientos de masticación y secreción controlada automatizada de jugos digestivos (Vergeres et al., 2012).

Algunos estudios sugieren que los péptidos bioactivos pueden resistir a las condiciones gastrointestinales. En un estudio se encontró que los péptidos inhibidores de la ECA (potencialmente antihipertensivos) fueron suficientemente estables contra las proteasas digestivas (Picariello, et al., 2013). Para el caso de los péptidos antitrombóticos, Sabbione et al. (2016) observaron que después de someter a los péptidos a condiciones gastrointestinales, mejoraron su actividad, al inhibir en mayor porcentaje la enzima trombina. Por otra parte, péptidos hipocolesterolémicos han mostrado su estabilidad frente a condiciones gastrointestinales simuladas. En este sentido, un estudio de Zhong et al. (2006) observaron la estabilidad de los péptidos derivados de una hidrólisis enzimática a partir de proteína de soya. Por todo lo anterior, estos estudios son algunas de las evidencias que muestran que algunos péptidos pueden liberarse, mantenerse o incluso, incrementar su bioactividad después de la digestión. Es por ello, que la evaluación de la resistencia a enzimas digestivas constituye uno de los factores a tomar en cuenta cuando se estudian a los péptidos bioactivos.

3. HIPÓTESIS

Cepas específicas de *Lactococcus lactis* durante el proceso de fermentación láctea, liberan péptidos con efecto cardioprotector bifuncional, al presentar actividad potencialmente antitrombótica e hipocolesterolémica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar *in vitro* la actividad hipocolesterolémica y antitrombótica de leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis*.

4.2. Objetivos Particulares

Evaluar la actividad inhibidora de trombina y actividad anticoagulante en plasma por leches fermentadas con *L. lactis*

Evaluar *in vitro* la actividad hipocolesterolémica de leches fermentadas con *L. lactis*.

Evaluar el efecto de las condiciones gastrointestinales sobre las bioactividades de las fracciones < 3 kDa derivadas las leches fermentadas con *L. lactis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas de Estudio

El presente estudio se utilizaron cinco cepas de *Lactococcus lactis* (Tabla 2) para la elaboración de leches fermentadas con 24 y 48 h. Dichas cepas forman parte del cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos lácteos, Calidad y Autenticidad de Alimentos, de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC, Hermosillo, Son.). Las cepas fueron previamente aisladas a partir de productos lácteos artesanales (Gutiérrez-Méndez et al., 2018). Éstas se encuentran depositadas en la colección de cultivos del Servicio de Investigación Agrícola (ARS por sus singlas en inglés), del Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

Tabla 2. Cepas de *Lactococcus lactis* empleadas en el presente estudio.

Cepas de <i>L. lactis</i>	Código
NRRL B-50571	L-571
NRRL B -50572	L-572
NRRL B-50600	L-600
NRRL B-50598	L-598
NRRL B-50599	L-599

5.2. Reactivación y Estandarización del Proceso de Propagación de las Cepas

Las cepas L-572 y L-571 fueron reactivadas y propagadas de acuerdo a la metodología previamente sugerida por Rodríguez-Figueroa et al. (2010) y Beltrán-Barrientos et al. (2018). El proceso consistió en reactivar las cepas almacenadas en solución crioprotectora (glicerol 20%), en caldo M17 al 1% (v/v) (DIFCO, Sparks, MD, EE.UU.) suplementado con lactosa (DIFCO) estéril al 10% (p/v). Las muestras se incubaron por 24 h a 30°C, el proceso se repitió una vez más bajo las mismas condiciones.

Para las cepas L-600, L-598 y L-599, el proceso de propagación se estableció de acuerdo a las características basadas a su preferencia de carbohidrato, y los tiempos de propagación se estimaron mediante dos curvas de crecimiento de dos subcultivos sucesivos. Brevemente, las cepas fueron reactivadas en caldo M17 suplementada individualmente, con dextrosa (DIFCO, Sparks, MD, USA) y lactosa, y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Después de este tiempo, se tomó una alícuota (1% v/v) de cultivo, y se sembró nuevamente en M17 con su respectivo carbohidrato, en este tiempo se registraron las absorbancias (DO 600 nm) a cada hora para elaborar curvas de crecimiento (1er cultivo) durante 12 h. Una hora antes del inicio de la fase estacionaria del primer cultivo se tomó otra alícuota (1% v/v), y se sembró nuevamente en el mismo caldo y las curvas de crecimiento se elaboraron una vez más por un tiempo de 12 h. A partir de las curvas de crecimiento (1er y 2do cultivo) se establecieron los tiempos de propagación. Para elaborar los inóculos de trabajo, los cultivos se inocularon individualmente (3% v/v) en leche descremada (Alpura, México) reconstituida (10 % p/v) estéril (110°C por 10 min) y se dejaron incubar por 12 h a 30 °C.

5.3. Elaboración de Leches Fermentadas

La preparación de la leche fermentada se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Rodríguez-Figueroa et al. (2010) y Beltrán-Barrientos et al. (2018). Se reconstituyó leche descremada (10 % p/v) y se pasteurizó (80 °C/30 min) seguido de un enfriamiento rápido con hielo. Los inóculos de trabajo se sembraron al 3 % (p/v) en leche y incubaron a 30 °C durante 24 o 48 h. Con la finalidad de detener el proceso de fermentación, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico (75 °C/15 min), seguido de un enfriamiento con hielo hasta alcanzar una temperatura de 4 °C. Las muestras de leche fermentada se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis de las actividades biológicas (Figura 3).

5.4. Simulación Gastrointestinal *in vitro* de Leches Fermentadas

Las leches con 24 y 48 h de fermentación fueron descongeladas y posteriormente fueron expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas de acuerdo a la metodología previamente reportada por Kopf-Bolantz et al. (2012), modificada de Versantvoort et al. (2005). El proceso de digestión consistió en tres pasos (Figura 4), simulando la boca, el estómago y el intestino delgado. Los jugos digestivos fueron preparados de acuerdo a las concentraciones descritas en la Tabla 3. Primeramente, 4.5 mL de leche fermentada fueron incubados con 6 mL de saliva artificial por 5 min (pH 6.5-6.8), en un baño termostático con agitación (300 rpm) y temperatura controlada a 37 °C. Después de este tiempo, se adicionaron 12 mL de jugo gástrico ajustando el pH entre 2-3, y se dejó incubar por 2 h. Posteriormente, 12 mL de jugo pancreático y 12 mL de bilis se adicionaron a la mezcla la cual se incubó por 2 h más (pH 6.5-7). Después de la simulación gástrica, se tomaron alícuotas de 2.5 mL para la cuantificación de grupos amino libres mediante el método espectrofotométrico 0-ftalaldehído (OPA) como se describe en la siguiente sección.

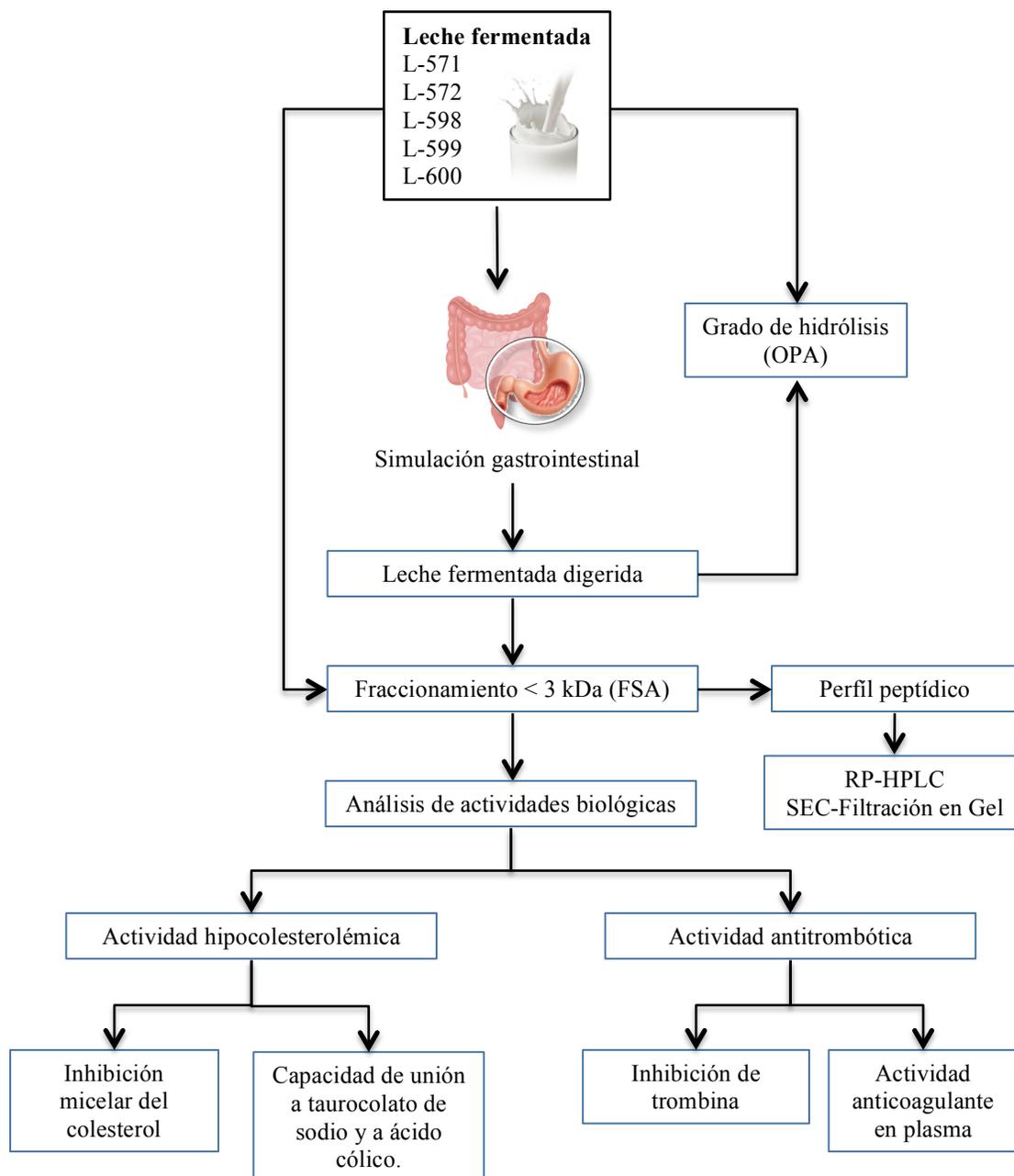


Figura 3. Esquema general experimental para la evaluación *in vitro* de la actividad hipocolesterolémica y antitrombótica de leches fermentadas con las diferentes cepas de *L. lactis*.

Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta posteriores análisis de las actividades biológicas. Para el ensayo de la actividad hipocolesterolémica, la adición de jugo biliar en el proceso de simulación gastrointestinal se omitió para su incorporación posterior en las evaluaciones respectivas.

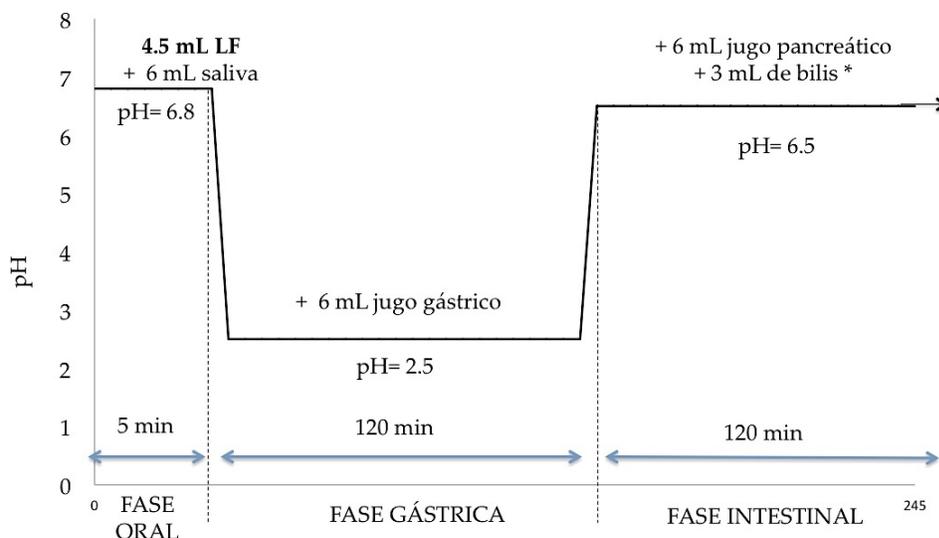


Figura 4. Condiciones de pH y tiempo de cada etapa de la simulación gastrointestinal, adaptado de Kopf-Bolanz et al. (2012).

5.5. Cuantificación de Grupos Amino (NH_3) Libres

La cuantificación de grupos aminos libres, como indicador del grado de hidrólisis en el proceso de fermentación y digestión gastrointestinal de las leches fermentadas, se realizó mediante el método de OPA (Church et al., 1983). Brevemente, se tomaron muestras de 2.5 mL de leche fermentada digerida o sin digerir e inmediatamente se mezclaron con 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.75 N y 0.5 mL de agua bidestilada. La mezcla se agitó vigorosamente por 1 min y se dejó reposar por 10 min.

Tabla 3. Composición de los diferentes jugos digestivos empleados en la simulación gastrointestinal.

SALIVA			JUGO GÁSTRICO			JUGO PANCREÁTICO			BILIS		
V	componente	S.M	V	Componente	S.M	V	Componente	S.M	V	Componente	S.M
mL		gL ⁻¹	mL		gL ⁻¹	mL			mL		gL ⁻¹
10	KCl	46.72	28	KCl	46.72	5.4	KCl	46.72	5.4	KCl	46.72
1	KSCN	50	0.9	KH ₂ PO ₄	68	0.8	KH ₂ PO ₄	68	17.8	KH ₂ PO ₄	68
20	KH ₂ PO ₄	68	6.5	NaHCO ₃	168	42.5	NaHCO ₃	42.5	9.5	NaHCO ₃	84
4	NaHCO ₃	84	10	NaCl	120	8	NaCl	120	8	NaCl	120
1	NaCl	120	0.3	Urea	22.5	2.4	Urea	22.5	5.2	Urea	22.5
10	Urea	22.5	2	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	1.1	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	1.1	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30
1	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	1	NH ₄ Cl	27.28				10	NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	187.7
			1	Ácido glucoronico	9.7						
	El pH se ajustó a 6.8±0.2		1	Glucosamina	167.5		El pH se ajustó a 8.1±0.2			El pH se ajustó a 8.2±0.2	
			1	Galactosa	160.35						
				El pH se ajustó a 1.3 ±0.2							
				El volumen final de cada solución se aforó a 500mL con agua bidestilada y se almacenó a -20°C							
	Por cada mL de saliva		Por cada mL de jugo gástrico			Por cada mL de jugo pancreático			Por cada mL de bilis		
[L		g/L	[L		g/L	[L		g/L	[L		g/L
0.5	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.15	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.15	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588	0.925	CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	588
20	Mucina	50	20	Mucina	70	40	Mucina	35	7.2	BSA	250
0.2	Amilasa	12.5 (mg	4	BSA	250	4	BSA	250	200	Bilis	300
		/mL)									
0.2	Lisozima	93.5	4	Pepsina	625	50	Pancreatina	360			

V: volumen, SM: Solución madre.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó a $4696 \times g$, por 40 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Thermo Scientific, Chelmsford, MA, EE.UU), y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (MILLEX Millipore). Para las lecturas espectrofotométricas, la reacción se realizó en una cubeta de cuarzo, colocando $30\text{ }\mu\text{L}$ de extractos de TCA y $600\text{ }\mu\text{L}$ de reactivo de OPA (Sigma-Aldrich, St. Louis M.O. EE.UU). La mezcla se dejó incubar por 2 min a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, aislado de la luz, y finalmente la absorbancia se leyó inmediatamente a 340 nm (SpectraMax, M3, Sunnyvale, CA, EE.UU). El extracto de TCA de leche sin fermentar, se utilizó como blanco. El grado de hidrólisis se expresó como mg/mL de L-leucina liberados durante la fermentación o simulación gastrointestinal, mediante una curva estándar de L-leucina con concentraciones de 0-2 mg/mL.

5.6. Preparación de Fracciones Solubles en Agua

Las leches fermentadas con 24 y 48 h antes y después de ser expuestas a la simulación gastrointestinal se descongelaron y se centrifugaron a $4696 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 min. El sobrenadante o extracto crudo (EC) se separó del precipitado. Posteriormente el EC se fraccionó empleando un ultrafiltrador con agitación (Ultracel Amicon Ultrafiltration Disc; Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) con una membrana de corte de peso molecular de 3 kDa (Membrane Filter Ultracel 3 kDa, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). Las fracciones solubles en agua de leche fermentada (FSA-LF) y de leche digerida (FSA-LFD) $<3\text{ kDa}$ fueron posteriormente liofilizados

5.7. Obtención de los Perfiles Cromatográficos de Péptidos de Leches Fermentadas

5.7.1. Perfil Peptídico Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC)

Los perfiles peptídicos se obtuvieron empleando el sistema de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (1000 Series; Agilent Technologies Waldronn, Alemania). Las fracciones < 3 kDa de leche digerida y sin digerir (20 μ L) se cargaron en una columna C-18 (4.6 X 250 nm 5 μ m de tamaño de partícula, y tamaño de poro de 180-Å; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.). La separación de péptidos se llevó a temperatura ambiente (22 °C) con un flujo de solvente de 0.25 mL/min. Las soluciones utilizados para separación en línea incluyen solvente A, el cual consistió en una mezcla de agua-ácido trifluoroacético (1000:0.4, v/v) y solvente B conteniendo acetonitrilo-ácido trifluoroacético (1000:0.3, v, v). Los péptidos se eluyeron en un gradiente lineal de solvente B en solvente A. La concentración de solvente B se incrementó linealmente de 0.1 a 60% en 30 min y de 60 a 99.9% entre los 30 a 35 min, posteriormente se disminuyó de 99.9 a 0.1% entre 35 a 40 min.

5.7.2. Perfil Peptídico Mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaño

Los perfiles péptidos de las leches fermentadas fueron obtenidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en un equipo AKTA PURE, (GE HealthCare, Piscataway, NJ, EE. UU) usando una columna de filtración en gel Superdex Peptide 10/300 GL 10x 300 mm (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE. UU.). Las fracciones < 3 kDa de leches digeridas o sin digerir liofilizadas se disolvieron (100 mg/mL) en la fase móvil (solución amortiguadora de fosfato 50 mmol/L, pH 7.0, con NaCl 0.15M). 100 μ L de muestra se cargaron en el sistema, y se realizó la corrida en una elución isocrática con

un flujo de 0.60 mL / min durante 60 min. La detección de los péptidos se realizó a 280 nm.

5.8. Determinación de la Actividad Hipocolesterolémica

5.8.1. Inhibición Micelar del Colesterol

Con la finalidad de determinar si las fracciones peptídicas de leches fermentadas presentaban actividad hipocolesterolémica *in vitro* mediante la capacidad de la desintegración de las micelas de colesterol, se estudió la inhibición micelar del colesterol. Se preparó solución micelar del colesterol de acuerdo a lo descrito por Kirana et al. (2008) con modificaciones. Los lípidos con concentraciones finales de 0.5 mmol/L de colesterol, 2.4 mmol/L de fosfatidilcolina y 1 mmol/L de ácido linoleico se disolvieron en metanol, y se secaron con una corriente de nitrógeno. La mezcla de lípidos final se redisolvió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 15 mmol/L (pH 7.2) con 132 mmol/L de NaCl la cual contenía 6.6 mmol/L de taurocolato de sodio. Para formar las micelas, la suspensión se sonicó durante 20 min usando un acuasonicador (Aquasonic VWR, Filadelfia, EE.UU.) con 60 Hz. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1 mL de solución micelar y se incubaron por 24 h a 37 °C. Después de este tiempo, se adicionaron 50 mg de FSA-LF, FSA-LFD o colestiramina, un fármaco hipocolesterolémico, (testigo positivo) a 1 mL de solución micelar y nuevamente se sonicaron por 2 min. La mezcla se incubó durante 2 h y luego se centrifugó a 1000 x g por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se filtró a través de un filtro de 0.22 µm, y el contenido de colesterol remanente presente en el filtrado se cuantificó mediante un kit colorimétrico comercial (Randox Laboratories, RGB.). El porcentaje de inhibición de la formación de las micelas de colesterol se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{C_0 - C_s}{C_0} (100) \quad (1)$$

Donde

C₀ representa la concentración de colesterol de las micelas originales, y C_s es el colesterol presente en las muestras.

5.8.2. Capacidad de Unión a Sales Biliares

La capacidad de unión a sales biliares se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Yoshie-Stark y Wasch (2004) y Lin et al., (2009). Se mezclaron por separado 2 mmol/L de sales biliares (taurocolato de sodio y ácido cólico) en una solución amortiguadora de fosfato de sodio (50 mmol/L, pH 7.5). Por otro lado, se resuspendió 100 mg de FSA-LF o FSA-LFD en la solución de tampón de ensayo y una alícuota de 100 µL se transfirieron a un tubo y mezclaron con 900 µL de solución de sal biliar. Posteriormente, la mezcla se incubó por 2 h a 300 rpm, (Eppendorf, Termomixer R mixer, Brighman, NY. EE.UU.) a 37 °C y se centrifugó a 22 000 x g por 30 min. Seguidamente, el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un matraz volumétrico. El precipitado se resuspendió con 1 mL de solución tampón de ensayo y fue nuevamente centrifugado y el sobrenadante se adicionó al matraz, esta operación se repitió una vez más. El matraz se aforó a 10 mL y la solución final se ultrafiltró usando una membrana de corte de peso molecular de 1 kDa (Membrane Filter Ultracel 1 kDa, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). La concentración de sal biliar se determinó usando un kit comercial fluorométrico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EE.UU.), mediante una curva estándar de colato de sodio (0-25 mmol/L).

5.9. Determinación de la Actividad Antitrombótica

5.9.1. Actividad Inhibidora de Trombina

La actividad antitrombótica se determinó utilizando el método turbidimétrico en una microplaca, de acuerdo con Rojas-Ronquillo et al. (2012), en el cual se determina la inhibición de la enzima trombina. Las FSA-LF y FSA-LFD liofilizadas se disolvieron en solución tampón de ensayo (50 mmol/L TRIS-HCl, pH 7.2, con 0.12 mmol/L de NaCl), ajustando la concentración a 1 mg/mL de proteína. El lector de microplacas (SpectraMax, M3) se ajustó a 37 °C. En los pocillos de la microplaca se añadieron 140 µL de fibrinógeno al 0.1% (p/v) disueltos en solución tampón de ensayo y se añadieron 40 µL de muestra o tampón. La microplaca se agitó por 5 s y la mezcla se dejó incubar por 10 min a 37 °C, después de este tiempo se registraron las absorbancias a 405 nm. Para comenzar la reacción de coagulación de fibrinógeno, se añadieron 10 µL de trombina (12 UI/mL) a la mezcla en cada pocillo. Después de 10 min de incubación, las absorbancias se registraron nuevamente (muestra y control). Se utilizó heparina (1 mg/mL) como testigo positivo. Los porcentajes de inhibición se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(C-CB)-(S-SB)}{(C-CB)} (100) \quad (2)$$

Donde:

C: Fibrinógeno más solución amortiguadora, antes de incubación, después de adicionar la enzima

CB: Fibrinógeno más solución amortiguadora, después de la incubación, antes de adicionar la enzima.

S: Fibrinógeno más muestra, después de la incubación, después de adicionar la enzima

SB: Fibrinógeno más muestra, después de la incubación, antes de adicionar la enzima.

Así también, se elaboraron curvas dosis-respuesta con 3 concentraciones de FSA-LF y FSA-LFD (1, 0.6 y 0.4 mg/mL de proteína) con la finalidad de calcular la concentración mínima para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC_{50}).

5.9.2. Evaluación de la Actividad Anticoagulante en Plasma

La actividad de la actividad anticoagulante se estudió mediante las pruebas globales de hemostasia (tiempo de trombina y tiempo de protrombina). Para la evaluación se empleó plasma descalcificado citrato, el cual se obtuvo a partir de 6 donantes. Los criterios de inclusión fueron aquellas personas sanos y sin ingerir algún medicamento anticoagulante o antiplaquetario. Los criterios de exclusión fueron personas con enfermedades cardiovasculares, con problemas hemostáticos (con hemofilia, trombocitopenia) y con factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hiperlipidemia, hipertensión). La sangre se obtuvo mediante venopunción y se almacenó en tubos que contenían 3.2% de citrato de sodio (p/v) (BD Vacutainer, N.J. EE.UU.). Posteriormente, el plasma se separó de las células sanguíneas antes de los 30 min, centrifugando a 2200 x g durante 15 min. Las pruebas de coagulación se realizaron mediante un kit comercial (Wiener Lab, Argentina).

a) Tiempo de trombina (TT). El TT se determinó manualmente en un baño termostático. El proceso consistió en colocar 75 μ L de plasma en un tubo de hemólisis mezclado con 25 μ L de FSA-LF o FSA-LFM (1 mg de proteína en solución amortiguadora TRIS-HCl) y se dejó incubar por 2 min. Consecutivamente, se adicionaron 100 μ L de reactivo de TT (trombina 2 IU/mL) y rápidamente se registró el tiempo de formación del coágulo.

b) Tiempo de protrombina (TP): El TP se realizó incubando individualmente el reactivo de TP (Soluplastin) y plasma (75 μ L) mezclado con FSA (25 μ L) en el baño termostático, la temperatura se mantuvo a 37°C por 2 min, y después de la incubación, la mezcla plasma-FSA se adicionó al tubo que contenía el reactivo de TP. A partir de este

momento, se registró el tiempo de formación del coágulo (s). Se utilizó la solución amortiguadora TRIS-HCl 0.05M, pH 7.2 con 0.12 mM NaCl como testigo negativo y heparina (1 mg/mL) como testigo positivo.

5.10. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar, para todo análisis se verificó la normalidad de los datos como un requisito previo al análisis de varianza (ANOVA). Se realizó una comparación de medias mediante t -student pareada para la bioactividad antes y después de la simulación gastrointestinal para un mismo tiempo de fermentación. Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estandarización del Proceso de Propagación de las Cepas de Estudio

Se ha descrito que las BAL son exigentes en cuanto a las condiciones de crecimiento y principalmente en los requerimientos nutricionales, tales como los péptidos, aminoácidos, vitaminas, sales y principalmente el carbohidrato como fuente de energía (Jackson, 2000). Por lo anterior, con la finalidad de obtener a las bacterias en mejores condiciones de crecimiento, tres de las cepas fueron evaluadas en cuanto a su capacidad para crecer utilizando dos fuentes diferentes de carbono (lactosa y dextrosa) en su medio específico.

La Figura 5 (a, b, c) , muestra las curvas de crecimiento de las cepas L-598, L-599 y L-600 en su medio específico (M17). A partir de las mismas se puede observar que el comportamiento del crecimiento fue exponencial las bacterias en general; en la cual se estableció la fase de adaptación o latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria, para todas las cepas utilizando independientemente lactosa y dextrosa. Analizando el crecimiento para ambos carbohidratos, se pudo observar que en general, las cepas que fueron crecidas en medio suplementado con dextrosa exhibieron un mejor crecimiento, al presentar mayores valores de D.O. De entre estas se puede notar mejor la diferencia con la cepa L-598, la cual en el medio con lactosa presentó un crecimiento de 0.64 en la fase estacionaria, mientras que utilizando dextrosa su crecimiento alcanzó a 1.93 de D.O. Además, otro cambio que se presentó, fue la reducción de la fase de latencia, en donde para las tres cepas, solo se requirió de aproximadamente de una hora para adaptarse a las condiciones del medio.

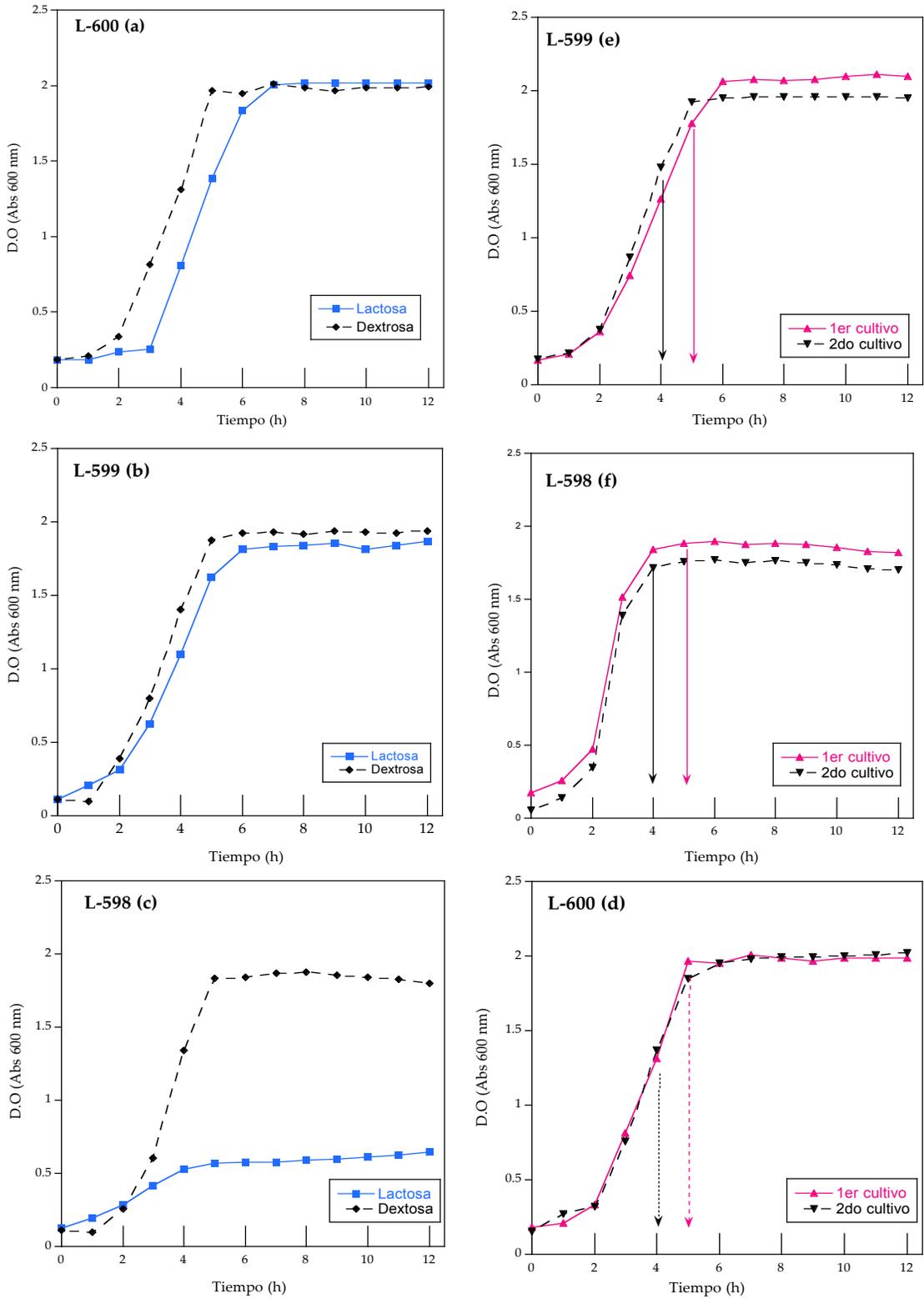


Figura 5. Curvas de crecimiento de *L. lactis* (L-600, L-599 y L-598) en medio M17 suplementado con lactosa y dextrosa (a, b y c). Curvas de crecimiento M17-Lactosa en el primer y segundo cultivo (d, e y f).

Resultados similares fueron encontrados en algunos estudios, tal es el caso del realizado por Passerini et al. (2013), en el cual empleando cepas de *L. lactis* (IL1404 y A12) exhibieron un mejor crecimiento empleando glucosa como fuente de carbono, en comparación con otros carbohidratos como, galactosa y fructosa, mientras que con lactosa no exhibió crecimiento. Así también, un experimento empleando bacterias del genero *Lactobacillus*, se encontró una mayor tasa de utilización (mg/min) de glucosa en comparación con fructosa, sacarosa o lactosa, además se vio reflejado en un mejor crecimiento (UFC) y un menor tiempo de generación.

Los estudios a nivel genómico han evidenciado que los diferentes patrones de utilización de carbohidratos están asociado con la composición de proteínas del metabolismo de carbohidratos (Neves et al., 2005). Es decir, las enzimas requeridas para el metabolismo de glucosa muchas veces son constitutivas de las BAL, lo cual da como resultado una utilización más rápida y eficiente de dicho carbohidrato, mientras que para otros azúcares, como los disacáridos, se requiere la inducción de ciertas enzimas en la etapa inicial del metabolismo (Srinivas et al., 1990).

Otros estudios a nivel genómico han informado que el proceso metabólico se encuentra eficientemente regulado dependiendo de la biodisponibilidad del carbohidrato en el medio o nicho ecológico en el cual se encuentra la bacteria (Teusink y Molenaar, 2017). Dentro de los reguladores se encuentra la expresión de *ccPA* (proteína de control de catabolito), un gen implicado en el control de la glucólisis y el metabolismo fermentativo (Mahr et al., 200; Neves et al., 2005). O bien la represión del catabolito de carbono (CCR), un mecanismo regulador mediante el cual se inhibe la expresión de los genes involucrados para la utilización de fuentes secundarias de carbono mediante la presencia de un sustrato preferido. Lo cual permite a la bacteria aumentar y optimizar su tasa de crecimiento (Stulke y Hillen, 1999).

Por otro lado, con la finalidad de reducir el tiempo de latencia o adaptación de las cepas, se realizaron curvas de crecimiento en dos cultivos sucesivos en el medio, suplementado con dextrosa como carbohidrato preferido. En la Figura 5 (d, e y f) se muestran las

curvas de crecimiento en los dos cultivos. A partir de las mismas se observaron algunas diferencias en cuanto al comportamiento del crecimiento bacteriano. El cambio se centró en el tiempo del establecimiento de la fase exponencial, en la cual en el primer cultivo la fase estacionaria se alcanzó a partir de las 6 h, mientras que en el segundo cultivo, fue a la hora 5. Estas diferencias se han asociado por la actividad metabólica de las bacterias, la cual aumenta una vez que las bacterias se encuentran adaptadas al medio que a su vez influye en la velocidad de crecimiento. Por lo tanto, los tiempos de propagación para la primera y segunda siembra se establecieron como una hora previo al inicio de la fase estacionaria. Es decir, el primer cultivo con una incubación de 5 h y el segundo cultivo de 4 h, en medio M17 suplementado con dextrosa.

6.2. Cuantificación de Grupos Amino (NH_3) Libres en Leche Fermentada

Con la finalidad de observar cambios en el grado de hidrólisis durante el proceso de fermentación por la proteólisis bacteriana en la leche, así como también por acción de las enzimas gastrointestinales una vez que las leches fueron sometidas a la simulación, se cuantificaron los grupos amino libres, expresados como mg/mL L-leucina. Estos valores se asocian directamente a la cantidad de péptidos liberados por la proteólisis y/o digestión, cuya determinación es fundamental cuando se evalúa la actividad y la biodisponibilidad de los péptidos.

La Figura 6 muestra la cantidad de grupos amino libres a las 24 y 48 h de fermentación antes y después de que las leches fueran expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas. Primeramente, se puede observar que durante el proceso de fermentación de la leche, los grupos amino libres se incrementaron ($p < 0.05$) a medida que transcurrió el tiempo de fermentación hasta las 48 h, para la mayoría de las cepas, a excepción de la cepa L-600 ($p > 0.05$), la cual no mostró variación. No obstante, se ha reportado que aumento del tiempo de fermentación no necesariamente implica un incremento de la hidrólisis de las proteínas, ya que este comportamiento metabólico es cepa dependiente.

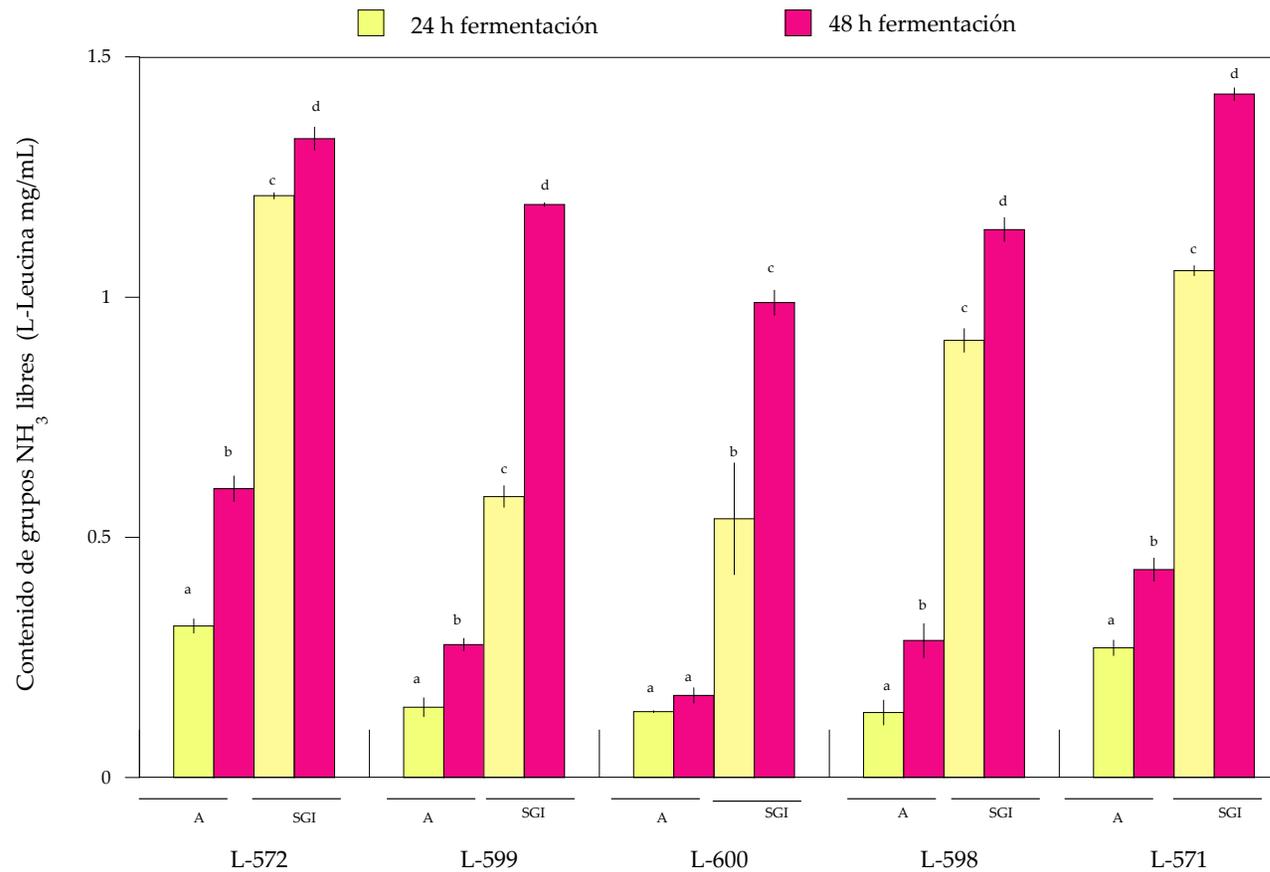


Figura 6. Cuantificación de grupos amino libres (NH_3) expresados como L-Leucina (mg/mL) como indicador de grado de hidrólisis en LF antes (A) y después (SGI) de la simulación gastrointestinal. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el grado de hidrólisis de las leches fermentadas a las 24 y 48 h de fermentación, antes y después de la simulación gastrointestinal, para una misma cepa.

En un estudio realizado por González-Córdova et al. (2011) evaluaron ocho BAL distintas, se encontró que el tiempo de incubación en leche no afectó de manera significativa la liberación de amino libres para la mayoría de las cepas. Por otro lado, en el presente estudio, al comparar los valores de proteólisis entre las cinco cepas, se encontró que la mayor actividad proteolítica fue dada por la cepa L-572, en ambos tiempos de fermentación ($p < 0.05$), mientras que para la cepa L-600, se observó la menor actividad

Se ha reportado que la capacidad proteolítica de las BAL depende de muchos factores, teniendo su origen en las diferencias genéticas de cada una. De hecho, en varios estudios a nivel molecular han encontrado que el sistema proteolítico de las BAL es muy variado en cuanto a sus componentes individuales tales como el sistema de transporte, de proteinasas y de endopeptidasas (Banan-Mwine et al., 2017). Donde se ha encontrado que aquellas con alta capacidad proteolítica, está asociado a un sistema mucho más completo, lo cual podría ser el caso para L-572. Dicha cepa podría ser comparable con *Lb. helveticus* una cepa altamente eficiente en la hidrólisis de proteínas lácteas (Griffiths y Tellez, 2012).

Así también, se ha señalado que el nicho de aislamiento de cada BAL es un factor determinante asociado a las variaciones genéticas para la codificación de proteínas que integran el sistema proteolítico. En un estudio (Liu et al., 2010) se encontró que especies de LAB como *Lb. plantarum*, y *Leuconostoc mesenteroides*, las cuales tienen su origen en nichos vegetales, codifican menos enzimas proteolíticas en sus genomas, debido a que su nicho es rico en fibra, sin embargo contiene menos proteínas. Además, se ha sugerido que BAL nativas, aisladas de nichos ecológicos no favorables para su crecimiento, desarrollan mecanismos metabólicos que les permitan sobrevivir a dichas condiciones; como la capacidad de sintetizar los aminoácidos esenciales para su crecimiento (González-Córdova et al., 2011). Por lo anterior, podría ser el caso de L-600, por su baja actividad proteolítica, puede presentar capacidad para biosintetizar aminoácidos para su crecimiento. Así mismo, se puede observar que, una vez que las leches fueron sometidas a condiciones gastrointestinales la cantidad de grupos amino se

incrementó significativamente ($p < 0.05$), indicando la acción de las enzimas digestivas para la liberación de péptidos a partir de la hidrólisis de las proteínas intactas o de los péptidos obtenidos de la proteólisis bacteriana. Incluso para la mayoría de las leches fermentadas, la actividad proteolítica incrementó dos veces, en donde los valores más elevados se observó para aquellas leches fermentadas que contenían las cepas más proteolíticas (L-572 y L-571) en ambos tiempos de incubación.

Cuando se utilizan BAL como estrategia para la producción de péptidos bioactivos, es importante tener en cuenta la actividad proteolítica, ya que a mayor proteólisis se liberan mayor cantidad de péptidos, y una gran cantidad de estos podrían presentar actividad biológica. No obstante, debe considerarse que los péptidos bioactivos generados a partir de la fermentación con estas bacterias pueden continuar siendo hidrolizados cuando se ingieren y pasan por el sistema gastrointestinal, lo que puede llevar a la generación de péptidos de menor tamaño o aminoácidos y posiblemente obtener, perder, mantener o incluso incrementar su bioactividad. Es por ello que es importante la evaluación de la bioactividad de los compuestos alimentarios o de los alimentos después de una simulación gastrointestinal, ya que nos permite conocer la pérdida, estabilidad o aumento de la actividad biológica de los péptidos.

6.3. Perfil Peptídico de Leches Fermentadas Mediante Cromatografía Líquida

Adicional a la determinación del grado de hidrólisis, se analizaron los perfiles peptídicos de las leches fermentadas antes y después de ser expuestas a condiciones gastrointestinales. Los perfiles fueron obtenidos mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC) y por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los cromatogramas representativos correspondientes a los obtenidos mediante RP-HPLC se muestran en la Figura 7, los cuales corresponden a la leche fermentada por 24 h de la cepa L-571. Comparando los perfiles péptidos se pueden observar cambios cualitativos importantes, una vez que las leches fueron sometidas a condiciones gastrointestinales (Figura 7 a y b).

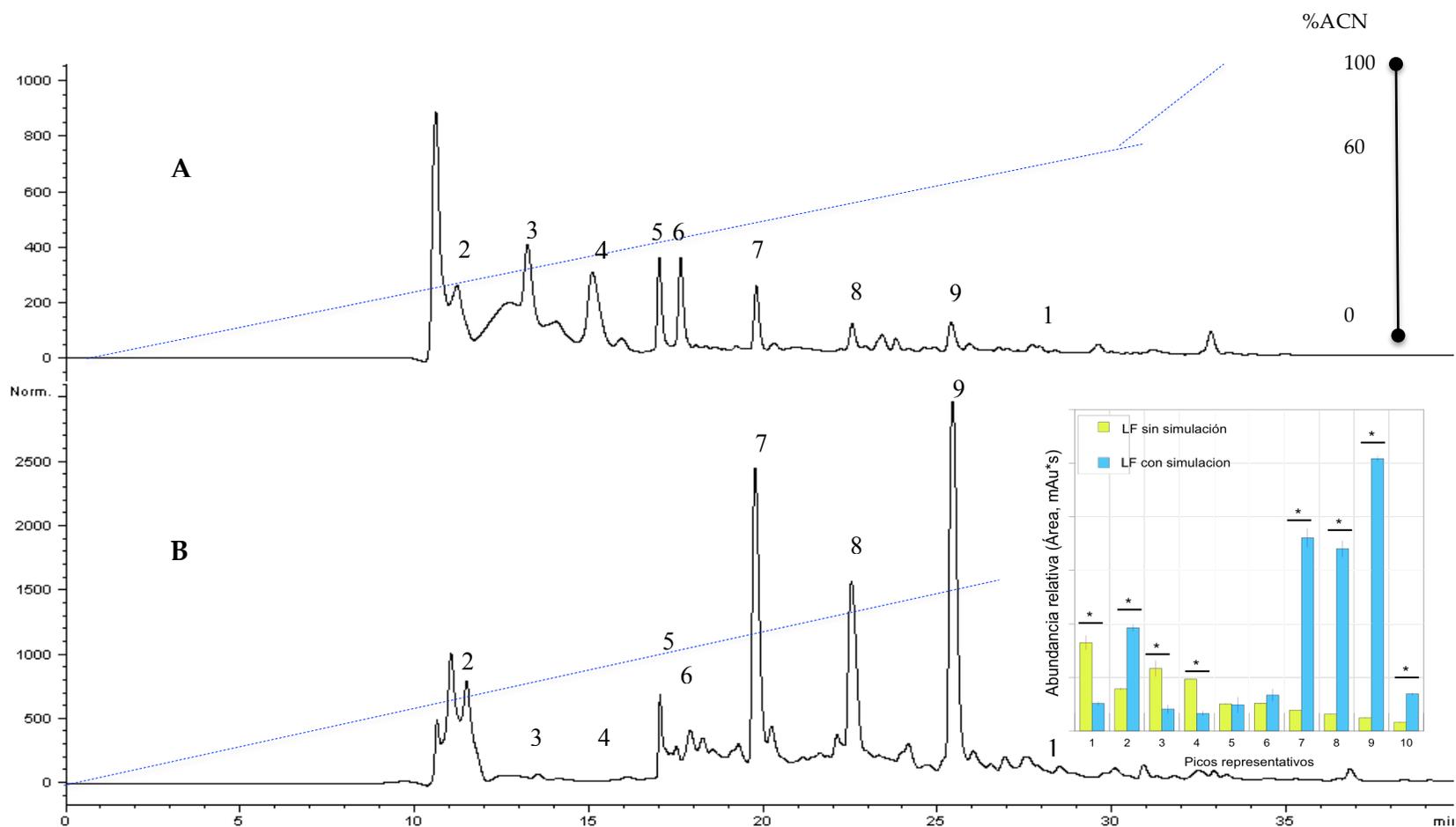


Figura 7. Perfiles peptídicos obtenidos mediante RP-HPLC de fracciones peptídicas < 3 kDa (FSA) obtenidos de la leche fermentada (L-571, 24 h) antes (a) y después (b) de su exposición a condiciones gastrointestinales simuladas (SGI). Comparación de abundancia relativa (c) (mAu*s) de los picos representativos (1-10) del perfil peptídico antes y después de la SGI* representa diferencias significativas ($p < 0.05$) de la abundancia relativa, antes y después de la SGI. Se utilizó una elución en gradiente donde el % ACN (% Acetonitrilo) se incrementó linealmente de 0.1 % hasta 60% de 0 a 30 min, y de 60 a 99.9 % de los 30 a 35 min.

Uno de estos cambios corresponde al aumento de las áreas de los péptidos, los cuales se pueden observar en los picos eluidos en los tiempos de 11.21 (P2), 19.84 (P7), 22.58 (P8) y 25.5 (P9) min; en donde para algunos casos la abundancia relativa de los péptidos (mAu*s) aumentó hasta 10 veces o más. Esto indica la acción de las proteasas digestivas sobre las proteínas intactas o bien de los péptidos liberados en la fermentación. Por el contrario, también se observó la disminución de otros, como es el caso de los péptidos que eran eluidos a los 10.59 (P1), 13.24 (3) y 15.094 (4) min, lo cual indica una hidrólisis peptídica por parte de las enzimas digestivas sobre los péptidos liberados durante la proteólisis bacteriana. Así mismo, para algunos casos la abundancia relativa de los péptidos no se vio afectada, tal es el caso de los picos 5 y 6, lo cual podría atribuirse a la estabilidad de los péptidos eluidos en esos tiempos.

Una de las características de la cromatografía líquida en fase reversa es la separación de compuestos con base en su polaridad. Los péptidos están constituidos por aminoácidos; y éstos contienen en sus cadenas laterales diferentes propiedades que los clasifica como no polar o hidrofóbica, o polar o hidrofílica, los cuales finalmente le aportan propiedades de polaridad a los péptidos. Por lo anterior, mediante el cambio de gradiente de polaridad de la fase móvil es posible separar los péptidos con base en estas propiedades. En la Figura 7 se observa el gradiente utilizado para la separación peptídica, en el cual, inició con una composición de alta polaridad, y la cual se disminuyó al incrementar la concentración de acetonitrilo (ACN). En este contexto, los péptidos liberados mediante la proteólisis bacteriana, presentaron generalmente propiedades más polares, en el cual los picos con mayor abundancia relativa se encontraron dentro de un tiempo de elución de 10 a 17 min. A medida que se incrementó el porcentaje de ACN, la abundancia relativa de los péptidos eluidos fueron disminuyendo.

Por otro lado, comparando el perfil peptídico de la leche fermentada después de haber sido sometida a digestión gástrica e intestinal, se observó la liberación de una mayor cantidad de péptidos más hidrofóbicos (P7, P8 y P9), debido a que presentaron tiempos de elución más prolongados. La generación de péptidos con propiedades hidrofóbicas resulta una ventaja, ya que ha sido reportado que algunas bioactividades, tales como la

hipocolesterolémica y la antioxidante requieren de este tipo de propiedades para su bioactividad (Iwami et al., 2014; Xiet et al., 2015). Además, se ha informado que la biodisponibilidad de péptidos hidrófobos es mayor al tener un mejor transporte a nivel transpitelial (Wang y li, 2018).

Además de las propiedades de carga e hidrofobicidad, el peso molecular de los péptidos es también un factor clave que afecta a las actividades de los péptidos. Por lo anterior, las fracciones peptídicas de las leches fermentadas fueron analizadas mediante SEC con una columna de filtración en gel. Este tipo de cromatografía permite la separación de sustancias con diferentes pesos moleculares, la cual se ha utilizado ampliamente para la separación de hidrolizados de proteínas. La Figura 8 ilustra los perfiles cromatográficos de los péptidos de leche fermentada con L-571 antes (Figura 8a) y después (Figura 8b) de la simulación gastrointestinal. Analizando la figura se pueden observar dos picos importantes (P1a y P2a) en la leche fermentada antes de la simulación. Considerando que a mayor volumen de elución se obtienen péptidos de menor tamaño, se puede señalar que los péptidos obtenidos se encontraron en dos pesos moleculares muy característicos, siendo los de menor tamaño los que se liberaron en menor proporción. Cuando la leche se sometió a la digestión gastrointestinal (Figura 8b) se pudo notar la generación de péptidos con una mayor distribución de pesos moleculares (P1d-P5d). Además de la generación de una mayor cantidad de péptidos de menor peso molecular, como se puede observar con el pico 5 (P5d).

Estos resultados, coinciden con que el proceso de digestión promueve la hidrólisis de los péptidos u oligopéptidos derivados de la proteólisis bacteriana, o bien a partir de las proteínas intactas, generando péptidos de diferentes pesos moleculares (Iwami et al., 2014; Xiet et al., 2015). Lo anterior resulta en parte conveniente, ya que numerosos estudios han informado que el peso molecular de los péptidos influye en la bioactividad. Es decir, péptidos de bajo peso molecular tienen mayor probabilidad de interacción más efectiva con ciertas moléculas. Además, tienen una mayor posibilidad de cruzar la barrera intestinal y llegar intactos al órgano diana (Xiet et al., 2015).

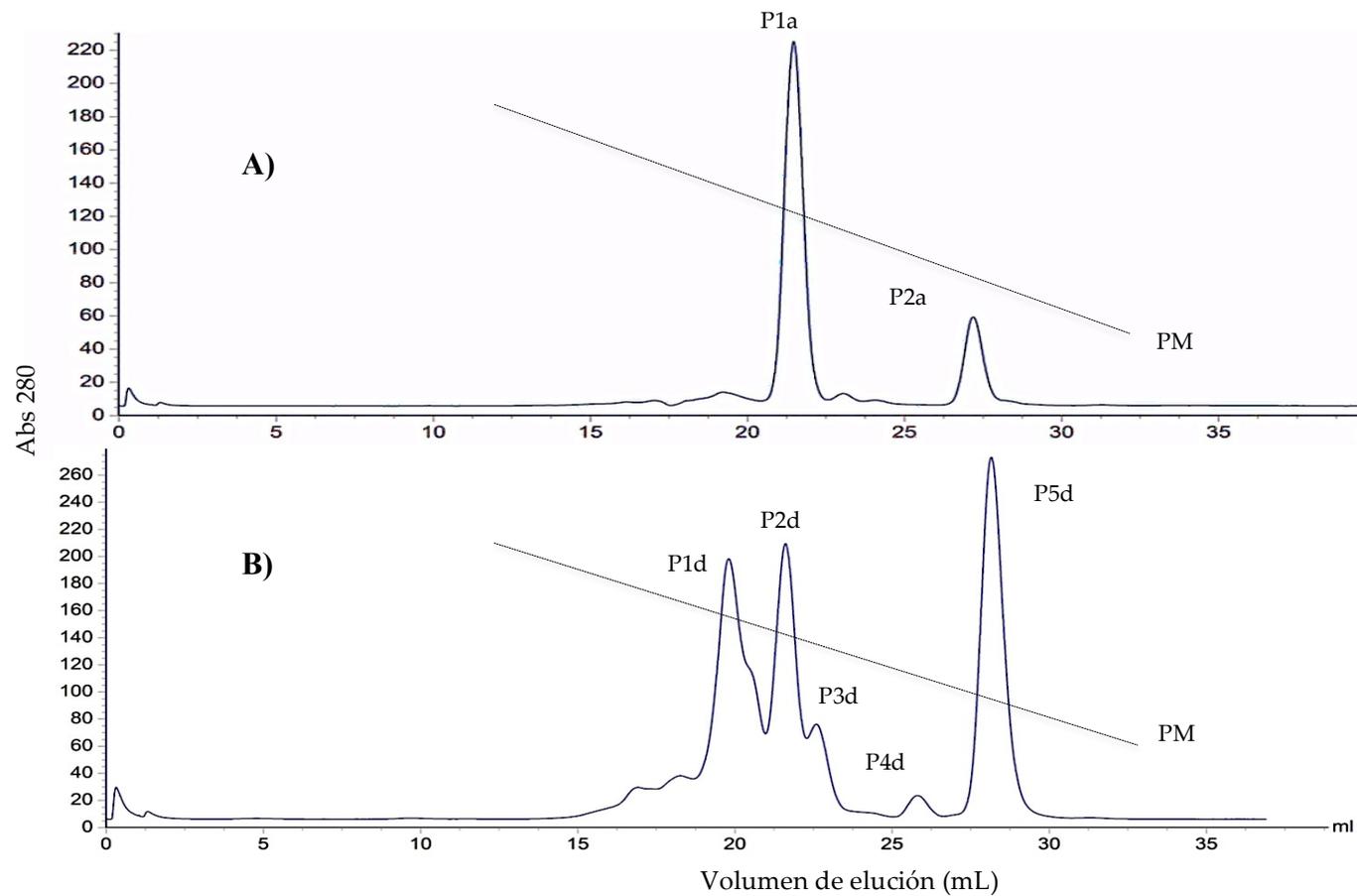


Figura 8. Perfiles peptídicos mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando una columna de filtración en gel, de las fracciones peptídicas < 3 kDa (FSA) obtenidas de leches fermentada (L-571, 24 h), antes (a) y después (b) de su exposición a condiciones gastrointestinales. PM, Peso molecular. P1a y P2, picos obtenidos antes y P1d-P5d después de la simulación gastrointestinal.

Por todo lo anterior, es importante los estudios *in vitro* donde se evalúan la bioactividad una vez que la matriz alimentaria o los péptidos hayan sido expuestos a condiciones gastrointestinales, con la finalidad de conocer la estabilidad, aumento o disminución del efecto biológico.

6.4. Evaluación de la Actividad Hipocolesterolémica

6.4.1. Inhibición Micelar del Colesterol

Los lípidos que son ingeridos en la dieta tales como los triglicéridos, colesterol, ácidos grasos y otros lípidos, son insolubles en agua. Debido a esta propiedad, para su absorción en el intestino requieren ser emulsificados en agregados micelares con ácidos biliares y fosfolípidos (Morgan et al., 2016). Una de las estrategias que se han investigado para reducir los niveles elevados de colesterol sérico ha sido mediante la inhibición de la formación de estas micelas de colesterol, evitando por lo tanto su absorción en el intestino. La preparación de micelas artificiales de colesterol se ha utilizado como modelo para estudiar la capacidad de los compuestos bioactivos con potencial efecto hipocolesterolémico (Kirana et al., 2008).

En el presente estudio se evaluaron las fracciones con peso molecular de < 3 kDa derivadas de leches fermentadas, con la finalidad de conocer si los péptidos derivados de la fermentación láctica presentaban capacidad para inhibir la formación de micelas de colesterol. Así también, con el objetivo de observar el posible cambio de la bioactividad por el efecto proteolítico de las BAL estudiadas, se emplearon dos tiempos de fermentación (24 y 48 h). Las micelas fueron preparadas mediante una mezcla de colesterol, fosfatidilcolina, ácidos grasos y sales biliares simulado las micelas mixtas fisiológicas (Kirana et al., 2008).

En la Figura 9 se presentan los porcentajes de inhibición de la formación de las micelas de colesterol por parte de estas fracciones. Se utilizó un testigo positivo, la colestiramina (un agente secuestrante de sales biliares), la cual forma complejos iónicos no absorbibles de las sales y que afectan también a la formación de micelas. Los resultados mostraron que el fármaco (colestiramina) tuvo una alta capacidad de inhibición al exhibir un porcentaje de 78% de inhibición en la formación de las micelas de colesterol, comparado con las fracciones peptídicas. Dicha inhibición evidencia la potencia para reducir los niveles de colesterol en sujetos con hipercolesterolemia. Sin embargo, a pesar de su alta capacidad, su ingesta ha conllevado a otros riesgos tales como la inhibición de la absorción de vitaminas liposolubles y el daño hepático (Hadrich et al., 2015).

Por otro lado, todas las fracciones derivadas de las leches fermentadas exhibieron un cierto grado de inhibición. Para el caso de las fracciones obtenidas de leche fermentada por 24 h (Figura 9a), los porcentajes de inhibición se encontraron dentro de un rango de 27 a 44 %; Del cual, el porcentaje de inhibición más alto fue aportado por la cepa L-571, mientras que en menor medida la cepa L-600. Con respecto a las fracciones derivadas de las leches con un tiempo de fermentación de 48 h (Figura 9 b), los valores se encontraron entre 15 a 37 % de inhibición, de igual manera la cepa L-571 aportó la mayor capacidad de inhibición. Así también, comparando los porcentajes de inhibición entre las 24 y 48 h de fermentación, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para la mayoría de las cepas, a excepción de la fracción aportada por la cepa L-598, la cual mostró un decremento de su capacidad de 35.97 a 15.38 %. Aunque, si bien los valores obtenidos no son comparables con la colestiramina, los resultados indican que las cepas podrían liberar péptidos hipocolesterolémicos capaces de inhibir la formación de las micelas de colesterol, siendo más notable con la cepa L-571.

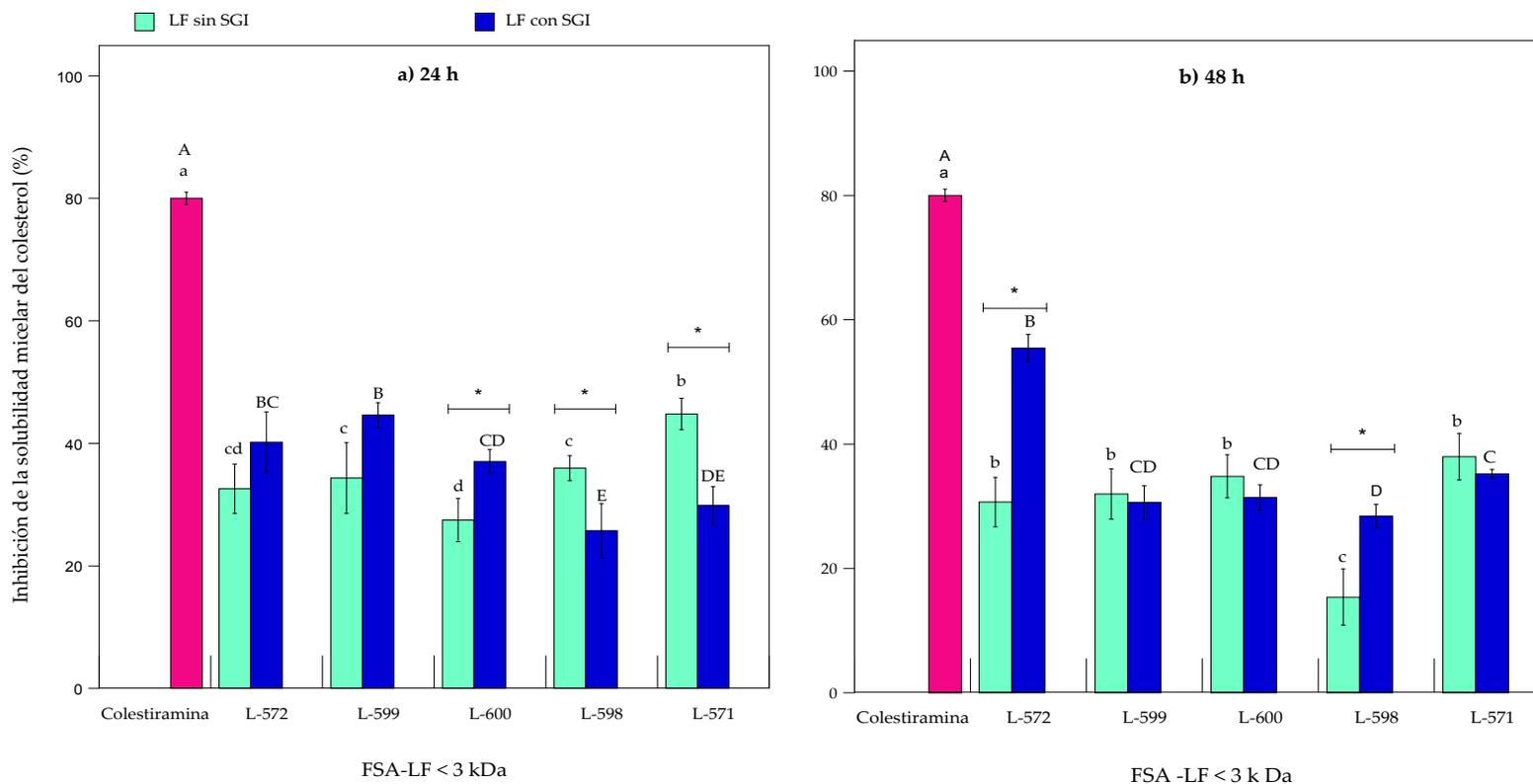


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol (%) por fracciones peptídicas solubles en agua (FSA) < 3 kDa con 24 h (a) y 48 h (b) de fermentación, antes () y después () de ser sometidas a una simulación gastrointestinal (SGI). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre leches fermentadas para una misma condición, minúsculas (sin SGI) y mayúsculas (con SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la bioactividad antes y después de su paso por la SGI para una misma leche fermentada.

Para que los péptidos puedan ejercer su actividad biológica, es necesario que mantengan su estructura funcional al pasar por el sistema digestivo. Se ha establecido que los péptidos interactúan al pasar por el sistema gastrointestinal con las enzimas digestivas, además de las condiciones del pH (Pal y Vij, 2018). Por lo anterior, la inhibición micelar del colesterol se evaluó también una vez que las leches fermentadas se sometieron a una digestión gastrointestinal simulada. Para ello, las fracciones < 3 kDa fueron recuperadas y evaluadas. En general, después de estas condiciones, los porcentajes de inhibición aumentaron para las fracciones de la leche fermentada con 24 h (Figura 9a) con L-572, L-599 y L-600, de 32.6 a 40.22, 34.3 a 44.59 y de 27.40 a 37.07 ($p < 0.05$), respectivamente. Por el contrario, el resto de las fracciones (L-598 y L-571) disminuyó la inhibición ($p < 0.05$). Con respecto a las leches con 48 de fermentación (Figura 9b), la capacidad de las fracciones de L-598 y L-572 aumentó después de la simulación gastrointestinal, siendo, esta última la que exhibió el mayor porcentaje de inhibición (55.43 %). Además, esta muestra fue la que presentó mayores valores de inhibición ($p < 0.05$), en comparación con las demás fracciones para ambos tiempos evaluados, indicando que la leche fermentada con L-572 puede aportar péptidos potencialmente hipocolesterolémicos y presentar dicho efecto aún después de digestión gastrointestinal.

El efecto hipocolesterolémico de las leches fermentadas se ha evaluado en varios estudios, sin embargo, varios de estos, señalan que dicho efecto está dado por las bacterias probióticas las cuales tienen efecto *per se* (Marco et al., 2017; Shiby et al., 2013). No obstante, no ha sido explorado si los péptidos derivados de la proteólisis de las BAL en la fermentación láctica presentan actividad hipocolesterolémica. En el presente estudio, la capacidad más alta de inhibición fue de 55.43 % para las fracciones de 48 h leche fermentada con L-572. Aunque, fue estadísticamente menor ($p > 0.05$) que el fármaco, el porcentaje de inhibición es mayor comparado con otros péptidos o hidrolizados que han demostrado tener actividad hipocolesterolémica. En un estudio realizado por Zhong et al. (2006), evaluaron el efecto hipocolesterolémico de hidrolizados de proteína de soya, y dichos hidrolizados presentaron una capacidad de inhibición micelar *in vitro* de alrededor del 50%. En el mismo estudio, el hidrolizado fue administrado en un modelo murino con hipercolesterolemia inducida, y los resultados

mostraron una reducción significativa de los niveles séricos de colesterol y de lipoproteínas (LDL) con respecto al testigo negativo (administrado con dieta hipercalórica).

Por otro lado, Nagaoka et al. (2001) evaluaron hidrolizados trópticos de caseína y β -LG, obteniendo una reducción del 20 % y 38 % de la formación de las micelas, respectivamente. El efecto hipocolesterolémico de dichos hidrolizados también fue evaluado *in vivo*, en la cual reportaron mayor efecto con hidrolizados derivados de β -LG, comparados con los derivados de caseína y soya. Dado estas evidencias, los resultados obtenidos en nuestro estudio, sugieren que la leche con 48 h de fermentación con la cepa L-572 podrían liberar péptidos hipocolesterolémicos con capacidad de inhibir la solubilidad del colesterol en las micelas con posible efecto *in vivo*. Así también, Nagaoka et al. (2001) observó que los hidrolizados trópticos de β -lactoglobulina presentaban capacidad de unión a las sales biliares (taurocolato de sodio), lo cual conllevaba a un efecto mucho mayor en un modelo *in vivo*. Por lo anterior, en el presente estudio también se evaluó la capacidad de unión a taurocolato de sodio y a ácido cólico de las fracciones < 3 kDa.

6.4.2. Capacidad de Unión a Taurocolato de Sodio

Otro de los mecanismos que se ha descrito, asociado al efecto hipocolesterolémico de los péptidos bioactivos, es la capacidad que tienen para unirse a las sales biliares. Dicha capacidad se ve reflejado a nivel intestinal, en la cual los péptidos inhiben la reabsorción de las sales biliares. Lo anterior da como resultado la reducción del colesterol plasmático mediante un mecanismo de compensación de la pérdida de sales biliares y su síntesis *de novo* a partir del colesterol como precursor. Con la finalidad de conocer si los péptidos derivados de la leche fermentada con 24 o 48 h presentan esta capacidad, se evaluó la capacidad de las fracciones < 3 kDa de unirse a sales biliares mediante el uso de la sal biliar taurocolato de sodio. De igual forma, la colestiramina se utilizó como testigo

positivo. En la Figura 10, se presentan los resultados expresados como porcentaje de unión relativo a colestiramina. Para ello, los porcentajes se ajustaron, estableciendo a la colestiramina con capacidad de 100% de unión, tal como se han descrito en varios estudios (Kahlon y Woodruff et al., 2002; Kashima et al., 2014 y Yu-Shin et al., 2017).

En el presente estudio, las leches fermentadas por 24 h, presentaron porcentajes de unión a taurocolato (Figura 10) en un rango de 12 a 21 %. Los porcentajes más altos ($p < 0.05$) fueron exhibidos por las fracciones derivadas con las cepas L-572, L-599, y L-571 ($p < 0.05$) con porcentajes de unión de alrededor del 20 %. Una vez que trascurrió el tiempo de fermentación hasta las 48 h, los porcentajes de unión disminuyeron hasta alrededor del 14 %, en las cuales no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. De igual forma, la bioactividad se evaluó una vez que las leches fueron sometidas a una simulación gastrointestinal. En estas condiciones, solo se observó un aumento significativo para la fracción derivada de L-600 que incrementó de 14.00 al 23.85 %; mientras que para las fracciones restantes, no se observaron diferencias significativas antes y después de la simulación. Con respecto a las leches fermentadas por 48 h, la capacidad de unión aumentó significativamente ($p < 0.05$) para todas las leches una vez que fueron sometidas a condiciones gastrointestinales.

El aumento significativo (< 0.05) en la capacidad de unión a sales biliares, podría deberse al posible aumento de péptidos hidrofóbicos liberados después de la simulación gastrointestinal. Ha sido reportado, que esta característica hidrofóbica es importante para que los péptidos ejerzan su acción hipocolesterolémica, ya que esto permite unirse a las sales biliares (Kimikazu et al., 2017). Esto coincide con el análisis de RP-HPLC (Figura 7), en el cual se observó la presencia de un mayor número de tiempos de elución en un gradiente menos polar, lo cual indica la presencia de péptidos con propiedades hidrofóbicas. Por otro lado, comparando los porcentajes de unión de las diferentes cepas, la fracción de leche fermentada con la cepa L-600 aportó una mayor capacidad de unión con 70.12 %, la cual aumentó ($p < 0.05$) 5 veces más una vez que se sometió a condiciones

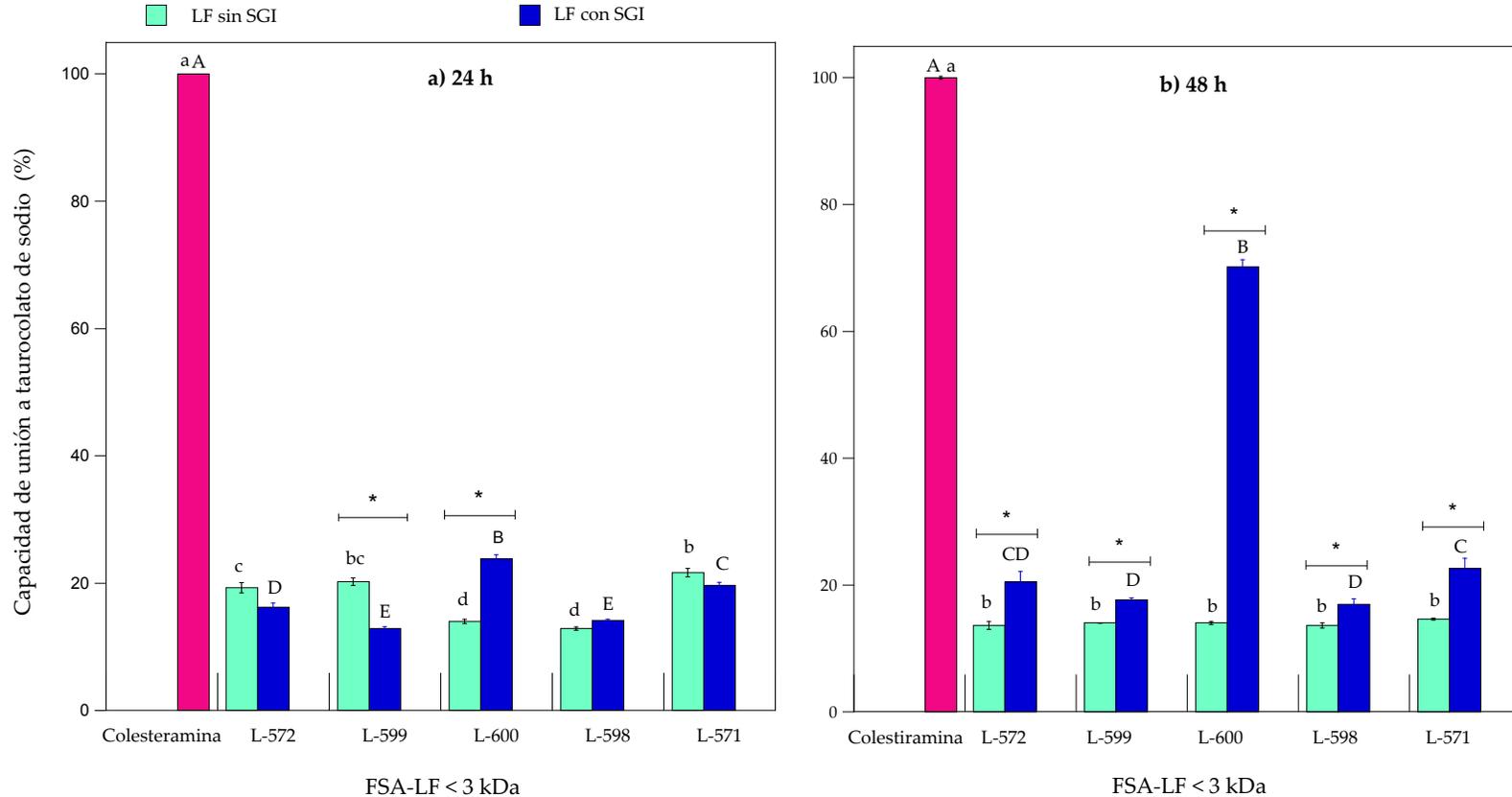


Figura 10. Porcentaje de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol (%) por fracciones pépticas solubles en agua (FSA) < 3 kDa con 24 h (a) y 48 h (b) de fermentación, antes (█) y después (█) de ser sometidas a una simulación gastrointestinal (SGI). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición, minúsculas (sin SGI) y mayúsculas (con SGI).y para un mismo tiempo de fermentación. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la bioactividad antes y después de su paso por la SGI para una misma leche fermentada.

gastrointestinales. Además dicha fracción exhibió la mayor ($p < 0.05$) capacidad de unión a sales biliares en todas las condiciones estudiadas.

Ha sido reportado en otros estudios, que hidrolizados de caseína con papaína obtuvieron un porcentaje de unión de 15 %; sin embargo, los hidrolizados no fueron administrados en un modelo *in vivo* para comprobar su efecto (Mohan y Udenigwe, 2015). Además, en otros hidrolizados como los provenientes de la proteína principal de la jalea real, denominada como MRJP, se observaron valores de 49.1 % de unión a taurocolato de sodio, así también en un modelo *in vivo* mostró la reducción de colesterol y de lipoproteínas LDL-VLDL. Por el contrario, otros estudios con otros hidrolizados (Yushin et al., 2010, Kahlon y Woodruff, 2002) mostraron porcentajes de unión menores en comparación con las fracciones obtenidas en el presente estudio. Por todo lo anterior, los resultados sugieren que la cepa L-600 podría liberar péptidos capaces de unirse a las sales biliares, principalmente con taurocolato de sodio y por lo tanto ejercer un efecto potencialmente hipocolesterolémico *in vivo*.

6.4.3. Capacidad de Unión a Ácido Cólico

Las fracciones <3 kDa de leches fermentadas por 24 o 48 h, antes y después de la simulación gastrointestinal, fueron evaluadas con la finalidad de conocer si los péptidos presentaban capacidad de unión a los ácidos biliares primarios, como es el caso del ácido cólico (Figura 11). Los resultados mostraron que para el caso de las leches con 24 h de fermentación, la capacidad de unión más alta ($p < 0.05$) fue dada por la fracción derivada de la cepa L-598, la cual presentó un porcentaje de unión de 57 %. Para el resto de las fracciones en este mismo tiempo la capacidad se encontró dentro de un rango de 15 a 22 %, siendo la fracción derivada de la cepa L-600 la que exhibió menor capacidad ($p < 0.05$). Una vez transcurrido el tiempo de fermentación hasta las 48 h, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las 24 y 48 h de fermentación,

para la mayoría de los casos; a excepción de la fracción aportada por la cepa L-598, en la cual, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de 57% a 16 % de unión.

Una vez que las leches fermentadas se sometieron a condiciones gastrointestinales, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la capacidad de unión al ácido cólico. En la leche fermentada por 24 h con L-600 (Figura 11a), se observó un aumento ($p < 0.05$) de 15 a 25 %. Por el contrario, la leche fermentada con L-598, la capacidad disminuyó de 57 a 25 %. Con respecto a la leche con 48 h de fermentación con L-598 (Figura 11b), se observó una disminución ($p < 0.05$) de 20 a 12 %. No obstante, para la leche fermentada con L-600, mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) de 19.5 a 36.5 %, y fue estadísticamente más alto ($p < 0.05$), con respecto a el resto de las leches fermentadas con las mismas condiciones. Puede notarse claramente que la cepa L-598 exhibió capacidad para liberar péptidos que puedan unirse a las sales biliares. Sin embargo, una vez que pasó por el sistema gastrointestinal se observó un decremento de la bioactividad. Como se ha descrito anteriormente, es deseable que la bioactividad se mantenga o incremente después de su paso el sistema gastrointestinal, no obstante es importante realizar estudios en modelos *in vivo* para evaluar el efecto.

Por otro lado, la fracción derivada de leche fermentada con cepa L-600 presentó capacidad para unirse a ácido cólico a las 48 h de fermentación después de la simulación. Incluso, la misma fracción presentó alta capacidad para unirse a taurocolato de sodio (Figura 10b). Además debe notarse que, aunque la fracción derivada de leche fermentada con L-600 presentó capacidad para unirse a ambas sales biliares, no se observó el mismo comportamiento para la mayoría de las fracciones. Se ha señalado que la actividad de unión de los hidrolizados proteicos depende del tipo de ácidos o sales biliares, estos al mostrar ciertas diferencias en sus estructuras tal como el número variable de grupos hidroxilo (OH) pueden influir en la asociación de péptido-sal biliar (Howart et al., 2013). Lo anterior se ha comprobado en estudios donde se utilizaron hidrolizados enzimáticos las cuales presentaron diferentes porcentajes de unión a diferentes sales biliares (Barbana et al., 2011; Yoshie-Starck et al., 2003), sin embargo, las interacciones moleculares aún no se han elucidado.

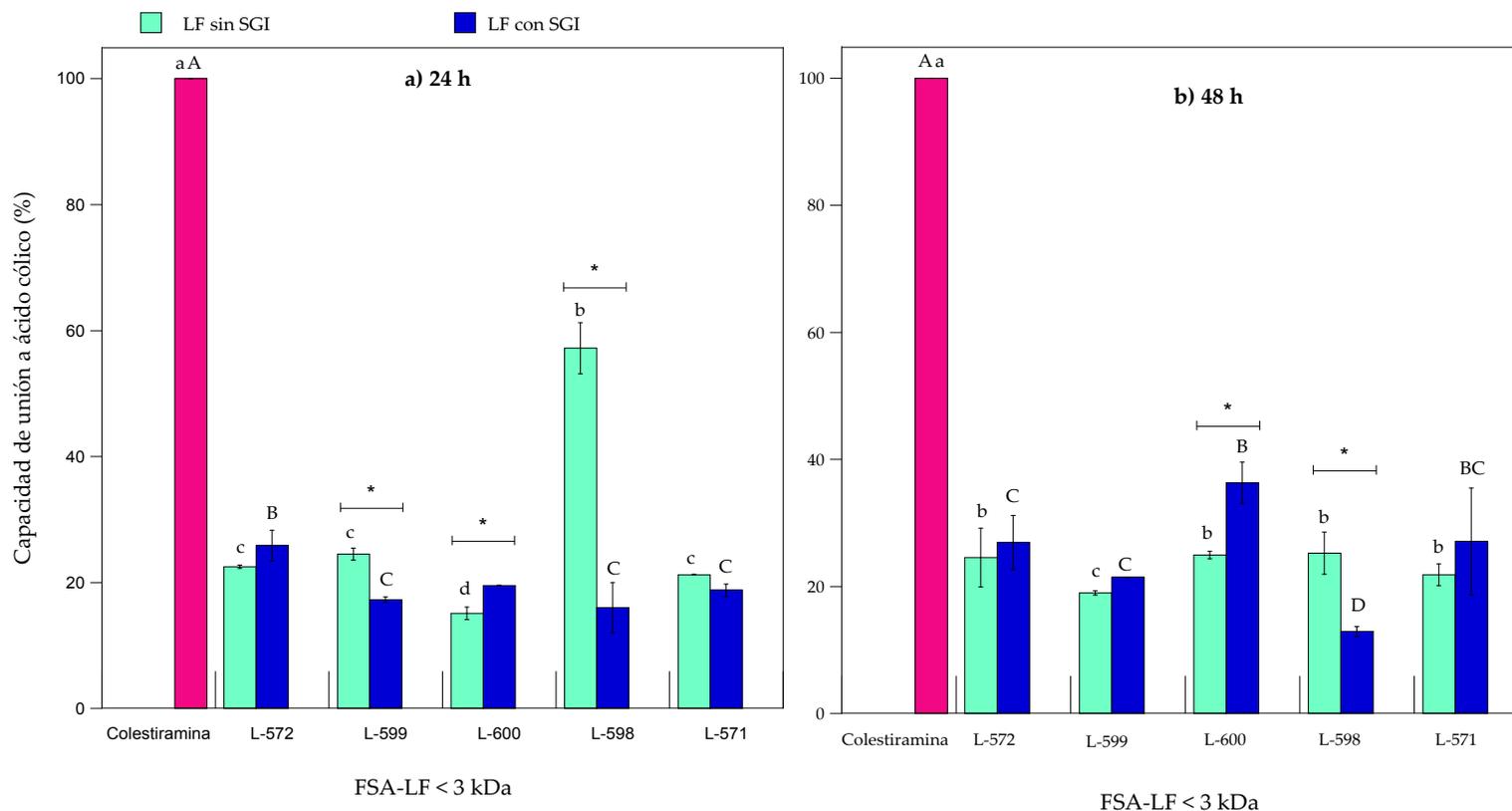


Figura 11 Porcentaje de unión al ácido cólico relativo a colestiramina (%) por fracciones peptídicas solubles en agua (FSA) < 3 kDa con 24 h (a) y 48 h (b) de fermentación, antes (■) y después (■) de ser sometidas a una simulación gastrointestinal (SGI). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición, minúsculas (sin SGI) y mayúsculas (con SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la bioactividad antes y después de su paso por la SGI para una misma leche fermentada.

Finalmente, debido a la ventaja que presenta las fracciones derivadas de L-600, dicha cepa podría utilizarse para la producción de leches fermentadas con efecto hipocolesterolémico la cual mediante su unión a las sales biliares podría disminuir los niveles plasmáticos de colesterol al sintetizar de nuevo las sales biliares a partir del colesterol (Howard y Udenigwe, 2013).

6.4.4. Correlación Entre Inhibición Micelar del Colesterol y Capacidad de Unión a Sales Biliares

Algunos estudios han demostrado que los péptidos con actividad hipocolesterolémica, que tienen actividad en la supresión de la formación de las micelas de colesterol y que presentan capacidad de unión a las sales biliares, conllevan a un mayor efecto hipocolesterolémico. En un estudio con hidrolizados trépticos de β -LG (Nagaoka et al., 2001) y de proteína de soya (Nagaoka et al., 2010), se encontró una asociación positiva entre ambos mecanismos. Otros hidrolizados que han demostrado lo anterior han sido los hidrolizados de la proteína principal de jalea real. De hecho, algunas evidencias han señalado que la inhibición de la solubilidad del colesterol en las micelas, está dado a la capacidad de los péptidos para unirse a ciertas sales biliares (Yao et al., 2018). Por lo anterior, con la finalidad de observar la asociación directa entre ambos mecanismos, se correlacionó la capacidad de inhibición micelar del colesterol y la capacidad de unión a taurocolato de sodio y ácido cólico.

El análisis de correlación (Figura 12a,b) no mostró una asociación significativa ($p > 0.05$) para taurocolato de sodio y para ácido cólico. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la inhibición micelar del colesterol esté influenciado por los péptidos que presenten capacidad de unión a sales biliares. En el presente estudio, aquellos que exhibieron más capacidad de unión con las respectivas sales biliares, no se relacionaron con aquellos que presentaron efecto sobre las micelas de colesterol. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las propiedades de los péptidos hipocolesterolémicos para cada

mecanismo en particular. Se ha señalado que los péptidos que presentan un alto índice de hidrofobicidad, con residuos tales como valina, alanina, prolina, glicina y fenilalanina (Kongo-Dia et al., 2011), se pueden unir fuertemente a las sales biliares mediante una interacción en su anillo tetracíclico (Uniwigde et al., 2015). También se ha evidenciado que aquellos péptidos que en su estructura contengan residuos de aminoácidos con fuertes propiedades catiónicas como la lisina y arginina, pueden también interactuar con el grupo carboxílico de las sales biliares, formando un complejo péptido-sal biliar no absorbible en el intestino (Howard y Udenigwe, 2012).

Así mismo, se ha documentado que péptidos con propiedades anfipáticas, es decir, aquellas moléculas que en un extremo es de carácter hidrofóbica y en el otro es hidrofílica, tienen gran influencia sobre la inhibición micelar del colesterol (Boachie et al., 2018). Dichos péptidos actúan mediante una inhibición competitiva con el colesterol, cuando se incorpora para la formación de micelas mixtas, provocando el desplazamiento del colesterol de los fosfolípidos o sales biliares. En este sentido, el péptido IIAEK derivado de β -LG, inhibe eficazmente la absorción del colesterol. Dicho péptido presenta en la parte N-terminal características hidrofóbicas (residuos IIA) y en la parte C-terminal características hidrofílicas (residuos EK); lo cual favorece la interacción con los fosfolípidos y sales biliares, conllevando a una desintegración de las micelas de colesterol (Nagaoka et al., 2001; Howard y Udenigwe, 2012).

Por lo anterior, se sugiere que las leches fermentadas con las cepas estudiadas podrían estar liberando péptidos con diferentes propiedades, los cuales presentaron acción hipocolesterolemia *in vitro*. Principalmente con las cepas L-600 y L-572, los cuales exhibieron los valores más altos de inhibición micelar del colesterol y capacidad de unión a sales biliares, respectivamente. De acuerdo a otros estudios, las leches elaboradas empleando dichas cepas podrían ejercer un efecto fisiológico en la reducción del colesterol en un modelo *in vivo*.

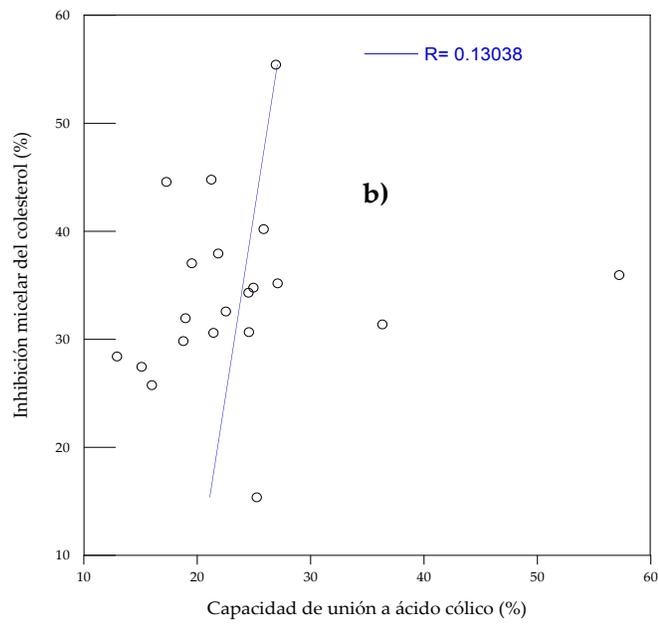
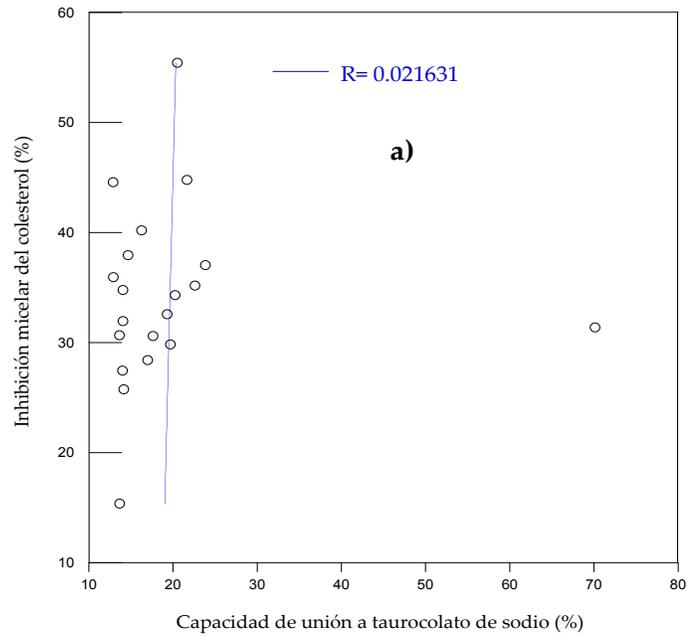


Figura 12. Análisis de correlación entre la inhibición micelar del colesterol y capacidad de unión a taurocolato de sodio (a); y capacidad de unión a ácido cólico (b), los valores de (r) no fueron significativos ($p > 0.05$) en un análisis de correlación de Pearson.

6.5. Determinación de la Actividad Antitrombótica

6.5.1. Actividad Inhibidora de Trombina

Se estudió la actividad antitrombótica de las leches fermentadas por *L. lactis* mediante la inhibición de la formación del coágulo de fibrina utilizando trombina como inductor de la coagulación. Este ensayo simula la última etapa de la coagulación, en la cual la enzima trombina libera monómeros de fibrina a partir de su sustrato, el fibrinógeno, que posteriormente polimerizan formando una red tridimensional (coágulo de fibrina). La capacidad de los péptidos para inhibir dicha reacción está asociada a su capacidad para inhibir la enzima trombina (Sabbionne et al., 2015). Por lo anterior, con la finalidad de conocer si durante el proceso fermentativo se liberan péptidos inhibidores de trombina, se estudiaron las fracciones peptídicas < 3 kDa obtenidos por las diferentes leches fermentadas con *L. lactis*, así como estudiar su estabilidad a condiciones gastrointestinales. En la Figura 9, se muestran los porcentajes de inhibición de trombina de las fracciones < 3 kDa bajo una concentración de proteína peptídica de 1 mg/mL, en dos tiempos de fermentación de la leche (24 o 48 h), antes y después de la simulación gastrointestinal. Dichos valores fueron comparados con la heparina (testigo positivo), un anticoagulante ampliamente usado para las complicaciones trombóticas.

Primeramente, se observó que la proteólisis bacteriana liberó péptidos capaces de inhibir parcial o totalmente a la enzima trombina. Para el caso de las leches que fueron fermentadas por 24 h, los porcentajes de inhibición se encontraron dentro de un rango de 20 a 94.5 %. Los valores más altos ($p < 0.05$) de inhibición fueron por las fracciones derivadas por las leches fermentadas con L-572 y L-571, 92 % y 94.57 %, respectivamente; y fueron estadísticamente igual ($p > 0.05$) con respecto a la heparina (98 %). La leche fermentada con L-599 presentó un porcentaje de inhibición de trombina de 52.5 %; y finalmente la leche fermentada con L-598, presentó la capacidad más baja ($p < 0.05$) con un porcentaje de 20 %.

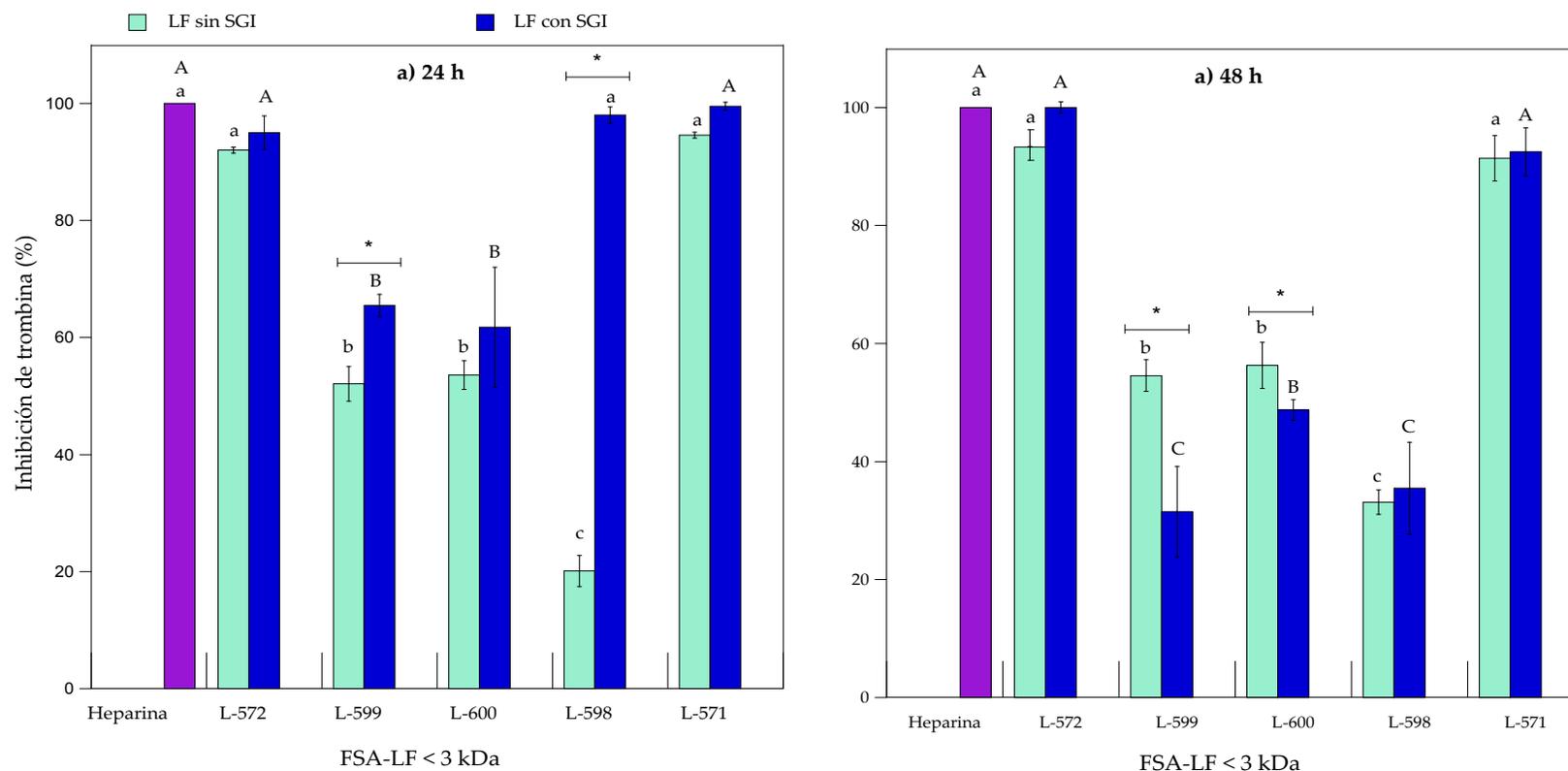


Figura 13. Porcentaje de inhibición de trombina (%) por fracciones péptidicas solubles en agua (FSA) < 3 kDa (1 mg/mL proteína) con 24 h (a) y 48 h (b) de fermentación, antes () y después () de ser sometidas a una simulación gastrointestinal (SGI). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición, minúsculas (sin SGI) y mayúsculas (con SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la bioactividad antes y después de su paso por la SGI para una misma leche fermentada.

Una vez que transcurrió el tiempo de fermentación hasta las 48 h, las fracciones derivadas de leche fermentada con L-572 y L-571, mantuvieron los altos porcentajes de inhibición (92 %), no habiendo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambas cepas y en los dos tiempos de fermentación. Para el caso de las leches fermentadas con L-600 y L-599, la proteólisis no afectó su capacidad, manteniendo su porcentaje inhibición de trombina de 55 %. Por el contrario, la fracción de la leche fermentada con L-598, su capacidad aumentó ligeramente de 20 a 33 %. Por lo anterior, las cepas L-571 y L-572 resultan prometedoras para la producción de péptidos antitrombóticos durante la fermentación de la leche, además dichos valores fueron equiparables con otros estudios. Rojas-Ronquillo et al. (2012) fermentaron leche con *Lactobacillus casei* por 27 h, y los resultados mostraron la liberación de péptidos (extracto crudo) con una capacidad de inhibición de 80 %. Otro estudio con leches fermentadas con otras BAL específicas, mostraron inhibición hasta el 60 % (Rendón, 2016).

Así también, las leches fermentadas fueron sometidas a una simulación gastrointestinal (Figura 13a). En el caso de las leches con 24 h de fermentación con las cepas L-572 y L-571, las condiciones gastrointestinales no afectaron ($p > 0.05$) la alta capacidad de inhibición de trombina (96 %), las cuales siguieron siendo comparables ($p > 0.05$) con la heparina. Por otro lado, la fracción de leche fermentada con L-598, aumentó cuatro veces (de 20 a 98 %). Por su parte la fracción derivada de leche fermentada con L-599, aumentó ligeramente su actividad de 52 a 65 %; mientras que para la leche fermentada con L-600 su actividad no se vio afectada. Con respecto a las leches con 48 h de fermentación (Figura 13b), de igual forma las fracciones de leche fermentada liberadas por las cepas L-572 y L-571, mantuvieron alto porcentaje de inhibición (media, 96 %), no encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellas y con respecto a la heparina. Para las fracciones de leche fermentada con L-599 o L-600, los porcentajes de inhibición disminuyeron; mientras que la capacidad de la fracción de leche fermentada con L-598 se mantuvo. Por lo anterior, los resultados sugieren que las cepas L-571 y L-572 pueden liberar péptidos inhibidores de la enzima trombina, con posible efecto antitrombótico ya que la bioactividad no se vio afectada.

6.5.2. Determinación de la Concentración Máxima de Inhibición Media de Trombina

Con la finalidad de conocer la efectividad de las fracciones para inhibir a la enzima trombina, se determinó el IC_{50} ; cuyo valor se asocia directamente a la potencia del compuesto bioactivo para inhibir una reacción en específico. Para ello se realizaron curvas de tipo dosis-respuesta utilizando tres concentraciones de fracción peptídica < 3 kDa (0.4, 0.6 y 1 mg/mL de proteína), donde a partir de la pendiente linearizada se obtuvo el IC_{50} (Tabla 4). Las fracciones de las leches fermentadas con 24 h presentaron valores de 0.19 a 2.65 mg/mL, en el cual, el valor más bajo ($p < 0.05$) fue exhibida por L-572 (0.19 mg/mL), seguido de L-600 (0.52 mg/mL) y L-571 (0.56 mg/mL), no habiendo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellas. Finalmente, las fracciones de leche fermentada con L-598 y L-599 mostraron los valores más altos ($p < 0.05$) de IC_{50} (2.65 mg/mL y 1.29 mg/mL, respectivamente). Cuando transcurrió el tiempo de fermentación a 48 h, se observaron aumentos significativos ($p < 0.05$) para L-572 y L-571, lo cual indica una disminución de su potencia. A pesar de este cambio, no se observaron cambios significativos ($p > 0.05$) con respecto al porcentaje inhibición como se mostró anteriormente (Figura 13), indicando la eficacia en estas concentraciones. Así mismo, también se observó una disminución de IC_{50} , en las fracciones de leche fermentada con L-599 y L-600. Aunque la disminución fue significativa, no se observó cambio significativo del porcentaje de inhibición una vez que transcurrió el tiempo de fermentación.

Por otro lado, cuando las leches de 24 h de fermentación se sometieron a condiciones gastrointestinales simuladas se observaron cambios importantes; principalmente con la fracción de leche fermentada con L-571, la cual disminuyó significativamente ($p < 0.05$) de 0.56 a 0.045 mg/mL. Además, para L-599 disminuyó siete veces, no obstante, su capacidad de inhibición solo se observó un aumento ligero. Así también se observó una disminución del IC_{50} para L-598, lo cual se vio reflejado en el aumento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de inhibición.

Tabla 4. Valores de IC₅₀ (mg/mL) de inhibición de trombina de fracciones peptídicas < 3 kDa (FSA) obtenidas a partir de las leches con 24 y 48 h de fermentación, antes (A) y después (D) de ser expuestas a condiciones gastrointestinales (SGI).

FSA-LF	24 h de fermentación		48 h de fermentación	
	A	D	A	D
L-572	0.19 ± 0.02 ^d	0.17 ± 0.07 ^d	0.71 ± 0.03 ^b	0.049±0.00 ^{*c}
L-599	1.29 ± 0.15 ^a	0.38 ± 0.01 ^{*c}	0.91 ± 0.00 ^{*b}	ND
L-600	0.52 ± 0.02 ^c	0.85 ± 0.01 ^{*b}	0.44 ± 0.032 ^{*c}	0.98 ± 0.0 ^a
L-598	2.65 ± 0.26 ^b	0.91 ± 0.04 ^{*a}	1.31 ± 0.17 ^{*a}	ND
L-571	0.56 ± 0.00 ^c	0.045 ± 0.02 ^{*e}	0.72 ± 0.05 ^{*b}	0.22±0.00 ^b

Los valores representan la media (n=3) + desviación estandar (DE). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición (con o sin SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. Literales mayúsculas indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la actividad anticoagulante antes (A) y después (D) de la simulación gastrointestinal para una misma leche fermentada . ND. No se detectó inhibición a concentraciones bajas.

De la misma manera, para las leches fermentadas con 48 h, se observaron cambios significativos ($p < 0.05$) para L-571 y L-572 exhibiendo valores de 0.049 ± 0.02 y 0.2 ± 0.00 mg /mL, por lo cual se puede explicar la alta capacidad de inhibición después de las condiciones gastrointestinales.

6.5.3. Actividad Anticoagulante en Plasma: Tiempo de Trombina y Tiempo de Protrombina

Se determinó el efecto de las fracciones peptídicas sobre la modulación de la coagulación de un plasma citratado descalcificado mediante las pruebas globales de hemostasia o coagulación (tiempo de trombina y tiempo de protrombina). Estas pruebas han sido utilizadas ampliamente en la medicina con el objetivo de detectar anomalías en los factores de coagulación, las cuales pueden indicar el riesgo de padecer hemorragias o trombosis. Así también, han sido empleadas para monitorear los tiempos de coagulación cuando se administran anticoagulantes orales. En particular el tiempo de trombina, puede señalar la presencia de inhibidores de la vía común de la coagulación, los cuales pueden tener efecto sobre la inhibición del factor Xa o trombina (Hagavan y Chung-Eun, 2015). El plasma utilizado en este estudio se obtuvo a partir de donantes sanos sin haber ingerido algún medicamento antitrombótico o antiplaquetario. Antes de iniciar las pruebas, el plasma de estudio fue calibrado con respecto a un plasma de referencia comercial, obteniendo los mismos valores de coagulación (23 ± 2 s) ($p > 0.05$). Aunque, los valores obtenidos del tiempo de coagulación para ambos fueron superiores a los informados para un plasma normal de humano, varios estudios han reportado que las diferencias pueden deberse al índice de sensibilidad del protocolo utilizado (reactivos de cada fabricante). Por tal motivo fue importante calibrar el plasma de ensayo y al observar valores de coagulación iguales se procedió a evaluar la actividad anticoagulante de las fracciones peptídicas de las leches fermentadas.

Tabla 5. Efecto de las fracciones peptídicas < 3 kDa (FSA) de leche fermentada sobre la coagulación del plasma (s) mediante el ensayo de tiempo de trombina

FSA-LF	24 h de fermentación		48 h de fermentación	
	A	D	A	D
L-572	36.83 ± 0.17 ^{aA}	41.87 ± 0.26 ^{bB}	29.65 ± 0.54 ^{cA}	41.17 ± 1.23 ^{aB}
L-599	29.50 ± 0.48 ^c	31.50 ± 0.92 ^c	35.85 ± 0.32 ^{bA}	26.00 ± 0.10 ^{cA}
L-600	32.05 ± 0.23 ^{bA}	27.00 ± 0.20 ^{dB}	35.03 ± 1.02 ^{bA}	22.2 ± 0.20 ^{dB}
L-598	26.50 ± 0.23 ^c	27.50 ± 0.23 ^d	25.46 ± 0.43 ^d	26.00 ± 0.76 ^c
L-571	32.14 ± 0.56 ^{bA}	52.07 ± 1.23 ^{aB}	38.27 ± 1.20 ^{aA}	35.27 ± 0.34 ^{bB}
Plasma normal	23 ± 2 ^d			

Los valores representan la media (n=3) + desviación estandar (DE). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición (con o sin SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. Literales mayúsculas indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la actividad anticoagulante antes (A) y después (D) de la simulación gastrointestinal para una misma leche fermentada .

En el presente estudio, los resultados mostraron que las fracciones de leche fermentada presentaron en cierto grado actividad anticoagulante. Para el caso de las leches con tiempo de fermentación de 24 h, los valores del tiempo de coagulación se encontraron dentro de un rango de 25 a 39.5 s, en donde los valores más altos ($p < 0.05$) fueron exhibidos por las fracciones derivadas de L-600, L-572 y L-571, lo cual concuerda con los valores bajos de IC_{50} y alta capacidad de inhibición obtenidas por las mismas cepas.

La actividad anticoagulante de la fracción de leche fermentada con L-572 por 48 h, presentó (36.83 ± 0.17) y fue el más alto ($p < 0.05$); incluso aumentó de 24 a 48 h. De la misma manera, la actividad incrementó en las fracciones de leche fermentada con L-600 y L-571 ($p < 0.05$); por el contrario fracciones de leche fermentada con L-572 disminuyó. Cuando las leches fermentadas por 24 h fueron sometidas a condiciones gastrointestinales el efecto anticoagulante aumentó ($p < 0.05$) para el caso de las cepas L-571 y L-572. Al comparar con los valores de IC_{50} cabe resaltar que ambas fracciones presentaron de igual manera los valores más bajos, indicando por tanto su efectividad como agente anticoagulante. En cuanto a las leches con 48 h de fermentación después de pasar por el sistema gastrointestinal simulado, solo se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) para L-571 exhibiendo un tiempo de coagulación de 41 s.

Con respecto al tiempo de Protrombina mediante los valores de Razón Internacional Normalizada (INR), esta es una de las pruebas de la bioquímica clínica empleadas en el análisis de la coagulación, y quizás de las más importantes. Esta determinación es también denominada tiempo de Quick. Esta técnica a diferencia del tiempo de trombina, incluye la evaluación de otros factores de la coagulación (factores de la vía extrínseca). Es de igual manera empleada para monitorear el plasma cuando se administran anticoagulantes orales (Chao-Hung et al., 2003). En particular el tiempo de protrombina, mide el tiempo requerido para formar el coágulo después de la activación de la coagulación mediante la adición de factor tisular (tromboplastina) a un plasma citratado descalcificado (Levy et al., 2014). Los resultados fueron estandarizados como razón internacional normalizada (INR por sus siglas en inglés), como lo sugiere la OMS y el Comité Internacional de Trombosis y Hemostasia. La finalidad de la conversión es

eliminar el error de sensibilidad del reactivo tromboplastina tisular debido a los diferentes fabricantes.

La mayoría de las fracciones mostraron actividad anticoagulante mediante el tiempo de protrombina (INR), los cuales exhibieron valores dentro de un rango de 1.19 a 2.28 de INR. Éstos fueron estadísticamente diferentes al plasma normal ($p < 0.05$), el cual presentó un valor cercano a 1, así también para la mayoría se encontró dentro de un rango de 1.2-1.7 (Tabla 6).

Se ha informado que el plasma normal sin terapia anticoagulante generalmente presenta un valor de 1, dicho valor concuerda con el obtenido en el presente estudio donde el plasma normal sin la adición de la fracción peptídica presentó un valor de 0.98. Por otro lado, cuando en el plasma contiene anticoagulante exhiben valores de 2.0 a 3.0. Comparando estos valores de referencia con los obtenidos en el presente estudio, se puede observar que solo dos fracciones mostraron valores de actividad anticoagulante en ese rango. Dichas fracciones fueron liberados por la cepa L-571 obteniendo el valor más alto ($p < 0.05$) en la leche fermentada por 48 h y después de la simulación gastrointestinal. Así también, se pueden notar que las fracciones que exhibieron los valores más altos ($p < 0.05$) de INR, presentaron el IC_{50} más bajo, aún después de la simulación gastrointestinal; como es el caso de las fracciones derivadas de L-571 y L-572. Esto sugiere el potencial de estas bacterias para la liberación de péptidos antitrombóticos.

Adicionalmente, se observó cierta relación entre los valores de los tiempos de coagulación TT (Figura 10a) y los valores de IC_{50} de inhibición de trombina TP/INR (Figura 10b), se realizó un análisis de correlación entre ambas variables (Figura 10). El análisis de correlación mostró una asociación directa lineal significativa ($p < 0.05$) para el caso del tiempo de trombina. Esto indicó que a un aumento de tiempo de formación del coágulo, a medida que el IC_{50} de las fracciones peptídicas disminuye.

Tabla 6. Valores normalizados (INR) de la actividad anticoagulante mediante el tiempo de protrombina por las fracciones peptídicas <3 kDa (FSA) derivadas de las leches con 24 o 48 h de fermentación, antes (A) y después (D) de la simulación gastrointestinal.

FSA-LF	24 h de fermentación		48 h de fermentación	
	A	D	A	D
L-572	1.88 ± 0.05 ^b	1.84 ± 0.12 ^a	1.99 ± 0.16 ^a	1.90 ± 0.15 ^a
L-599	1.47 ± 0.02 ^{cA}	1.22 ± 0.05 ^{dB}	1.19 ± 0.09 ^{eA}	1.39 ± 0.10 ^{cB}
L-600	1.49 ± 0.00 ^c	1.56 ± 0.49 ^b	1.49 ± 0.15 ^{dA}	1.20 ± 0.18 ^{dB}
L-598	1.33 ± 0.04 ^d	1.36 ± 0.01 ^c	1.72 ± 0.04 ^{bA}	1.36 ± 0.07 ^{cB}
L-571	2.06 ± 0.08 ^{aA}	1.50 ± 0.20 ^{bB}	1.62 ± 0.09 ^{bA}	2.28 ± 0.23 ^{bB}
Plasma normal	0.98 ± 0.02 ^e			

Los valores representan la media (n=3) + desviación estandar (DE). Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas para una misma condición (con o sin SGI), y para un mismo tiempo de fermentación. Literales mayúsculas indica diferencias significativas ($p < 0.05$) de la actividad anticoagulante antes (A) y después (D) de la simulación gastrointestinal para una misma leche fermentada.

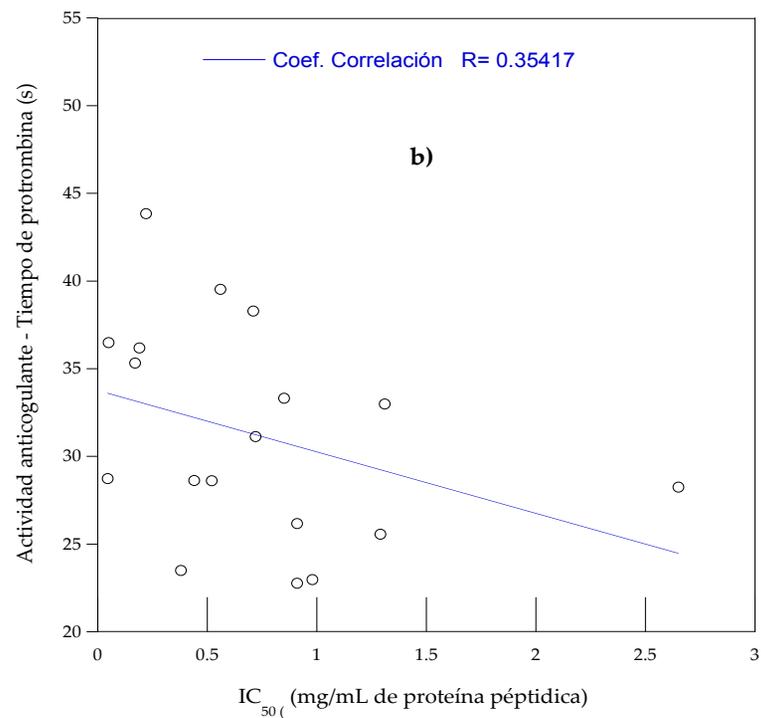
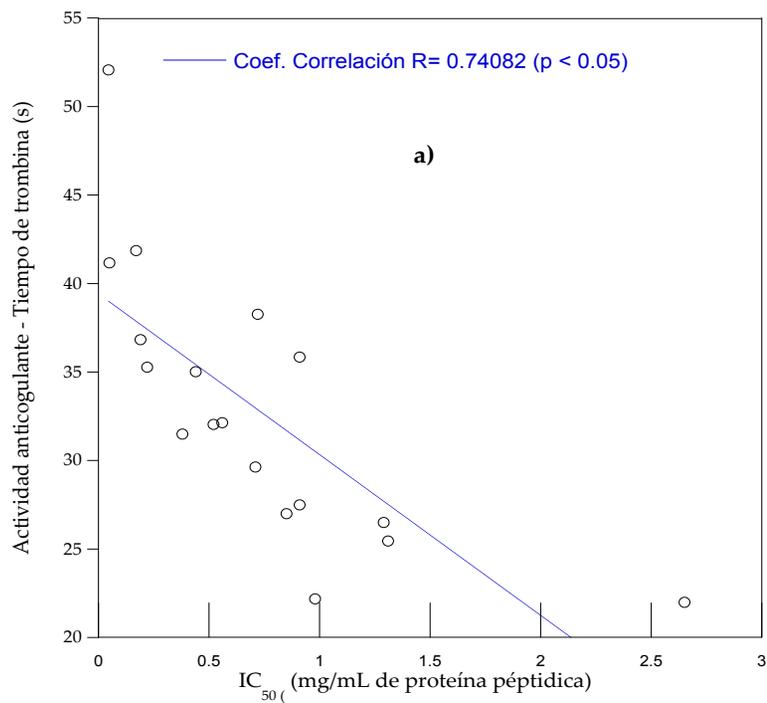


Figura 14. Asociación entre IC_{50} (mg/mL proteína) de inhibición de trombina y actividad anticoagulante en plasma mediante el tiempo de trombina (a) y tiempo de protrombina (b) por las fracciones peptídicas < 3 kDa (FSA). El coeficiente R (-0.74082) fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) mediante un análisis de correlación de Pearson.

Para el caso del tiempo de protrombina se observa un comportamiento similar, sin embargo la asociación no fue significativa ($p > 0.05$). Lo anterior podría deberse a la presencia de péptidos inhibidores de trombina debido a que las fracciones presentaron mejor efecto en la prueba de TT, el cual evalúa la vía común en comparación con el tiempo de TP, y mide otros factores de coagulación. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los péptidos contenidos en las fracciones pudieran interactuar con otros factores de la coagulación. El mismo comportamiento fue observado en el estudio de Sabbione et al. (2015) usando hidrolizados de proteína de amaranto, donde se evaluaron los tiempos de trombina y protrombina. Los autores reportaron que no encontraron una asociación directa entre ambas pruebas de coagulación, concluyendo por tanto que los péptidos evaluados son inhibidores de trombina.

Los estudios realizados hasta el momento sobre péptidos antitrombóticos muestran que estos péptidos son generalmente de tamaños menores a 20 residuos de aminoácidos (<3kDa) (Qian et al., 1995). Anteriormente, se reportaron los péptidos con secuencias FQSEEQQTDELQDK, DIGSESTEDQAMEDIK y HQGLPQEVLENLLR provenientes de la β -caseína (CN) bovina (Tu et al., 2017), los cuales presentaron alta capacidad para inhibir a la trombina. Péptidos con dicha actividad ha sido también reportada en fracciones de 0.7 kDa, provenientes de la fermentación láctea (Rojas-Ronquillo et al., 2012). Además, es importante mencionar que, se investigó la capacidad de L-571 para la liberación de péptidos inhibidores de la ECA (Rodríguez-Figueroa et al., 2011), en el análisis de péptidos identificó la secuencia peptídica QEPVLGPVRRGPFPIIV proveniente de la fracción 194-209 de la β -CN. Esta misma secuencia fue reportada por Rojas-Ronquillo et al. (2012) como péptido inhibidor de trombina, la cual se obtuvo mediante la fermentación láctea con *Lactobacillus casei* Shirota. Por lo anterior la alta capacidad de las fracciones derivadas principalmente de L-571 podría estar relacionada a la presencia de secuencia similares previamente descritas.

De acuerdo a todos los resultados anteriormente presentados, es notable que L-572 y L-571 tienen potencial para producir péptidos con actividad inhibidora de trombina a partir de la fermentación de la leche en 24 y 48 h. Esto se debe que su bioactividad se mantuvo

aún después de que las leches fermentadas se expusieran a condiciones gastrointestinales simuladas, indicando la resistencia de dichos péptidos o bien la liberación de péptidos más específicos a partir de las ya generadas por la proteólisis. Por lo que estas cepas pudieran ser utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de leches fermentadas con bifuncionalidad en el efecto cardioprotector.

7. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron cinco cepas de *Lactococcus lactis* con la finalidad de determinar su capacidad para producir péptidos con potencial actividad hipocolesterolémica y antitrombótica durante la fermentación láctica. Los resultados indicaron que las fracciones derivadas de la leche fermentada con 48 h con L-572 liberaron péptidos con ambas bioactividades, al presentar capacidad para inhibir la solubilidad micelar del colesterol, inhibir la enzima trombina y presentar efecto anticoagulante en plasma. Dichas bioactividades no se vieron afectados por la digestión gastrointestinal. Por lo anterior, dicha cepa podría ser utilizada para la producción de leches fermentadas con efecto cardioprotector bifuncional en un modelo *in vivo*. Adicionalmente, las cepas L-571 y L-600, podrían liberar péptidos potencialmente antitrombóticos e hipocolesterolémicos en un tiempo de 24 y 48 h de fermentación, respectivamente.

8. REFERENCIAS

Aguilar-Toalá J.E., Santiago-López L., Peres C.M., Peres C., Garcia H.S., Vallejo-Cordoba B., González-Córdova A.F. y Hernández-Mendoza A. 2017. Assessment of functional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*. 100: 65-75.

Arrigo F.G.C., Fogacci F., y Collectti A. 2016. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British Journal of pharmacology*. 174: 1378-1394.

Badimon, L. 2008. Enfermedad aterotrombótica coronaria : avances en el tratamiento antiplaquetario, 501–513.

Barbana C., Boucher A.C. y Boye J.I. 2011. In vitro of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Research International*. 44(1): 174-180.

Beltrán-Barrientos L.M., Hernández-Mendoza A., González-Córdova A.F., Astiazaran-García H., Esparza-Romero J. y Vallejo-Cordoba B. 2018. Mechanistic Pathways Underlying the Antihypertensive effect of Fermented milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 in spontaneously Hypertensive Rats. *Nutrients*. 10:262.

Boachie R., Shixiang Y., y Chibuike C.U. 2018. Molecular mechanism of cholesterol-lowering peptides derived from food proteins. *Current Opinion in Food Science*. 20: 58

Cardoso C. Afonso C y Lourenco H. 2015. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk-benefit evaluation of food. *Trends in food science and Technology*. 45(1): 5-23.

Carou, M. C. V. 2008. Alimentos funcionales Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y cómo declarar sus efectos sobre la salud, 1–27

Chabance B., Jolles P., Mazoyer E., Francoual C., Drouet L. y Fiat A.M. 1995. Characterization of an antithrombotic peptide from kappa-casein in newborn plasma after milk ingestion. *Br J Nutr*. 73(4): 583-590.

Chen D., Wang S., Diao X., Zhu, Q., Shen H., Han, X, and Xu, Y. 2015. Design, synthesis and antithrombotic evaluation of novel dabigatran etexilate analogs, a new series of non-peptides thrombin inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(23): 7405–7416.

Chibuikue U. Y Aluko R. 2012. Hypolipidemic and hypocholesterolemic food proteins and peptides. En: Hettiarachchy N., Sato K. Marshall M.R., y Kannan A. Bioactive food proteins and peptides: Applications in human health. Taylor & Francis Group, 191-218.

·Church C. F., Swaisgood H. E., Porter D. H., y Ctignani L. 1983. Spectrophotometric assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66(6): 1219-1227.

Cian R.E., Garzón G.A., Ancona B. D., Guerero C.L. y Drago S.R. 2015. Hydrolysates from *Pyropia Columbia* seaweed have antiplatelet aggregation, antioxidant and ACE I inhibitory peptides which maintain bioactivity after simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*. 64(2): 881-888.

·Córdova P., V. H., Vargas V. P., Vega, C., Quintero, M. y Monroy, R. H. 2011. Agregometría plaquetaria: el estudio de la agregación de las plaquetas y la disfunción plaquetaria. *Medicina Interna de México*, 27(1): 58–74.

Corral, P. 2014. Historia y revisión de los inhibidores de la proteína transportadora de ésteres de colesterol y su aporte a la comprensión de la fisiología y la fisiopatología de la lipoproteína de alta densidad, 26(2): 78–84.

Coste V.M., Rochet V. Leonil J., D. Molle, S. Bouhallab y Tome D. 1992. Identification of c-terminal peptides from bovine B-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters*. 33: 41-46

Erdman K., Cheung W.Y.B., y Shroder H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The journal of Nutritional Biochemistry*. 19(10): 643-654.

Even S., Lindley N. D. y Coaign-Bousquet M. 2001. Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL403. *Journal of bacteriology*. 183(13): 3817-3824.

Fernandez-Garcia E. Carvajál-Lérida I. And Pérez-Gálvez. A. 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Reserach*. 29(11): 751-760.

Fernández, M., Hudson, J. A., Korpela, R., y Reyes-gavilán, C. G. D. L. 2015. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products. doi: 10.1155/2015/412714.

FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ .2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134:980–988

Frias J., Martinez-Villaluenga C. y Peña E. 2017. Fermented foods in health and disease preventions. Academic Press. Primera edición. Londres. 738 p.

Frias J., Martinez-Villaluenga C. y Peñas E. 2017. Fermented foods in Health and Disease Prevention. Primera edicion. Elsevier, Academic Press, BookAid International. USA. 788 p.

Gaertner F., Massberg. 2016. Blood coagulation in immunothrombosis – At the frontline of intravascular immunity. *Seminars in Immunology*. 28(6): 561-569.

Goldsack N. R., Chambers R. C., Dabbagh, K., and Laurent, G. J. 1998. Molecules in focus thrombin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(6): 641–646.

González-Córdova A. F., Torres-Llanaez M. J., Rodríguez-Figueroa J. J., Espinosa-de-los-Monteros H. S. García y Vallejo-Cordoba B. (2001). Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. *CyTA journal of food*. 9(2):146-151

Griffiths M. W. y Tellez A. M. 2012. *Lactobacillus helveticus*: the proteolytic system. *Frontiers in Microbiology*. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00030

Guan X., Xu Q., Zheng Y., Qian L. y Lin B. 2016. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Brazilian Journal of microbiology*. 48: 730-739.

Gutiérrez-Méndez, N., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V. y Rivera-Chavira, B. 2008. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. *Journal of Dairy Science*. 91(1):49-57.

H.J. y L. Y.S. (2002). Hypolipidemic effects of peptide fractions casein on serum lipids in rats fed normal or high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 31(2): 263-270.

Hadrich F., Mahmoudi A., Bouallagui Z., Feki I., Isoda H. Feve B. y Sayadi. 2015. Evaluaton of hypocholesterolémic effect of oleuropein in cholesterol-feed rats. *Chemico-Biological Interactions J*. 10.1016/j.cbi.2016.03.026

Hafeez Z., Cakir-Kiefer C., Roux E., Perrin C., Miclo L. y Dary-Morout A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk proteins. *Food Reserach International*, 63(A): 71-80.

Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., y Dary-Mourot, A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Research International*, 63: 71–80.

Hasler, C. M., Kundrat, S., y Wool, D. 2000. Functional foods and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 2(6): 467–475.

Hepner G., Fried, R., Jeor S., Fusetti L., y Morin R. 1979. Hypocholesterolemic effect of yogur and milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32: 19–24.

Hibbert B., Howard D.H., Nathan J., Trevor M.D. y Brien M.D. 2018. Coronary Physiology and Atherosclerosis. En: Kaplan J.A. Segunda edición. Kaplan's Essentials of Cardiac Anesthesia. 80-93.

Hoffman M. y Monroe D.M. 2006. Coagulation 2006: A modern view of hemostasis. Hematol. Oncol. Clin. 21: 1-11.

Hosono A., Otani H., Yasui H. y Watanuki M. 2002. Impact of fermented milk on human health: Cholesterol-lowering and immunomodulatory properties of fermented milk. Animal Science Journal. 73: 241-256.

Howard A. y Udenigwe C. 2013. Mechanism and prospects of food protein hydrolysates and peptide – induced hypolipidaemia. Food and Function. 4,40.

Instituto Nacional de Cardiología (INC). 2018. Estadísticas: causas de mortalidad Enero-Marzo (2018). Instituto Nacional de Cardiología y Secretaría de Salud. Disponible en línea: www.cardiologia.org.mx

Jackson R. 200. Wine Science, Principles, practice, perception. 2da edición. Academic Press-Elsevier. 645 p.

Jolles P. Levy-Toledano S., Fiat A.M., Soria C., Gillessen D., Thomaidis A y Caen J.P. 1986. Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. Eur. J. Biochem. 158(2): 379-382.

Kahlon T.S. y Woodruff C.L. 2002. In vitro binding of bile acids by soy protein pinto beans, black beans and wheat gluten. Food chemistry, 79: 425-429.

Kashima Y., Kanematsu S., Asai S. Kusada M., Watanabe S., Kawashima T., Nakamura T. Shimada M. Goto T. Y Nagaoka S. 2014. Identification of a novel hypocholesterolemic protein major Royal Jelly Protein 1. Derived from Royal Jelly. PLoS ONE. 9(8).

Kathib R. Y Wilson F. 2018. Pharmacology of Medications Used in the Treatment of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. En: Ramachandram S. Y Douglas S.B. Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine. Elsevier Inc. Primera edición, USA, 68-88 pp.

Khemariya, P., Singh, S., Nath, G., y Gulati, A. K. 2016. A review on industrially important *Lactococcus lactis*: General information, metabolism and genotypic identification tools. Anchor Academic Publishing.

Khyzha, N., Alizada, A., Wilson, D., y Fish, J. E. (2017). Epigenetics of Atherosclerosis : Emerging Mechanisms and Methods. Trends in Molecular Medicine, 23(4): 1–16.

Kimikazu I., Sakakibarra K. Y Ibuki F. 2014. Involment of post-digestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50(5): 1217-1222.

Kirana C., Rogers P. F., Bennett L. E., Aveywardena M.Y.y Patten S.G. 2005. Naturally derived micelles for rapid *in vitro* screening of potential cholesterol-Lowering bioactives. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53: 4623-4627.

Kongo-Dia-Moukala J., Nsor-Atindana J. Y Zhang H. 2011. Hypocholesterolemic activity and characterization of protein hydrolysates from defatted corn protein. *Asian Journal of Biochemistry*. 6(6): 439-449.

Kopf-Bolanz K. A., Shwander F., Gijs M., Vergeres G., Portmann R. y Egger L. 2012. Validation of *in vitro* digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *The journal of nutrition*. 142: 245-250.

Lähteenmäki, L. (2013). *Food Quality and Preference*, 27, 196–201.

Lammi C., Zanoni C., Aiello G. Arnoldi A. y grazioso G. 2016. Lupin peptides modulate the protein-protein interaction of PCSK9 with the low density lipoprotein receptor in HepG2 cells. *Scientific reports*. (6) 1-13.

Lammi C., Zanoni C., Scigliuolo G.M., D'Amato A., Arnoldi A. 2014. Lupin peptides lower low density lipoprotein (LDL) cholesterol though an up-regulation of the LDL repector/Sterol regulatory element binding protein 2 (SCREBP2) pathway at HepG2 cell line. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(2): 7151-7159

Leonil J. y Molle D. 1990. Liberation of tryptic fragments from caseinomacropptide of bovin kappa-casein involved in platelet function. Kinetic study. *Biochem J*. 27(1): 247-252.

Levy-Toledano S., Caen J., Grelac F. y Maclouf J. 1995. KRDS, a peptide derived from human lactotransferrin, inhibits Thrombin-induced thromboxane synthesis by cyclooxygenase independent mechanism. *Thrombosis and Haemostasis*. 73(5). 857-861.

Lievens D., Hundelshausen V. 2011. Platelets in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 106 (5).

Lin Y. Jenn-Shou T., Lang-Bang H., Sun B. 2010. Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and Gracilaria. *Food Chemistry*. 123: 395-399.

Lin Y.H., Tsai J. S., Hung L. B. y Sun P.B. 2010. Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and gracilaria. *Food chemistry*. 123(2): 395-399

Liu J., Wang S., Chen M., Chen H., Yueh P., and Lin, C. 2006. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters, (2006), 939–946.

Liu M., Bayjanov J.B., Renckens B., Nauta A., y Siezen R. J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. 11: 36

Mackman N., Tilley E., Nigel S. y Key S.N. 2007. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arteriscler Thromb Vasc Biol.* DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.141911

Mahr K., Hillen W. y Titgermeyer F. 2000. Carbon catabolite Repression in *Lactobacillus pentosus*: Analysis of the *ccpA* region. *Applied and environmental microbiology.* 66(1): 277-238.

Malpeli, A., Taranto, M., Cravero, R., Tavella, M., Fasano, V., Vicentin, D. 2015. Effect of daily consumption of *lactobacillus reuteri* CRL 1098 on cholesterol reduction in hypercholesterolemic subjects. *Food Nut. Sci.* 6, 1583-1590.

Marco M. Heeney D., Binda S., Cifelli Ch., Cotter P., Foline B., Ganzle R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E. y Hutkins. 2017. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. 44: 94-102.

Marcone S. y Fitzgerald D. 2016. Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: A potential role in atherosclerosis. *British Journal of clinical Pharmacology.* Doi: 10.1111/bcp.13002.

Marcone S., y Fitzgeral D. 2016. Milk-derived bioactive peptides and their health promotings effects: A potential role in atherosclerosis. *British Journal of clinical Pharmacology.* DOI: 10.1111/bcp.13002

Martín, S. V., Pastor, S. G., Triguero, M. L. M., y Mijares, A. H. 2012. Hiperlipidemias primaria. *Medicine-Programa de Formación Medica Continuada Acreditada*, 11(19): 1130–1136.

Matínez-Navarrete N., Camacho V.M.M. y Martínez J.J. 2008. Los compuestos bioactivos de frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética.* 12(2): 64-68.

Mazoyer E., Levy-Toledano S., Rendu F., Hernant L. Lu H., Fiat A.M., Jolles P. y Caen J. 1990. KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur J Biochem.* 194(1): 43-9.

Meisel H, Fairweather-Tait S, FitzGerald RJ, Hartmann R, Lane CN, McDonagh D, Teucher B, Wal JM. 2003. Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Br J Nutr.*, 89:351–358

Mejias C., Pedroche J., Yust M. M., Alaiz M. Giron-Calle J., Millan F., Vioque J. 2009. Sunflower Protein Hydrolysate Reduce Cholesterol Micellar solubility. *Plant Foods Hum. Nutr.* 64: 86-93.

Mieras, M. P., Alonso, P. M., Gómez, P. C., y Son, H. 2004. Hiperlipidemias : concepto, clasificación y mecanismo etiopatogénico . *Medicine*, 9(18): 1089–1104.

Mohan A. y Udenigwe C. 2015. Towards the desing of hypolipidemic peptides: deoxycholate binding affinity of hydrophobic peptide aggregates of casein plastein. *Journal of functional foods*. 18: 129-136

Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., y Sahu, P. S. 2015. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23(5): 577-583.

Morgan A.E., Mooney K.M.,Wilkinson S.J., Pickles N.A. y Auley M.T. 2016. Cholesterol metabolism. A review of how ageing disrupts the biological mechanism responsible for its regulation. *Ageing Research Review*. 27: 108-124.

Morikawa, K., Ishikawa, K., Kanamaru, Y., y Nagaoka, S. 2007. Effects of dipeptides having a C-terminal lysine on the cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA level in HepG2 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 821–825.

Morikawa, K., Kondo, I., Kanamaru, Y., y Nagaoka, S. 2007. A novel regulatory pathway for cholesterol degradation via lactostatin. *Biochemical Biophysical and Research Communications*, 352, 697–702.

Moriya. 2018. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *Journal of Cardiology*. Doi: doi.org/10.1016/j.jcc.2018.05.010

Nagaoka S. Futamura Y. Miwa K., Awano T., Yamauchi K. Kanamaru Y. Tadashi K. y Kuwato T. 2001. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from Bovine milk B-Lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 281:11-17

Nagaoka S., Nakamura A., Shibata H. y Kanamaru Y. 2010. Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorción in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(8): 1738-1741.

Neves A.R., Pool W.A., Kok J., Kuipers O.P. y Santos H. 2005. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. *Microbiology Reviews*. 29(3): 531-554.

Nongonierma A.B., O’Keeffe M.B., FitzGerald R.J. 2016. Milk protein hydrolysates and Bioactive peptides. En: Nongonierma A.B., O’Keeffe M.B., FitzGerald R.J. *Advanced Dairy Chemistry*. Springer Science. New York. 417-482.

Nongonierma A.B., O’Keeffe B.O. y FitzGerlad J.R. 2016. Milk Protein Hydrolysates and Bioctive Peptides. En: McSweeney P.L.H. y O’Mahony J.A. *Advanced Dary Chemistry* 417-482 pp.

Ooi L.G. Liong M.T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(6): 2499-2522.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Enfermedades Cardiovasculares (Nota descriptiva). Recuperado de www.who.com

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Technical package for cardiovascular disease management in primary health care. World Health Organization. Recuperado de www.who.com

Ouweneel A. y Eeck M. 2015. Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: From endothelial function to primary and secondary coagulation. *Vascular Pharmacology*. 82: 1-10

Ouweneel A.B. y Van E. M. 2016. Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: From endothelial function to primary and secondary coagulation. *Vascular Pharmacology*. 82:1-10.

Padsalgikar, A. D. 2017. Cardiovascular System: Structure, Assessment, and Diseases. En: A. D. Padsalgikar. Primera edición, *Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications* William Andrew Publishing. 103-132 pp.

Passerini D., Coddeville M., Bourgeois P., Loubiere P., Ritzenthaler P., Fontagne-Faucher C., Daveran-Mingot M.L. y Bousquet-Cocaign M. 2013. The carbohydrate metabolism signature of *Lactococcus lactis* strain A12 reveals its sourdough Ecosystem origin. *Applied and environmental Microbiology*. 79(19): 5844-5852.

Picariello G. Mamone G. y Nitride C. 2013. Protein digestomics: Integrated platform to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. 52: 120-134.

Pihlanto-Leppälä A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Science and Technology*. 11:347–356

Pihlanto, A. y Korhonen, H. 2015. Bioactive peptides from fermented foods and health promotion. *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Elsevier Inc. 39-74.

Price C. E., Zeyniyev A., Kuipers O. y Kok J. 2012. From meadows to milk to mucosa – adaptation of *Streptococcus* and *Lactococcus* species to their nutritional environments. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(5): 949-971

Qian Z.Y., Jolles P., Migliore-Samour D., Schoentgen F. y Fiat A.M. 1995. Sheep kappa-casein peptides inhibit platelet aggregation. *Biochim, Biohys Acta*. 1244(2-3): 411-417.

Ramdath D., Emily M.T., Sarfaraz S. y Renwick S. 2017. Beyond the cholesterol-lowering effect of Soy Protein: A review of the effects of dietary soy and its constituents on risk factors for cardiovascular disease. *Nutrients*. 9(324) 1-24.

Rendón R.M.A. 2016. Evaluación in vitro de la actividad antitrombótica de leches fermentadas por cepas específicas de bacterias ácido lácticas (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Chapingo.

Rodrigues-Marques M., Aparecida R., Soares M. Correa A.C., Sayuri E., Guadagnucci F.G. y Gomes J.A. 2015. Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into micelles. *Food chemistry*. 168: 288-293.

Rodríguez-Figueroa J.C., Córdova-González A.F., García-Astiazaran H., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Cordoba B. 2013. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 97(7): 4094-4096.

Rodriguez-Figueroa J.C., González-Cordiva A.F., Astiazaran-García H., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Cordoba B. 2013. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 97(6): 4094-4099.

Rodriguez-Figueroa J.C., González-Cordova A.F., Torres-Llanez M.J. Garcia H.S., y Vallejo-Cordoba B. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *American Dairy Science Association*. doi.org/ 10.3168/jds.2011-5186

Rodríguez-Figueroa J.C., Reyes-Díaz R., González-Córdova A.F., Troncoso-Rojas R., Vargas-Arispuro I. y Vallejo-Cordoba B. 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory of milk fermented by wild strains and industrial *Lactococcus lactis* strains. *American Dairy Science Association*. 93(11): 5032-5038.

Ruggirello, M., Cocolin, L., y Dolci, P. 2016. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology*. 59: 112–118.

Sabbione A.C., Nardo A.E., Añon M.C. y Scilingo A. 2016. Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of functional foods*. 20: 204-214.

Sabbione A.C., Scilingo A. y Añon M.C. 2015. Potential antithrombotic activity in amaranth proteins and peptides and its hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*. 60(1): 171-177.

Salvo, F., Bezin, J., Bosco-levy, P., Letinier, L., Blin, P., Pariente, A., y Moore, N. 2017. Pharmacological treatments of cardiovascular diseases : Evidence from real-life studies. *Pharmacological Research*, 118, 43–52.

Sánchez-Rivera, L. Martínez-Maqueda, D. and Cruz-Huerta E. 2014. Peptidomics for discovery, discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food research International*. 60: 170-181.

Sandre C., Gleizes A., Forestier F., Georges-Kergot S., Chilmonczyk S. y Leonil. 2001. A peptide derived from B-casein modulates functional properties of bone marrow-derived macrophages from germ free and human flora-associated mice. *Journal of nutrition*. 121: 2936-2942.

Sauer y Merchant. 2018. *Comprehensive Toxicology-Physiology of the gastrointestinal system*. Third Edition. Doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.99195-5

Savijoki, K., Ingmer, H., y Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406.

Sha N. 2017. *Yogurt in Health and Disease Prevention*. Primera edición. Elsevier, Academic Press. London U.K. 572 p.

Shiby, V. K., y Mishra, H. N. 2013. Fermented milks and milk products as functional foods--a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 482–96.

Shu, L., Arneson, D., y Yang, X. 2017. *Bioinformatics Principles for Deciphering Cardiovascular Diseases*. En: Ramachandram S. Y Douglas S.B. *Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine*. Elsevier Inc. Primera edición, USA, 273-292 pp.

Singh B., Ram Ch., Singh D., Singh N. P., Singh A., Singh R., y Verma R. R. 2018. Potential of Novel Bioactive Peptides as Functional Ingredients in Preventing Cardiovascular Disease. En: Holban A. y Mihai A. *Alternative and Replacement Foods*. Primera edición. Academic Press, USA, 411-431 pp.

Singh B.P., y Vij. 2018. *In vitro* stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. *LWT-Food science and technology*. 91: 303-307.

Soleymanzadeh N., Mirdamadi S. y Kianirad M. 2016. Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented camel milk (chal). *Dairy Science & Technology*. 96(4): 443-457.

Srinivas D., Mital B.K., Garg S.K. 1990. Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *International Journal of food microbiology*. 10: 51-50

Stulke y Hillen. 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol*. 2(2): 195-201.

Szwajkowska, M., Wolanciuk, A., Barłowska, J., Król, J., y Litwińczuk, Z. 2011. Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumer's immune system-a review. *Animal Science Papers and Reports*, 29(4): 269–280.

- Tamime, A. Y. 2006. Fermented milks. (B. S. Ltd, Ed.). Ayr UK.
- Teufel. 2018. Risk factors for cardiovascular diseases. En: Ramachandram S. Y Douglas S.B. Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine. Elsevier Inc. Primera edición, USA, 307-314 pp.
- Teusink B. y Molenaar D. 2017. Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current opinion in System Biology*. 6: 7-13
- Toldrá F., Reing M., Aristoy M.C. y Mora L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chemistry*. 267: 395-404.
- Torres-Llanez M.J., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A., García H.S., Vallejo-Cordova B. (2011). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *American Dairy Science Association*. 94(8):3794-3800.
- Triguero, M. L. M., Martín, S. V., Pastor, S. G., y Mijares, A. H. 2012. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas **Keywords** : *Medicine*, 11(19): 1125–1129.
- Tu M., Feng L., Wang Z., Qiao M., Shahidi F., Lu W., y Du M. 2017. Sequence analysis and molecular docking of antithrombotic peptides from casein hydrolysates by trypsin digestion. *Journal of Functional Foods*. 32: 313-323
- Valdés A., Cifuentes A. y León C. 2017. Foodomics evaluation of bioactive compounds in foods. *Trends in Analytical Chemistry*. 96:(2-13).
- Vergeres G. Bogicevic B, Buri, C. Carrara, S. y Chollet M. 2012. The nutrchip project- Translating technology into nutritional knowledge. 108: 762-768.
- Versantvoort C.H.M., Oomen A. G., Van K.E., Romperlberg J. M. y Sips J. A. M. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and chemical Toxicology*. 43(1): 31-40.
- Vilahur G. y Badimon L. 2013. Antiplatelet properties of natural products. *Vascular Pharmacology*. 59(3-4): 67-75.
- Virtanen T., Pihlanto A., Korhonen H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102(1): 106-115.
- Wakai T., y Yamamoto N. 2012. Antihypertensive Peptides Specific to *Lactobacillus helveticus* Fermented Milk. (15).
- Wang y Lee. 2017. Charge and hydrophobicity of casein peptides influence transepithelial transport and bioavailability. *Food chemistry*. 245: 646–652

Xie N., Wang B., Jiang L., Liu C. y Li., B. 2015. Stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption. *Food Research International*. 74(3): 518-526

Yamamoto N., Akino A. y Takano T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP760. *Journal of Dairy Science*. 77: 917-922

Yang W. G., Wang Z., and Xu, S. Y. 2007. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chinese Chemical Letters*, 18(4): 449–451.

Yao S., Agyei D. Y Udenigwe C. 2018. Structural basis of bioactivity of food peptides in promoting metabolic health. En. Yao S. y Udenigwe C. *Advances in food and nutrition Research*. Volumen 84.

Yoshie-Stark y Wasche A. 2004. In vitro binding of bile acids by lupin protein isolates and their hydrolysates. *Food chemistry*. 88 (2): 179-184.

Zhang B.S. 2016. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food chemistry*. (202): 1-8.

Zhang B.S., Wang Z. y Xu Y.S. 2008. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. *J Am Oil Chem Soc*. 85: 521-527.

Zhong F. Zhang X. Ma, and J. Shoemaker C.F. 2007. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase Hydrolysates. 40: 756-762.

Zhong F., Jianmin L., Jianguo M. Shoemaker C.F. 2006. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. *Food Research International*. 40: 661-667