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

POTENCIAL EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y ANTITROMBÓTICO DE LECHES FERMENTADAS CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS ESPECÍFICAS SOMETIDAS A DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA

Por:

Miriam Zambrano Cervantes

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Agosto 2020

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Miriam Zambrano Cervantes, 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 de Tesis

Dr. Aarón Fernando González Córdova
Integrante del comité de tesis

Dr. Adrián Hernández Mendoza
Integrante del comité de tesis

Dra. Lilia María Beltrán Barrientos
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Potencial Efecto Antihipertensivo y Antitrombótico de Leches Fermentadas con Bacterias Ácido Lácticas Específicas Sometidas a Digestión Gastrointestinal Simulada" 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 de la autora Miriam Zambrano Cervantes, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CIAD

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el posgrado, para poder realizar este proyecto y poder desarrollarme profesionalmente.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), por haberme dado la oportunidad para realizar un posgrado y por brindarme un espacio en el Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y de Química y Biotecnología de Productos Lácteos.

A los proyectos de investigación de CONACYT 240338 y 60305 por el apoyo financiero otorgado para realizar de este estudio.

Especial agradecimiento a la Dra. Belinda Vallejo Galland, por ser mi directora de tesis y por la confianza brindada para realizar este trabajo, por sus consejos, por la oportunidad de aprender de usted. Muchas gracias por su disponibilidad de tiempo y apoyo durante el posgrado. Gracias por ayudarme a crecer en el área de investigación y como persona.

Agradezco al Dr. Aarón F. González Córdova por el apoyo otorgado para realizar este trabajo, por sus consejos, opiniones y regaños. Gracias por su atención y disponibilidad de tiempo.

Al Dr. Adrián Hernández Mendoza, por su asesoría durante el trabajo de laboratorio, por siempre ayudarme a mejorar mis presentaciones, por su disponibilidad de tiempo, sus aportaciones y sus enseñanzas. Gracias por compartirme su conocimiento.

A la Dra. Lilia María Beltrán Barrientos, gracias por toda la ayuda brindada, por sus enseñanzas y correcciones, gracias por compartirme su conocimiento, por ayudarme siempre a realizar este trabajo, por estar siempre disponible para enseñarme. Muchas gracias a mi asesora más chiquita.

Agradecimientos a la M. en C. María del Carmen Estrada Montoya y al M. en C. Ricardo Reyes Días por el apoyo otorgado en el trabajo de laboratorio y por su paciencia.

Al M. en C. Miguel Ángel Rendón, a la M en C. Carmen Manzanares. Gracias infinitas a ustedes por ser la mano de apoyo en el laboratorio, por darse el tiempo para ayudarme y explicarme cuando no sabía qué hacer, por compartirme su conocimiento y más que nada, gracias por su amistad!!!

Gracias a la Dra. Lourdes Santiago López y Dra. María de Jesús Torres Llanez por todo su apoyo y enseñanzas.

Gracias a Eduardo Rubio, Miguel Álvarez, Rodrigo Sígala por su amistad, así como, a todo el grupo del laboratorio de Lácteos: Adilene Mendoza, Ariana Domínguez, Cecilia Castro, Daniel Gonzáles, Isidro Méndez.

A todo el personal del Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos y de Química y Biotecnología de Productos Lácteos.

Gracias a mis compañeros y amigos de CIAD, Azael Castro, Glenda Gutiérrez, Marisol Padilla, Ángela Nieblas, Fernanda Campa, Conchita Cruz.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera fueron parte importante en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá Miriam Cervantes Godoy, por todo su apoyo, su amor incondicional, por motivarme siempre a crecer como persona, por estar siempre ahí para mí, por enseñarme a no darme por vencida.

A Jhonatan Fierros, por siempre apoyarme, por creer en mí incluso cuando yo no creía en mi misma, por su paciencia, su motivación y su cariño. Te amo.

Finalmente, este trabajo lo dedico especialmente a mí, por no rendirme cuando creía que ya no podía más, por no darme por vencida, por darme cuenta que puedo logar todo lo que me proponga.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 10
LISTA DE ECUACIONES 11
RESUMEN 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUCCIÓN 14
2. ANTECEDENTES 17
2.1. Panorama Actual de las Enfermedades Cardiovasculares y Factores de Riesgo 17
2.2. Hipertensión Arterial Como Factor Asociado a las ECV 18
2.3. Papel del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona en la Regulación de la Presión Arterial… 19
2.4. Hipercolesterolémia Como Factor Asociado a las ECV 21
2.5. Aterosclerosis y Trombosis Como Factores de Riesgo Asociado a las ECV 22
2.6. Estrategias Empleadas en el Control de las ECV y sus Factores de Riesgo 24
2.6.1. Tratamientos Farmacológicos Empleados en el Control de Hipertensión, Hipercolesterolemia y Trombosis 25
2.6.2. Tratamientos No Farmacológicos Empleados en el Control de las ECV y sus Factores de Riesgo 26
2.7. Alimentos Funcionales como Estrategia para el Tratamiento de ECV 26
2.8. Péptidos Bioactivos 28
2.9. Producción de Péptidos Bioactivos por Medio de Fermentación Bacteriana 29
2.10. Leches Fermentadas como fuente de Péptidos Bioactivos y su Efecto Benéfico en la Salud Cardiovascular 31
2.10.1. Leches Fermentadas: Fuente de Péptidos Bioactivos Inhibidores de la ECA 32
2.10.2. Leches Fermentadas: Fuente Péptidos Bioactivos Inhibidores de Trombina 35
2.11. Potencial efecto benéfico de leches fermentadas con BAL específicas 37
2.12. Biodisponibilidad de Péptidos Bioactivos 38
3. HIPÓTESIS 41
4. OBJETIVOS 42
4.1. Objetivo General 42
4.2. Objetivos Específicos 42

CONTENIDO (continuación)

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....43
5.1. Cepas Bajo Estudio.....43
5.2. Reactivación y Propagación de las Cepas 43
5.3. Elaboración de Leches Fermentadas 44
5.4. Simulación de Digestión Gastrointestinal *in vitro* de Leches Fermentadas 44
5.5. Determinación del Grado de Hidrólisis de las Leches Fermentadas Antes y Después del Proceso Digestivo Simulado.....47
5.6. Fraccionamiento de Leches Fermentadas.....48
5.7. Cuantificación de Proteína.....48
5.8. Determinación de las Bioactividades 48
5.8.1. Evaluación de la Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).....48
5.8.2. Actividad Inhibidora de Trombina 49
5.9. Análisis Estadístico 50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....52
6.1. Grado de Hidrólisis y pH de Leches Fermentadas 52
6.2. Grado de Hidrólisis de Leches Fermentadas Digeridas 55
6.3. Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina de Leches Fermentadas Después del Modelo de Digestión Gastrointestinal Simulada.....57
6.4. Actividad Inhibidora de la Enzima Trombina de Leches Fermentadas Después del Modelo de Digestión Gastrointestinal Simulada.....61
7. CONCLUSIONES.....66
8. REFERENCIAS 67

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona……..	20
2	Representación de la cascada de coagulación sanguínea mediante las vías de activación (extrínseca e intrínseca)……	23
3	Sistema proteolítico de Bacterias Ácido Lácticas……..	31
4	Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos……..	33
5	Valores de pH de leches fermentadas por BAL específicas…….	53
6	Grado de hidrólisis de leche fermentada por BAL específicas expresado como porcentaje (%)……	54
7	Grado de hidrólisis de leches fermentadas por BAL específicas digeridas expresado como porcentaje (%)…….	56
8	Porcentaje de inhibición ECA de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas digeridas……..……..…….	58
9	Porcentaje de inhibición de la enzima trombina de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas digeridas……..	62
10	Asociación entre IC_{50} (mg/mL de proteína) para inhibir a la ECA y a la enzima trombina de leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* (J20, J23, J28 y J38) después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada…….	65

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de la presión arterial en adultos…….....	18
2	Niveles de colesterol recomendados……..……	21
3	Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas……	29
4	Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de leches fermentadas con actividad inhibidora de la ECA y de la enzima trombina……..…….	37
5	Cepas empleadas para la fermentación de leches en el presente estudio…….	43
6	Composición de los diferentes jugos digestivos empleados en la simulación gastrointestinal…….	46
7	Valores de IC_{50} de IECA (mg/mL) de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada……..…….…….	59
8	Valores de IC_{50} de IT (mg/mL) de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada……..……...	63

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Determinación del grado de hidrólisis……..	47
2	Determinación del porcentaje de inhibición de la ECA…….	49
3	Determinación del porcentaje de inhibición de la enzima trombina.…….	50

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son uno de los problemas principales de salud pública, asociados a la alta tasa de mortalidad en todo el mundo. Estudios previos han reportado que leches fermentadas (LF) por bacterias ácido lácticas (BAL) específicas pueden ejercer un efecto positivo en la salud. Debido a que las BAL podrían liberar, durante la fermentación, péptidos bioactivos con potencial efecto antihipertensivo y antitrombótico. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y de la enzima trombina (IT) de LF, durante 24 y 48 h, con BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. Se estudiaron ocho BAL específicas para la elaboración de las LF, a las cuales se les evaluó el grado de hidrólisis. Posteriormente, las LF fueron sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. Finalmente, se evaluó in *vitro* la IECA y la IT, de la fracción < 3 kDa, y se determinó la concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la ECA o trombina (IC_{50}). Los resultados mostraron un mayor ($p<0.05$) grado de hidrólisis en las LF por 48 h comparado con las LF por 24 h. En cuanto a las bioactividades, los resultados evidenciaron que las fracciones < 3 kDa de LF por las cepas J20, J23, J28, J38 y L50, después de 24 h de fermentación, y por las cepas J20, J28, J38 y L50, fermentadas durante 48 h, presentaron los menores ($p<0.05$) valores de IC_{50} para IECA (0.27-0.39 y 0.27-0.33 mg/mL, respectivamente). Mientras que las fracciones < 3 kDa de LF por las cepas J23, J28 y J38, fermentadas por 24 h, y por las cepas J20, J23, J28 y J38, incubadas por 48 h, mostraron los menores ($p<0.05$) valores de IC_{50} para IT (0.19-0.64 y 0.21-0.41 mg/mL, respectivamente). Debido a que las LF por las cepas J20, J23, J28 y J38 fueron las que presentaron menores IC_{50} para ambas bioactividades después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada, estas podrían mostrar potencial efecto antihipertensivo y antitrombótico *in vivo*.

Palabras claves: hipertensión, trombosis, leches fermentadas, péptidos bioactivos, digestión gastrointestinal.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the major public health problems associated with the high mortality rate worldwide. Previous studies have reported that fermented milks (FM) by specific lactic acid bacteria (LAB) may have a positive effect on health. During the fermentation process, LAB could release bioactive peptides with potential antihypertensive and antithrombotic effect. Therefore, the aim of the present study was to evaluate *in vitro* the inhibitory activities of the angiotensin-converting enzyme (ACEI) and the thrombin enzyme (TI) of FM during 24 and 48 h by specific LAB after being exposed to a simulated gastrointestinal digestion model. Eight specific LAB were studied for the preparation of FM. Subsequently, the degree of hydrolysis was evaluated. Then FM were subjected to a simulated gastrointestinal digestion model. Finally, ACEI and TI of the fraction < 3 kDa were evaluated *in vitro*. In addition, the IC_{50} (protein concentration necessary to inhibit ACE or thrombin activity by 50%) was determined. The results showed higher degree of hydrolysis ($p<0.05$) in FM by 48 h compared to the FM by 24 h. As for the analysis of bioactivities, the results showed that the fraction < 3 kDa of FM by the strain J20, J23, J28, J38 and L50 at 24 h fermentation and FM with J20, J28, J38 and L50 at 48 h of fermentation, the lowest IC_{50} ($p<0.05$) values for ACEI (0.27-0.39 y 0.27-0.33 mg/mL, respectively). For TI, the fraction < 3 kDa of FM with J23, J28 and J38 fermented by 24 h and by the strains J20, J23, J28 and J38 at 48 h of fermentation, showed the lowest IC_{50} ($p<0.05$) values for IT (0.19-0.64 and 0.21-0.41 mg/mL, respectively). Since FM with the strains J20, J23, J28 and J38 were those that presented the lowest IC_{50} values for both bioactivities after being subjected to a simulated gastrointestinal digestion model, they could present potential antihypertensive and antithrombotic effects *in vivo*.

Key words: hypertension, thrombosis, fermented milks, bioactive peptides, gastrointestinal digestion.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), se definen como un grupo de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos (OMS, 2017). Estas son la principal causa de muerte y uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial (OMS, 2017), por lo cual se les considera un grave problema de salud pública. De acuerdo al Instituto Nacional de Cardiología (INC, 2019), las ECV son las principales causas de muerte en México.

Los estudios han evidenciado que existen diversos factores de riesgo asociados al desarrollo de las ECV, entre los cuales destacan la hipertensión y las dislipidemias (Borghi *et al*., 2016). La hipertensión es una enfermedad crónico degenerativa, la cual se define como la elevación crónica de la presión arterial con los valores de presión arterial sistólica mayor o igual a 130 mmHg y presión diastólica mayor o igual a 80 mmHg (Whelton *et al*., 2017). Por otro lado, la hipercolesterolemia se define como, una elevación del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), con un valor de colesterol total >200 mg/dL (IMSS, 2016; Pocovi-Mieras *et al*., 2004). El daño endotelial causado por la hipertensión y por la infiltración de lipoproteínas LDL y VLDL debido a la hipercolesterolemia, promueven el desarrollo de una placa ateroesclerótica (Teufel *et al*., 2018). Al romperse esta, se activa la cascada de coagulación, lo que conlleva al desarrollo de trombosis arterial, un estado fisiopatológico integrado por la agregación plaquetaria y la coagulación sanguínea (Mackman *et al*., 2007).

Por lo anterior, se han desarrollado diferentes tratamientos para disminuir las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo. Entre los tratamientos farmacológicos, están los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), betabloqueadores, estatinas, anticoagulantes, agentes antiplaquetarios, entre otros. Aunque los tratamientos farmacológicos han dado resultados positivos, también se han reportado reacciones adversas y efectos secundarios a corto y largo plazo (*e.g.* tos, perturbación del gusto y salpullidos en la piel, daño hepático, hemorragias y alergias). Además, la falta de adherencia los tratamientos farmacológicos es persistente (Salvo *et al*., 2016; Torruco-Uco *et al*., 2008). Por lo anterior, se han buscado e implementado estrategias no farmacológicas complementarias para coadyuvar al tratamiento de las ECV, tales como evitar el consumo de alcohol y tabaquismo, realizar actividad física, y llevar una dieta y estilo de vida saludable (OMS, 2015).

Es por esto que, en los últimos años se han evaluado diferentes alimentos que además de su nutrición básica, poseen efectos benéficos a la salud, denominados como alimentos funcionales (FUFOSE, 1999; Carou, 2008). Entre estos, los productos lácteos fermentados han demostrado tener varios beneficios a la salud, los cuales se han atribuido a los compuestos biológicamente activos presentes, tales como péptidos específicos (Ebringer *et al*., 2008). Durante el proceso de fermentación de la leche, gracias al sistema proteolítico de las bacterias ácido láctico (BAL), se liberan péptidos de bajo peso molecular (2 a 20 aminoácidos), los cuales se encuentran encriptados en las proteínas nativas (Hill *et al*., 2017). Algunas de las propiedades biológicas asociadas a estos péptidos específicos incluyen actividad antihipertensiva, antimicrobiana, antitrombótica, inmunomoduladora, entre otras (Aguilar-Toalá *et al*., 2017; Korhonen y Pihlanto, 2007; Pihlanto, 2013; Toldrá *et al*., 2018).

En este respecto, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado el potencial efecto antihipertensivo, antitrombótico e hipocolésterolemico de leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis*, mediante la liberación de péptidos inhibidores de la ECA (Beltrán-Barrientos *et al*., 2018a,b; Rodríguez-Figueroa *et al*., 2010), péptidos inhibidores de la enzima trombina, y por la inhibición micelar del colesterol y la unión a sales biliares (Rendón-Rosales *et al*., 2019), respectivamente. Por otro lado, Rojas-Ronquillo *et al*. (2012), reportaron que al fermentar un medio de caseína bovina con *Lactobacillus casei* Shirota, favoreció la liberación de péptidos inhibidores de la ECA e inhibidores de la enzima trombina. No obstante, es importante evaluar nuevas cepas de BAL, que además de poseer propiedades tecnológicas para el desarrollo de productos lácteos fermentados, puedan generar péptidos con efecto cardioprotector (Beltrán-Barrientos *et al*., 2016; Shiby y Mishra 2013).

En este sentido, la evaluación de BAL nativas de productos lácteos artesanales puede ser prometedora debido a la capacidad tecnológica y funcional, lo cual les permitiría competir con bacterias actualmente usadas a nivel comercial (Beltrán-Barrientos *et al*., 2016). En este sentido, Heredia-Castro *et al*. (2015), aislaron y caracterizaron cepas específicas del género *Lactobacillus* spp. a partir de queso Cocido artesanal (Sonora, México). Posteriormente, demostraron que varias de estas cepas poseen actividades biológicas como la liberación de péptidos antimicrobianos (Heredia-Castro *et al*., 2015), características probióticas e imnonumoduladoras (Santiago-López *et al*., 2018), potencial antiinflamatorio de LF y sus fracciones peptídicas (Reyes-Díaz *et al*., 2018), así como la capacidad de inhibir a la ECA (Salazar-Enciso, 2013). En otro estudio, se identificaron

por medio de técnicas moleculares, BAL aisladas de queso de Poro genuino de Balancán (Benítez-Romero, 2013), entre ellas, se identificaron bacterias del genero *Lactobacillus*, *Lactoccocus* y *Enterococcus*, las cuales podrían ser las responsables de las cualidades sensoriales peculiares de este producto (Benítez-Romero, 2013). Sin embargo, aún se desconoce el potencial efecto antihipertensivo y antitrombótico de leches fermentadas por estas BAL específicas.

Por otro lado, es importante considerar que los péptidos bioactivos generados durante el proceso de fermentación de la leche, pueden ser hidrolizados por las proteasas gastrointestinales una vez consumidos, por lo que su bioactividad puede modificarse (Toldrá *et al*., 2018; Singh y Vij, 2018). Por lo anterior, es evidente la importancia de evaluar la estabilidad de los péptidos bajo condiciones gastrointestinales simuladas para conocer su bioaccesibilidad y biodisponibilidad (Mulero *et al*., 2011).

Por todo lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad inhibidora de la ECA y de la enzima trombina de leches fermentadas con BAL específicas, después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

2. ANTECEDENTES

2.1. Panorama Actual de las Enfermedades Cardiovasculares y Factores de Riesgo

Las ECV, se definen como un grupo de trastornos del corazón, de los vasos sanguíneos y de la red de arterias que constituyen el sistema cardiovascular (OMS, 2017). Dentro de estas enfermedades se encuentra el infarto al miocardio, accidentes vasculares cerebrales, cardiopatía coronaria, arteriopatías periféricas, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas, trombosis venosa profunda y embolias pulmonares (OMS, 2017). En el año 2015, 17.7 millones de personas murieron a causa de las ECV, representando el 31% del total de las muertes registradas a nivel mundial (OMS, 2017). En nuestra población, según el Instituto Nacional de Cardiología (INC, 2019), las ECV son de las principales causas de muerte en México. Además, de acuerdo con el reporte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2019) en el año 2018 representaron el 20.7% de defunciones totales en el país.

Las causas más importantes de las cardiopatías y los accidentes cerebrovasculares (ACV) son los malos hábitos alimenticios, la inactividad física, el consumo de tabaco y el consumo nocivo de alcohol. Los efectos de los factores de riesgo comportamentales (derivados del estilo de vida) pueden manifestarse en las personas en forma de hipertensión arterial, hiperglucemia, hiperlipidemia y sobrepeso u obesidad (OMS, 2017). Las autoridades en materia de salud han invertido para establecer programas con el objetivo de prevenir y controlar dichas enfermedades, enfocándose principalmente en el control de factores de riesgo derivados del estilo de vida (OMS, 2017).

Se ha estimado que la hipertensión afecta a 1130 millones de personas en el mundo (OMS, 2019). En México, según los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2018), El porcentaje de la población con diagnóstico médico de hipertensión, aumenta conforme se incrementa la edad, principalmente a partir de los 50 años, llegando al 26.7% en el grupo de 70 a 79 años. En el caso de hipercolesterolemia, la ENSANUT reportó en el año 2018 que, en la población igual o mayor a 20 años de edad, el 19.5% (17.7% entre hombres y 21% entre mujeres) presentaron niveles altos de colesterol sanguíneo (ENSANUT, 2018).

2.2. Hipertensión Arterial como Factor Asociado a las ECV

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias al ser bombeada por el corazón. Cuanta más alta es la presión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear (OMS, 2015). De acuerdo a las nuevas guías para el control, prevención y manejo de la hipertensión en adultos del Colegio Americano de Cardiología (ACC, por sus siglas en inglés) y de la Asociación Americana del Corazón (AHA, por sus siglas en inglés), la hipertensión arterial es una enfermedad crónico degenerativa, que se define como la elevación crónica de la presión arterial sistémica mayor de 130 mmHg para presión sistólica (PAS) y mayor de 80 mmHg para presión diastólica (PAD) (Whelton *et al*., 2017). En el Cuadro 1 muestra la clasificación de la presión arterial en adultos.

Cuadro 1. Clasificación de la presión arterial (PA) en adultos

PA categoría	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Normal	<120	<80
Elevada	120-129	<80
Hipertensión		
Etapa 1	130–139	80–89
Etapa 2	≥140	≥90

Fuente: Whelton *et al*., 2017. Presión arterial sistólica: PAS; Presión arterial diastólica: PAD

La hipertensión arterial es considerada como un asesino silencioso ya que; por lo general, no presenta síntomas. Además, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, provoca daño crónico al sistema cardiovascular e insuficiencia cerebrovascular (OMS, 2019). La hipertensión descontrolada puede provocar infarto de miocardio, ensanchamiento del corazón y; a largo plazo, insuficiencia cardiaca (OMS, 2013). Por otro lado, el aumento de la presión sanguínea causa daño endotelial, haciendo más susceptible la infiltración de lipoproteínas LDL y VLDL en el subendotelio. Además, hay un aumento de estrés oxidativo e inflamación, lo cual promueve la aparición de aterosclerosis (Tuefel *et al*., 2018). La hipertensión arterial también puede conducir a insuficiencia renal, ceguera, ruptura de vasos sanguíneos, disfunción sexual y

deterioro cognitivo (OMS, 2013; AHA, 2020). Además, esta enfermedad se encuentra relacionada con casos de hipercolesterolemia, diabetes y obesidad abdominal, lo que agrava la situación del paciente (Ashraf *et al*., 2018).

Existen diversos factores de riesgo que promueven el desarrollo de hipertensión, entre ellos algunos son modificables como la dieta (alto consumo de sodio, grasas saturadas, grasas trans, ingesta insuficiente de frutas y verduras), y hábitos cotidianos (inactividad física, el tabaquismo, el alcoholismo y el sobrepeso u obesidad) (OMS, 2013). Por otro lado, otros factores de riesgo no son modificables, como los antecedentes familiares de presión arterial alta, raza/etnia, envejecimiento, sexo (masculino), enfermedades renales crónicas, apnea obstructiva del sueño, así como, el estado socioeconómico y el estrés psicosocial (AHA, 2017).

2.3. Papel del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona en la Regulación de la Presión Arterial

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Figura 1), es un complejo sistema enzimático que tiene un papel fundamental en la regulación de la presión arterial, ya que, ayuda a regular y mantener la estabilidad hemodinámica del cuerpo humano a través del balance de agua y electrolitos, y con ello, la regulación de la presión arterial (Atlas, 2008). Este sistema comienza con la liberación de renina en respuesta a una disminución de la presión de perfusión renal. Esta es una enzima proteasa producida principalmente en el aparato yuxtaglomerular del riñón. La renina, emplea el angiotensinógeno (sintetizado principalmente en el hígado) como su sustrato para la producción de angiotensina I. La angiotensina I es una hormona no activa formada por 10 aminoácidos. Posteriormente, se libera la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual, es producida principalmente por el epitelio pulmonar y los riñones, esta enzima es una zinc metalopeptidasa expopeptidasa, que actúa catalizando la angiotensina I, eliminando dos aminoácidos terminales (histidina-leucina), produciendo la angiotensina II, hormona activa formada por 8 aminoácidos, la cual, es un potente vasoconstrictor (Atlas, 2008).

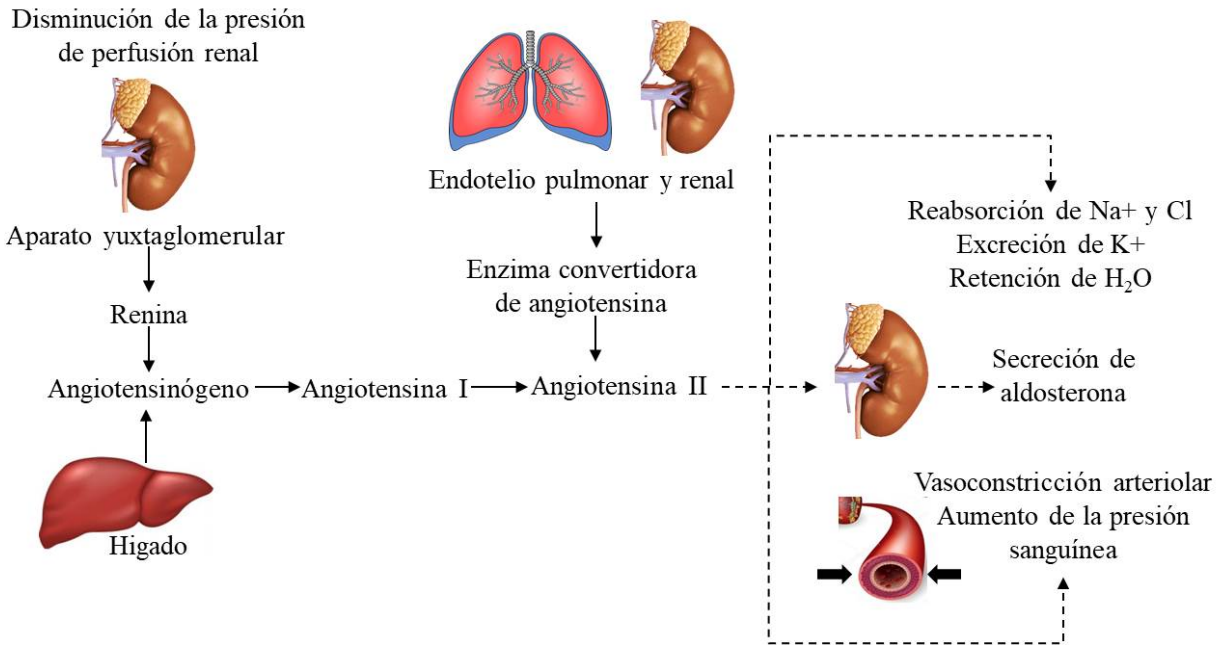


Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona. Adaptado de Atlas, 2008.

La angiotensina II contrae el músculo liso vascular, aumentando de esta forma la tensión arterial y reduciendo el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtrado glomerular. También favorece la liberación de aldosterona por la glándula suprarrenal. La aldosterona aumenta la absorción de sodio, cloruro, aumentando también la retención de agua por parte de los túbulos renales. Por otro lado, la hipófisis libera a la hormona antidiurética, la cual promueve la absorción de agua. Todo esto aumenta el volumen del líquido extracelular, provocando el aumento de la presión arterial, una vasoconstricción constante lo que conllevara a hipertrofia muscular cardiaca y vascular, entre otras alteraciones. Diversos estudios realizados para el tratamiento de la hipertensión se basan en el control del sistema renina-angiotensina-aldosterona, mediante inhibidores de la ECA, inhibidores directos de renina, β-bloqueadores, diuréticos y bloqueadores de los receptores de angiotensina-II (Carey y Siragy 2003; Ma *et al*., 2010; Odentti y Cushman, 1982; Paul *et al*., 2006; Whelton, *et al*., 2017).

2.4. Hipercolesterolémia Como Factor Asociado a las ECV

La hipercolesterolemia se define como, la elevación del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL), con un colesterol total >200 mg/dL (IMSS, 2016). Siendo las LDL y VLDL las principales lipoproteínas aterógenicas en plasma, y las partículas de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) las partículas antiaterógenicas (Martínez-Triguero *et al*., 2012). Las concentraciones elevadas de colesterol en plasma sanguíneo, está asociado con un mayor riesgo para enfermedades cardiovasculares en humanos (OMS, 2017). En el Cuadro 2. Se presentan los niveles de colesterol recomendados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS, 2016).

Cuadro 2. Niveles de colesterol recomendados.

Riesgo cardiovascular	Niveles de colesterol (mg/dL)
Muy alto	C-LDL < 70
Alto	C-LDL < 100
Riesgo bajo o intermedio	C-LDL < 110
Hombres	C-HDL >40
Mujeres	C-HDL>45

C-LDL= Colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad.
C-HDL= Colesterol transportado por lipoproteínas de alta densidad.

Fuente: IMSS, 2016.

El colesterol es una molécula importante dentro del organismo; es un componente importante de las membranas celulares y es precursor de diferentes compuestos, como hormonas esteroideas, sales biliares y vitaminas liposolubles. Sin embargo, la regulación alterada de la síntesis, absorción y excreción de colesterol conlleva a la hipercolesterolemia contribuyendo al desarrollo de ateroesclerosis (Zárate *et al*., 2016). En este sentido, la dislipidemia aterogénica se caracteriza por la elevación de la concentración de triglicéridos, niveles altos de colesterol total, elevación del colesterol LDL y VLDL, y una disminución en los niveles de colesterol HDL (triglicéridos > 204 mg/dl y colesterol HDL < 34 mg/dl). Esta triada lipídica tiene una elevada capacidad aterogénica (Núñez-Cortéz *et al*., 2014). Por otro lado, la lipoproteína A está considerada también como un factor de riesgo cardiovascular al estar compuesta por elementos del metabolismo lipídico y de la

coagulación; su depósito en las placas de ateroma promueve la inflamación y la oxidación; por otra parte, interfiere con el sistema de coagulación, inhibiendo la fibrinólisis y favoreciendo la trombosis (Díaz-Aragón *et al*., 2018; Grundy, 1995; Martínez-Triguero *et al*., 2012; Upadhyay, 2015). La prevención y el tratamiento de todas las formas de dislipidemia son tareas fundamentales que evitan o retrasan el desarrollo de la aterosclerosis y de otras complicaciones del trastorno de los lípidos (Díaz-Aragón *et al*., 2018).

2.5. Aterosclerosis y Trombosis Como Factores de Riesgo Asociado a las ECV

El daño endotelial causado por la hipertensión y por la infiltración de lipoproteínas LDL y VLDL en el subendotelio debido a la hipercolesterolemia, así como, el aumento de estrés oxidativo e inflamación, promueven el desarrollo de la placa ateroesclerótica (Martínez-Triguero *et al*., 2012; Teufel *et al*., 2018). La ateroesclerosis es una enfermedad que inicia por la infiltración de lipoproteínas LDL en el endotelio arterial. Las LDL al oxidarse o alterarse, activan diversos componentes del sistema inmune innato, entre ellos a los macrófagos. Las LDL alteradas son reconocidas por receptores recolectores que se expresan sobre macrófagos. Estos receptores, median la captación de LDL oxidado hacia macrófagos y formación de células espumosas. Las células espumosas forman estrías grasas en las arterias, que con el paso del tiempo desencadenarán la ateroesclerosis (Douglas y Channon 2014; Moriya, 2018; Mitrovic, 2010). La ateroesclerosis se caracteriza por un engrosamiento fibroso localizado en la pared arterial, relacionado con placas infiltradas por lípidos que posteriormente se calcifican. Las placas antiguas están propensas a ulceración y rotura, lo que desencadena la formación de trombos que obstruyen el flujo. En consecuencia, la aterosclerosis conduce a insuficiencia renal y dilataciones (aneurismas), e incluso rotura de la aorta y otras arterias de gran calibre. También, da pie a enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, debido a la formación de coágulos intravasculares en el sitio de las placas, conocido como trombosis (Badimon y Vilahur 2008; Mitrovic, 2010).

Los trombos arteriales se forman sobre todo en vasos que tienen una placa ateroesclerótica o que están expuestas a una zona de turbulencia importante. La erosión o rotura de la placa aterosclerótica permite la exposición de su interior a la sangre. El interior de la placa es protrombótico debido a la

presencia del factor tisular (FT), una glucoproteína de bajo peso molecular que inicia la cascada extrínseca de la coagulación. A su vez, las plaquetas también son activadas, lo que provoca su adhesión y agregación en la superficie dañada, lo que conlleva a la formación de un trombo (Dominiczak 2011; Douglas y Channon 2014).

Debido a la lesión vascular, se activan los factores de coagulación, para dar inicio al proceso de coagulación. La cascada de coagulación (Figura 2) está integrada por dos vías, la vía extrínseca, la cual, inicia por la exposición de la sangre fluyente al FT, liberado desde el tejido subendotelial; y la vía intrínseca, que tiene un papel importante en la generación de la trombina y fibrina. Estas dos vías convergen en la vía común la cual, está determinada por la generación del factor X (FX) que tiene como función la activación y liberación de la enzima trombina (FIIa) a partir de la protrombina. La enzima trombina cataliza la transformación de fibrinógeno, liberando monómeros de fibrina que polimerizan formando una red de fibrina y plaquetas dando lugar al trombo (Lowe, 2013; Versteeg *et al*., 2013).

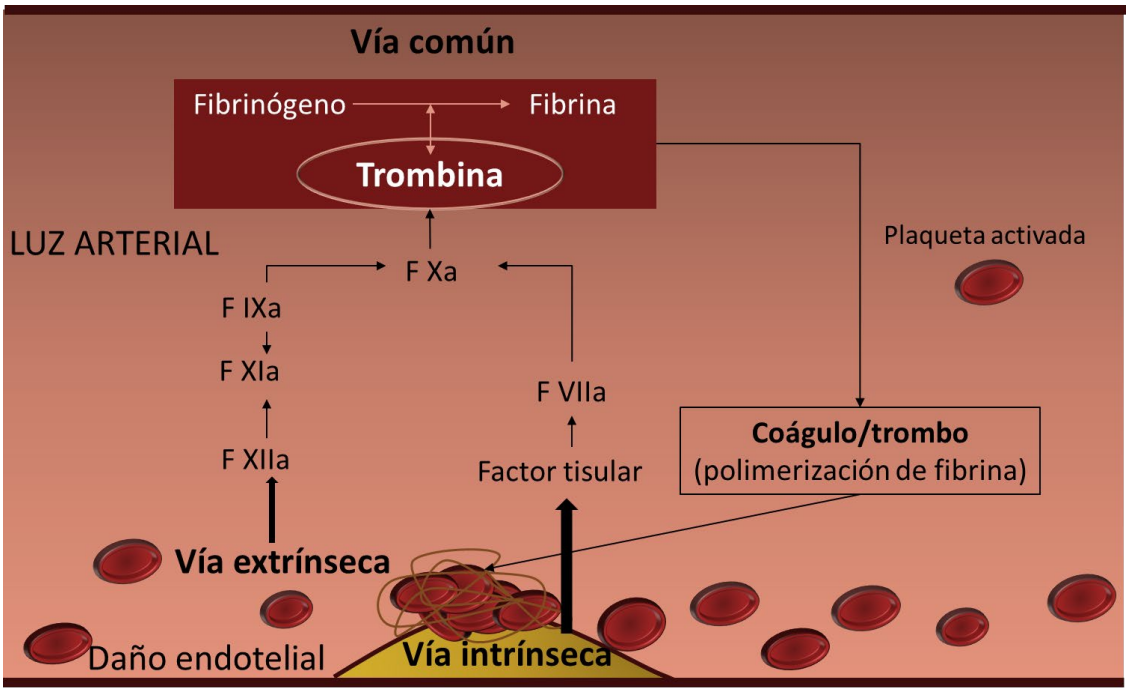


Figura 2. Representación simplificada de la cascada de coagulación sanguínea mediante las vías de activación extrínseca e intrínseca. Adaptado de Mackman *et al*., 2007.

La trombosis es un proceso patológico en el que está implicada la coagulación sanguínea y agregación plaquetaria, lo que conduce a la oclusión vascular y daño tisular. Esto provoca que los tejidos y células irrigados por ese vaso sufran isquemia. Si la isquemia se prolonga, se produce una lesión celular irreversible (necrosis) la cual puede afectar a cualquier órgano (Gaertner y Massberg 2016; Majluf-Cruza y Espinosa-Larrañaga, 2007).

2.6. Estrategias Empleadas en el Control de las ECV y sus Factores de Riesgo

Para las personas con ECV o con alto riesgo cardiovascular (debido a la presencia de uno o más factores de riesgo, como hipertensión arterial, diabetes, hiperlipidemia), es fundamental la detección precoz y el tratamiento oportuno, por medio de servicios de orientación o la administración de fármacos, según corresponda (OMS, 2017). En este sentido, de acuerdo a la guía de prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares ACC y de la AHA de Estados Unidos de América, es necesario un enfoque integral en el paciente centrado en todos los aspectos de hábitos de estilo de vida, así como en el riesgo de ECV a futuro que presente el paciente, de este modo es posible decidir si es necesaria la implementación de farmacoterapia. Sólo cuando el riesgo de la persona con ECV es suficientemente alto, se considera el tratamiento con medicamentos. La toma de decisiones para el tratamiento de las ECV debe ser compartida, involucrando tanto a médicos como a los pacientes. Así, los tratamientos deben de ser personalizados, basándose en el riesgo que presente el paciente a ECV y enfocándose en los hábitos de estilo de vida, objetivos y terapias del paciente. Es por ello que la promoción de un estilo de vida saludable durante toda la vida es la principal manera de prevenir las ECV, entre ellas, ateroesclerosis vascular, insuficiencia cardiaca y fibrilación auricular (Arnett *et al*., 2019).

2.6.1. Tratamientos Farmacológicos Empleados en el Control de Hipertensión, Hipercolesterolemia y Trombosis

La hipertensión ha sido tratada con diversos medicamentos sintéticos. Entre los más comunes en el mercado se encuentran los inhibidores de la ECA, los inhibidores directos de renina, los β-bloqueadores, los diuréticos y los bloqueadores de los receptores de angiotensina-II, los cuales han sido eficaces y bien tolerados en los pacientes. Sin embargo, estos pueden causar diferentes efectos secundarios; tales como, tos, salpullido, vértigo o mareo leve, náuseas o vómito, dolor de cabeza, insuficiencia renal, entre otros (Torruco-Uco *et al*., 2008; Whelton, *et al*., 2017).

En cuanto a la terapia farmacológica para hipercolesterolemia, algunos de los medicamentos empleados en la actualidad son: las estatinas las cuales son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (HMG CoA reductasa), siendo estas el tratamiento de primera línea para la prevención primaria de ECV en pacientes con niveles elevados de colesterol LDL (190 mg/dL) (Arnett *et al*., 2019). También se encuentran los bloqueadores de la absorción del colesterol (ezetimiba), secuestradores de ácidos biliares (colestiramina), fibratos, entre otros. Sin embargo, el uso prolongado de estos puede provocar efectos secundarios; tales como, náuseas, alteraciones dermatológicas, estreñimiento, dolor abdominal, pirosis, flatulencia, deficiencias de vitaminas liposobles (A, D, E y K), entre otros (Taboada y Jiménez 2005; Corral y Schreier, 2014).

Por otro lado, para el tratamiento de la trombosis se emplean diversos fármacos, tales como los antiplaquetarios orales (aspirina o clopidogrel), anticoagulantes como la heparina, agentes fribrinolíticos y antitrombóticos, los cuales destruyen los coágulos ya formados. Estos han mostrado ser efectivos en la reducción del riesgo de padecer ECV. Por otro lado, también, se emplean técnicas quirúrgicas, como la aginoplastia mediante catéteres especiales para eliminar o comprimir estos coágulos arteriales (Giménez, 2003; Lowe, 2013).

2.6.2. Tratamientos No Farmacológicos Empleados en el Control de las ECV y sus Factores de Riesgo

La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo comportamentales, como el consumo de tabaco, los malos hábitos alimenticios, la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol, utilizando estrategias que abarquen a toda la población (OMS, 2017). Dentro de los tratamientos no farmacológicos para combatir y prevenir las ECV, se hace énfasis en llevar un estilo de vida saludable toda la vida. Para ello, es necesaria una dieta saludable y equilibrada. En este sentido, algunas de las recomendaciones propuestas en la guía de prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares del ACC y la AHA son: aumentar el consumo de verduras, frutas, legumbres, frutos secos, granos enteros y pescado; sustituir las grasas saturadas por grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas, evitar el consumo de grasas trans, reducir el consumo de colesterol y sodio; reducir al mínimo la ingesta de carnes procesadas, carbohidratos refinados y bebidas azucaradas. Por otro lado es importante promover el mantenimiento de un peso adecuado con un índice de masa corporal (IMC) ≤ 24.9. También es importante realizar actividad física, los adultos deben realizar al menos 150 min por semana de actividad física intensidad moderada o 75 min por semana de actividad física aeróbica de intensidad vigorosa para reducir el riesgo de ECV (Arnett *et al*, 2019).

.

2.7. Alimentos Funcionales como Estrategia para el Tratamiento de ECV

En las últimas décadas, debido al desarrollo económico y las mayores expectativas de vida de los humanos, han surgido nuevas preocupaciones en cuanto a la salud y la nutrición de la población. Estas modificaciones han estimulado el desarrollo de alimentos funcionales en muchos países del mundo, principalmente en los de mayor desarrollo (Valenzuela *et al*., 2014). Frente a esta situación la industria alimentaria y farmacéutica, han trabajado en conjunto para promover una alimentación saludable, mediante el desarrollo de alimentos funcionales los cuales al ser consumidos en forma

regular pueden contribuir a la prevención y/o tratamiento de determinadas enfermedades (Valenzuela *et al*., 2014).

El concepto de alimentos funcionales surgió en Japón en la década de los ochentas con el fin de mantener y mejorar el estado de salud de las personas y prevenir enfermedades crónicas no transmisibles (cardiovasculares, diabetes, hipertensión, osteoporosis, cáncer y obesidad) mediante un enfoque que implica una dieta equilibrada y el consumo de alimentos saludables (Yamada *et al*., 2008). Un alimento funcional, puede ser aquel que se le ha añadido componente promotor de la salud; se le ha eliminado un componente por razones específicas de salud; o se ha modificado por medios tecnológicos o químicos para proporcionar un beneficio específico a la salud (Lagouri, 2018). Según el Instituto de Ciencia de Alimentos Funcionales de Europa (Functional foods science in Europe FUFOSE, 1999), los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos benéficos a la salud, además de contar con las características propias de un alimento, en cuanto a su valor nutricional y forma de consumo (Carou, 2008). Recientemente, el Centro de Alimentos Funcionales (FFC, por sus siglas en inglés), introdujo una nueva definición para alimentos funcionales: "Alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos; que en cantidades definidas, no tóxicas, proporcionen un beneficio a la salud clínicamente demostrado y documentado para la prevención manejo o tratamiento de alguna enfermedad (Martirosyan y Singh 2015; Lagouri, 2018).

Se ha reportado que algunos alimentos funcionales, ya sea de origen animal o vegetal, contienen componentes fisiológicamente activos, los cuales, se han comercializado con la afirmación de su capacidad para reducir el riesgo de ECV, centrándose principalmente en sus factores de riesgo (hiperlipidemia, diabetes, síndrome metabólico, obesidad/sobrepeso, niveles elevados de lipoproteína A, colesterol (LDL) y niveles elevados de marcadores inflamatorios). Los cuales ejercen efectos cardioprotectores en la mejora del perfil lipídico en sangre, el control de la hipertensión, la función endotelial, la agregación plaquetaria, y acciones antioxidantes (Alissa y Ferns 2012; Asgary *et al*., 2018). Diversos estudios indican que la fibra de frutas, los granos enteros, las nueces, las semillas, los alimentos de origen marino, el café, el té y el chocolate oscuro tienen potencial efecto cardioprotector en humanos (Alissa y Ferns 2012; Asgary *et al*., 2018). De igual manera, los productos lácteos fermentados son una herramienta prometedora para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, esto debido a que contienen

péptidos bioactivos los cuales ejercen diversos efectos benéficos al sistema cardiovascular, tales como, antihipertensivo, antioxidante, antiinflamatorio, antitrombótico e hipocolesterolémico (Companys *et al*. 2020; Martínez-Sáncheza *et al*., 2020; Rendón-Rosales *et al*., 2019).

2.8. Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos son cadenas de aminoácidos que se encuentran encriptados e inactivos en la proteína nativa. Dichos compuestos, al ser liberados por medio de la hidrólisis química o enzimática, ejercen determinadas actividades biológicas tales como, inhibición de la enzima convertidora de angiotensina, antioxidante, antimicrobiana, hipoglucémica, hipocolesterolémica, entre otras, lo que sugiere su uso potencial como nutracéuticos e ingredientes de alimentos funcionales para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedades (Mulero *et al*., 2011). Estos péptidos con diferentes secuencias y longitudes, son de bajo peso molecular, generalmente, están compuestos por 3 a 20 aminoácidos. Sin embargo, debe considerarse que estos péptidos al momento de ser ingeridos, pueden ser hidrolizados durante el proceso de digestión gastrointestinal y sufrir modificaciones en su secuencia peptídica lo cual, puede afectar o incluso mejorar su bioactividad (Aspri *et al*., 2018; Rendón-Rosales *et al*., 2019). Por lo anterior, es importante que puedan resistir las condiciones gastrointestinales para que sean absorbidos en su forma activa, a través de la barrera intestinal para llegar al flujo sanguíneo y ejercer su acción fisiológica (Toldrá *et al*., 2018). Diferentes estudios han evidenciado la presencia de péptidos bioactivos en diferentes matrices alimentarias, y la más estudiadas son las de origen lácteo (Ebringer *et al*., 2008).

Las proteínas de la leche poseen una amplia gama de actividades nutricionales, funcionales y biológicas, debido a que son una fuente equilibrada de aminoácidos de alto valor biológico, contribuyen a la consistencia y propiedades sensoriales de varios productos lácteos. Algunas de las proteínas de la leche poseen propiedades biológicas específicas que las convierten en potencial alimento benéfico para la salud. Estas propiedades son atribuidas tanto las proteínas nativas como a los péptidos encriptados en ellas. Actualmente, se considera que las proteínas de la leche son de las principales fuentes de péptidos bioactivos. Estos pueden ser liberados mediante la fermentación

de la leche, con enzimas proteolíticas y durante el proceso de digestión gastrointestinal (Korhonen y Pihlanto, 2007; Hafeez *et al*., 2014). Diversos estudios han reportado diferentes actividades biológicas de péptidos de origen lácteo (Ebringer *et al*., 2008) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas

Función	**Fragmento y origen**	**Producción**	**Referencia**
Inhibición de la ECA	IPP β-CN	LF por *Lb. helveticus y S. cerevisiae*	Nakamura *et al*., 1995
Inhibición de la ECA	VPP β-CN	LF por *Lb. helveticus y S. cerevisiae*	Nakamura *et al*., 1995
Inhibición de la ECA	HPHPHLSFMAIPP κ-CN (F 98–110) SLPQNIPPL β-CN (F 69–77)	LF por *Lc. lactis* NRRL B-50571	Rodríguez-Figueroa *et al*., 2012
Inhibición de la ECA y trombina	YQEPVLGPVRGPFPIIV β-CN (F 193-209)	Medio de caseína bovina fermentada por *Lb. casei* Shirota	Rojas-Ronquillo *et al*., 2012
Inhibición de trombina	FQSEEQQQQTEDELQDK β-CN (F 33-48)	Hidrólisis enzimática	Tu *et al*., 2017
Antioxidante	VLSLSQSKVLPVPQK β-CN (F 62-176)	LF por *Bifidobacterium longum* KACC91563	Chang *et al*., 2013
Hipocolesterolémico	IIAEK β-Lg (F 71-75)	Hidrólisis enzimática	Nagaoka *et al*., 2001
Antimicrobiano	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVR RAFA LFcin B (F 17-42)	Hidrólisis enzimática	Wakabayashi *et al*. 2003

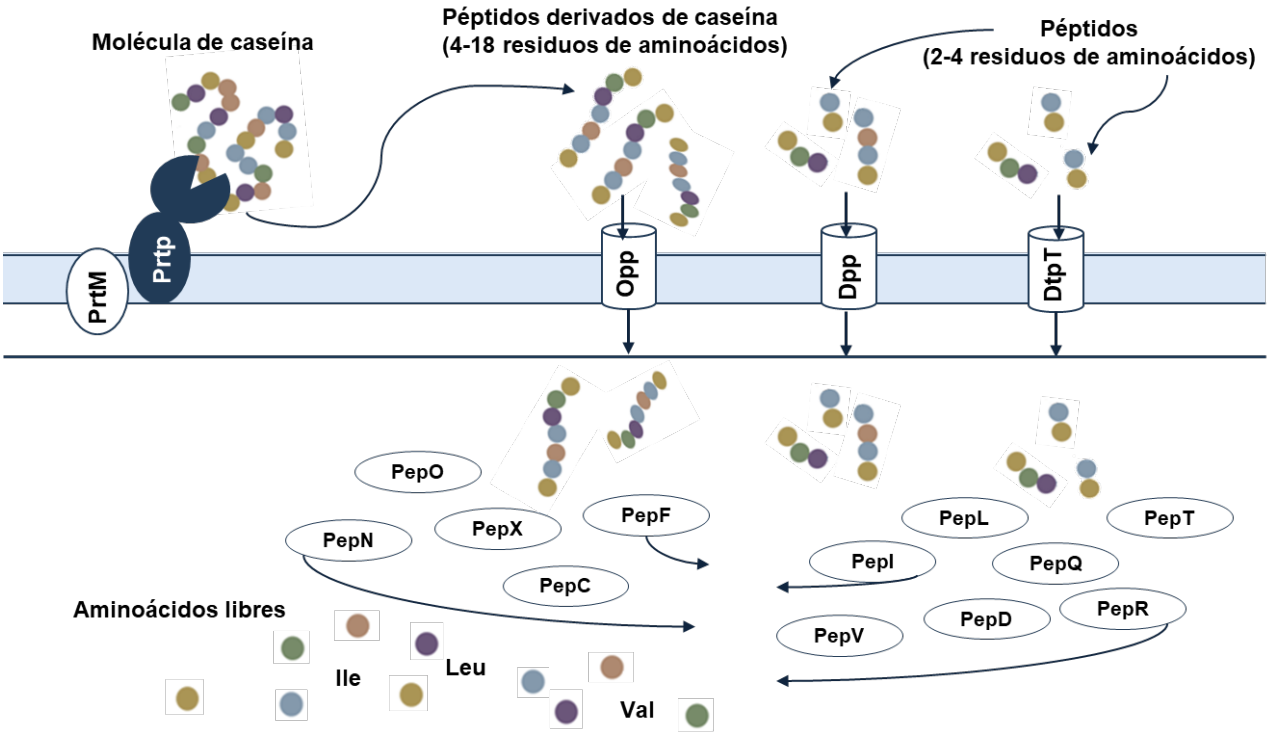
Beta-caseína: β-CN; Kappa-caseína: κ-CN; Beta-lactoglobulina β-Lg; Lactoferricina-B: LFcin B

2.9. Producción de Péptidos Bioactivos por Medio de Fermentación Bacteriana

La fermentación bacteriana es un proceso complejo que varía según las diferentes especies bacterianas y la matriz alimentaria fermentada. A través de los años, se ha utilizado la fermentación bacteriana para la preservación de alimentos; sin embargo, su potencial va más allá debido a que

ha sido asociada con diversos beneficios para la salud (Hill *et al*., 2017). La fermentación láctea en la actualidad se basa en cultivos iniciadores definidos, los cuales le dan las características deseables a los productos lácteos fermentados. La selección de los cultivos iniciadores depende de fenotipos específicos que benefician al producto al garantizar su vida útil, seguridad alimentaria, textura y sabor (Shiby y Mishra 2013). Las bacterias ácido lácticas (BAL), pueden producir metabolitos durante el proceso fermentativo, tales como, bacteriocinas, aminas biogénicas, exopolisacáridos, y péptidos (los cuales son liberados por el sistema proteolítico de BAL). El potencial para la prevención e incluso tratamiento de enfermedades a través de la fermentación de alimentos, ha despertado un gran interés en la industria alimentaria así como, en el ámbito de la salud (Hill *et al*., 2017).

El sistema proteolítico de las BAL (Figura 3), hidroliza las proteínas lácteas, para la producción de péptidos y liberación de aminoácidos esenciales los cuales, son fundamentales para el crecimiento bacteriano (Savijoki *et al*., 2006; Liu *et al*., 2010). De acuerdo a su función, los componentes estructurales del sistema proteolítico de las BAL pueden ser divididos en tres grandes grupos: 1) proteinasas: son las encargadas del rompimiento inicial de las proteínas a péptidos; 2) peptidasas: degradan los péptidos generados por acción de las proteinasas; y 3) sistema de transporte: trasladan los péptidos producidos hacia la membrana citoplasmática (Kunji *et al*., 1996). Este sistema proteolítico consiste en la conversión de péptidos a aminoácidos libres y la posterior utilización de los aminoácidos, siendo una actividad metabólica central en las BAL. Los aminoácidos formados por este sistema pueden utilizarse para procesos como la síntesis de proteínas y generación de energía metabólica (Christensen *et al*., 1999).



Prtp: proteinasa membrana celular; Opp: oligopéptido permeasa; DtpT: transportador iónico para di- y tripéptidos; Dpp: transportador de péptidos que contienen de 2 a 9 aminoácidos residuos; Peptidasas intracelulares: PepR y PepF endopeptidasas; PepN, PepC, PepP aminopeptidasas generales; PepX aminopeptidasa; PepT tripeptidasa; PepQ prolidasa; PepR prolinasa; PepI prolina iminopeptidasa; PepD y PepV dipeptidasa D y V.
Figura 3. Sistema proteolítico de bacterias ácido lácticas Adaptado de Savijoki *et al*., 2006.

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

Los productos lácteos fermentados son una herramienta prometedora para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. En un estudio de cohorte prospectivo realizado por Companys *et al*. (2020), reportaron que la leche fermentada se asoció con una reducción del 4% en el riesgo de apoplejía, cardiopatía isquémica y mortalidad cardiovascular, indicando que su consumo está asociado con la reducción del riesgo cardiovascular. En los últimos años, diversos estudios han reportado que leches fermentadas contienen péptidos bioactivos los cuales ejercen efectos benéficos al sistema cardiovascular, tales como, antihipertensivo, antioxidante, antiinflamatorio, antitrombótico e hipocolesterolémico (Martínez-Sáncheza *et al*., 2020; Rendón-

Rosales *et al*., 2019).

En el efecto antihipertensivo de leches fermentadas, se involucran diversos mecanismos tales como la inhibición de la ECA, la cual es clave en la regulación de la presión arterial; la producción de óxido nítrico y la reducción del estrés oxidativo, lo cual ha sido probado en diversos estudios *in vivo* (Rodríguez-figueroa *et al*., 2013a,b; Beltrán-Barrientos *et al*., 2018b) y clínicos (Beltrán-Barrientos *et al*., 2018a). Por otro lado la actividad antitrombótica se ha evaluado en modelos *in vitro* donde se han identificado péptidos con actividad inhibidora de la enzima trombina la cual, actúa en la cascada de coagulación catalizando al fibrinógeno para la producción de fibrina insoluble contribuyendo en la formación de trombos (Rendón-Rosales *et al*., 2019; Rojas-Ronquillo *et al*., 2012).

2.10.1. Leches Fermentadas: Fuente de Péptidos Bioactivos Inhibidores de la ECA

Las leches fermentadas con efecto antihipertensivo han sido estudiadas a lo largo de los años mediante estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos. Su efecto ha sido atribuido en la mayoría de los casos a péptidos bioactivos derivados del proceso fermentativo de la leche. Estas leches fermentadas han mostrado resultados equiparables a los obtenidos con inhibidores sintéticos de la ECA, lo cual sugiere que pueden considerarse como posibles agentes hipotensores al formar parte de una dieta diaria (Beltrán-Barrientos *et al*., 2016).

Los péptidos inhibidores de la ECA actúan ayudando a regular la presión sanguínea mediante el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fitz-Gerald *et al*., 2004). Diversos estudios con péptidos inhibidores de la ECA mostraron que la unión al sitio activo de la enzima está influenciada por la secuencia terminal de los tripéptidos terminales del sustrato. Se ha reportado que la ECA tiene afinidad hacia aminoácidos hidrofóbicos en las últimas tres posiciones carboxilo terminal, con residuos de prolina, lisina o arginina (Toldrá *et al*., 2018). Por otro lado, los péptidos que contienen prolina en su estructura, son los que han presentado mayor potencial efecto inhibidor de la ECA, debido a que son resistentes a la hidrólisis digestiva (Maeno *et al*., 1996). En cuanto a la interacción estructura-actividad del sitio activo de la ECA con los sustratos o inhibidores, Ondetti y Cushman

(1977) proponen un modelo (figura 4) donde los residuos del tripéptido carboxilo terminal juegan un rol significativo en la unión competitiva al sitio activo de la ECA.

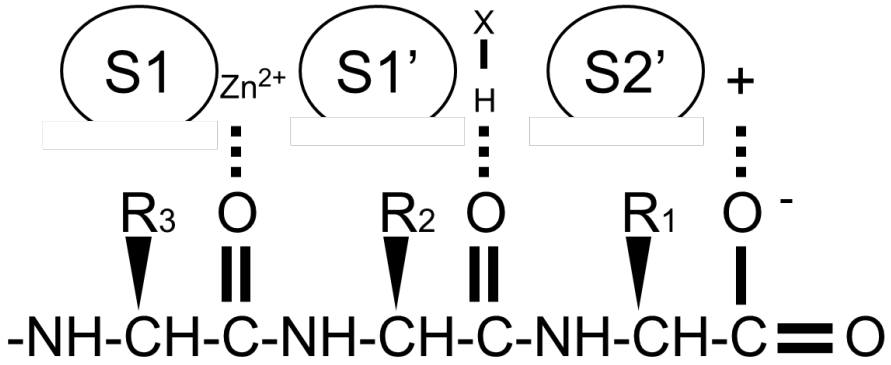


Figura 4. Modelo de interacción del centro activo de la ECA con los sustratos o inhibidores competitivos (Ondetti y Cushman, 1977).

El centro activo de la ECA está constituido por tres subunidades que pueden interaccionar potencialmente con los aminoácidos de los sustratos o inhibidores de la enzima. El primer subsitio presenta un grupo con carga positiva, el cual forma un electrovalente con el grupo carboxilo terminal del péptido. El segundo subsitio, interacciona probablemente por un puente de hidrógeno con el enlace peptídico del aminoácido carboxilo terminal. Y el tercer subsitio, contiene un átomo de zinc, es capaz de polarizar el grupo carboxilo del enlace peptídico entre el antepenúltimo y penúltimo aminoácido del péptido, lo que lo hace más propenso a hidrólisis (Ondetti y Cushman, 1977).

En diversos estudios se ha reportado el efecto antihipertensivo de leches fermentadas. Rodríguez-Figueroa *et al*. (2012) evaluaron el efecto antihipertensivo de las fracciones peptídicas en leches fermentadas *Lactococus lactis* NRRL B-50571 y NRRL B-50572. De las fracciones obtenidas, se evaluó la actividad inhibidora de la ECA (IECA) *in vitro* y se encontraron que los valores más bajos de IC_{50} fueron para *Lc. lactis* NRRL B-50571 fracción 1 (0.034 µg/mL) y *Lc. lactis* NRRL B-50572 fracción 1 (0.041 µg/mL). Además identificaron las secuencias peptídicas HPHPHLSFMAIPP derivada de la κ-CN (f98–110) y SLPQNIPPL derivada de la β-CN (f69–77) de leches fermentadas por *Lc. lactis* NRRL B-50571; las cuales se encuentran encriptados el lactotripéptido IPP con efecto hipotensivo. Posteriormente, Rodríguez-Figueroa *et al*. (2013),

evaluaron el efecto antihipertensivo e hipolipidémico de estas mismas leches en ratas espontáneamente hipertensas (REH). Se administraron ambas leches *ad libitum* en un periodo de 4 semanas. Los resultados mostraron que ambas leches fermentadas redujeron la presión arterial, además se observó una mejoría en el perfil lipídico de las REH. En el caso de la leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571, su efecto máximo se registró en la segunda y tercera semana de administración y no se observaron diferencias significativas contra el fármaco Captopril®.

Posteriormente, se realizó un estudio clínico, aleatorizado, controlado, doble ciego por Beltrán-Barrientos *et al*. (2018a), donde se evaluó el efecto antihipertensivo asociado al consumo de leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571 en un grupo de sujetos pre-hipertensos. Los resultados de este estudio reportaron que el grupo tratado con la leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571 mejoró los niveles de presión arterial (con una disminución de 13 mmHg respecto al valor inicial), el perfil de colesterol y triglicéridos en personas con pre-hipertensión. Además, se observó que los valores de presión arterial se mantuvieron por una semana, aumentando paulatinamente. Por lo tanto, el consumo diario de dicha leche fermentada, podría ser considerado como un alimento potencialmente funcional con beneficios para la salud cardiaca.

En un estudio clínico con sujetos hipertensos, Tuomilehto *et al*. (2004), evaluaron el efecto antihipertensivo de leche fermentada por *Lactobacillus helveticus* la cual contenía 2.4-2.7 mg de Ile-Pro-Pro y 2.4-2.7 mg de Val-Pro-Pro por cada 150 mL. Los resultados mostraron que el grupo administrado con leche fermentada presentaron una disminución de PAS DE 3 ± 16 mmHg en comparación con el grupo placebo, al cual se les administró leche acidificada. Concluyendo que los tripéptidos presentes en la leche fermentada contribuyeron a la disminución de la presión arterial.

Chen *et al*. (2018), evaluaron en un estudio *in vitro* la IECA de las fracciones < 10, 5 y 1 kDa de leche de cabra fermentada por *Lactobacillus plantarum* 69, y encontraron que la fracción peptídica < 1 kDa mostró una alta IECA con un 87% de inhibición y un valor de IC_{50} de 320.11 μg/mL. Posteriormente, evaluaron su capacidad inhibidora después de ser sometido a un proceso de digestión gastrointestinal simulada, y donde el porcentaje de inhibición se mantuvo en 59.89%. Concluyendo que la leche de cabra fermentada por *Lactobacillus plantarum* 69 podría ser utilizada en futuras aplicaciones industriales y en el desarrollo de alimentos funcionales debido a sus efectos promotores de la salud, especialmente en el control de la presión arterial.

En un estudio realizado por Aspri *et al*. (2018), evaluaron la IECA, antimicrobiana y antioxidante de leche de burra fermentada por 48 h con BAL específicas aisladas previamente de leche de burra cruda después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. En sus resultados encontraron que todas las LF por BAL específicas presentaron IECA con IC_{50} en un rango de 2.71-0.04 mg/mL, donde la LF por la cepa de *Lactobacillus casei* DM214 mostró alta IECA con un IC_{50} de 0.04 mg/mL. Mientras que las LF por *Enteroccocus faecium* DM 33 presentó la mayor actividad antioxidante y antimicrobiana. Reportando que los resultados de las bioactividades fueron cepa dependiente. Por otro lado, mencionan que el proceso de digestión gastrointestinal simulada aumento significativamente los resultados en las bioactividades. Los autores concluyen que la leche de burra fermentada por BAL específicas presenta potencial como alimento funcional debido a su actividad inhibidora de la ECA, antioxidante y/o antimicrobiano (Aspri *et al*., 2018).

Rubak *et al*. (2020), evaluaron la IECA de leches fermentadas por 10 cepas específicas de BAL. Los resultados mostraron que todas las LF fueron capaces de producir péptidos con IECA los cuales presentaron un rango de inhibición del 22 a 57%. Las leches fermentadas por *Lactobacillus delbrueckii* BD7, *Lactococcus lactis* BD17, y *Lactobacillus kefiri* YK4 y JK17 mostraron un porcentaje de inhibición arriba del 50%. Donde el mayor valor de IECA fue regitrado por las leches fermentadas con *Lb. kefiri* YK4 (IC_{50} 0.261 mg/mL) y *Lb*. kefiri JK17 (IC_{50} 0.308 mg/mL). Se encontró que un 95% de los péptidos producidos fueron derivados de la caseína. Además se identificaron un total de 30 péptidos, los cuales fueron reconocidos con una base de datos de péptidos con IECA reportados en la literatura (similitud de secuencia: 100%). Los autores concluyenron que *LB. kefiri* YK4 y JK17 son BAL con potencial uso como cultivos iniciadores en leche fermentada para la producción de péptidos bioactivos con IECA (Rubak *et al*., 2020).

2.10.2. Leches Fermentadas: Fuente Péptidos Bioactivos Inhibidores de Trombina

Durante la patología de la trombosis, se activa la cascada de coagulación debido al daño endotelial. Dicha cascada comienza con la vía intrínseca y vía extrínseca, para llegar al factor x iniciando la vía común que tiene como fin convertir al fibrinógeno en fibrina por medio de la enzima trombina

(Lowe, 2013; Versteeg *et al*., 2013). Es por esto que la inhibición de la enzima trombina es considerada como un tratamiento prometedor en pacientes con trombosis. Por lo cual, se han evaluado diversos compuestos bioactivos con la capacidad de inhibir a la enzima trombina, entre ellos los péptidos bioactivos (Chen *et al*., 2015).

En un estudio realizado por Tu *et al*. (2017), evaluaron *in silico* péptidos derivados de la hidrólisis de caseína con tripsina y se investigó la relación, estructura-actividad de la inhibición de la enzima trombina de los péptidos mediante un estudio de acoplamiento molecular. Los autores resultados reportan la identificación de un total de 35 péptidos nuevos con actividad inhibidora de trombina. Entre ellas, la secuencia peptídica FQSEEQQQQTEDELQDK derivada de la β-caseína (fragmento 33-48), mostró alta inhibición de la enzima trombina y una notable similitud con la secuencia peptídica fragmento 54-65 de la hirudina; la cual es un péptido antitrombótico que se encuentra naturalmente en las glándulas salivales de las sanguijuelas. En cuanto a los resultados reportados de la relación estructura-actividad, se observó que este péptido tenía un dominio objetivo similar a la estructura estéreo de la trombina en comparación con la hirudina. Este dominio pertenece a la estructura parcial del sitio activo de trombina y también se encuentra en el exositio 1 de la enzima. En sus hallazgos demostraron que los péptidos con actividad inhibidora de trombina, se unen alostéricamente al sitio de unión del fibrinógeno y a uno de los dos sitios de reconocimiento del dicho sustrato (Tu *et al*., 2017).

Por otro lado, se han realizado algunos estudios *in vitro* de leches fermentadas con potencial efecto antitrombótico. En este sentido, Rojas-Ronquillo *et al*. (2012), evaluaron *in vitro* el efecto antitrombótico y la inhibición de la ECA de péptidos liberados durante la fermentación de un medio de caseína bovina con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus*. Los datos mostraron que ambas cepas liberaron péptidos inhibidores de la ECA. Incluso, en el medio fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota se encontraron péptidos con actividad inhibidora de la trombina, donde la mayor actividad (80.7% de inhibición), se observó a las 27 h de fermentación. Además, se purificaron los péptidos por HPLC, y se evaluó su resistencia a enzimas digestivas (pepsina y tripsina). Se identificó la secuencia peptídica YQEPVLGPVRGPFPIIV (fragmento 193-209 de β-caseína) la cual presentó la mayor actividad para ambas actividades evaluadas.

En un estudio realizado por Rendón-Rosales *el al*. (2019), se evaluaó *in vitro* el efecto antitrombótico e hipocolesterolémico de leches fermentadas (durante 24 y 48 h de fermentación) por cepas específicas de *Lactococcus lactis* spp., antes y después de ser sometidas a un modelo de

digestión gastrointestinal simulada. Los resultados mostraron que las fracciones < 3 kDa derivadas de la leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50572, después de ser sometida a condiciones de digestión gastrointestinal simulada, presentaron un IC_{50} de 0.17 mg/mL y 0.049 mg/mL a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente. La leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50571 después de ser sometida a condiciones de digestión gastrointestinal simulada, presentó un IC_{50} de 0.045 mg/mL y 0.22 mg/mL a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente. Siendo estas leches fermentadas las que mostraron mayor actividad inhibidora de la enzima trombina. Por otro lado la leche fermentada por *Lc. lactis* NRRL B-50572 presentó alta actividad antitrombótica e hipocolesterolémica, lo que sugiere su potencial como alimento funcional.

Cuadro 4. Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de leches fermentadas con actividad inhibidora de la ECA y de la enzima trombina

Función	**Fragmento y origen**	**Producción**	**Referencia**
Inhibición de la ECA	HPHPHLSFMAIPP κ-CN (F 98–110) SLPQNIPPL β-CN (F 69–77)	LF por *Lc. lactis* NRRL B-50571	Rodríguez-Figueroa *et al*., 2012
Inhibición de la ECA	VPP β-CN	LF por *Lb. helveticus y S. cerevisiae*	Nakamura *et al*., 1995
Inhibición de la ECA	MPFPKYPVEPF β-CN (F 6-18) ARHPHPHLSF κ-CN (F 6-18)	LF por *Lb.kefiri* YK4	Rubak *et al*., 2020
Inhibición de la ECA	MPFPKYPVEP β-CN (F 6-19)	LF por *Lb.kefiri* JK 17	Rubak *et al*., 2020
Inhibición de la ECA y trombina	YQEPVLGPVRGPFPIIV β-CN (F 193-209)	Medio de caseína bovina fermentada por *Lb. casei* Shirota	Rojas-Ronquillo *et al*., 2012

Beta-caseína: β-CN; Kappa-caseína: κ-CN

2.11. Potencial Efecto Benéfico de Leches Fermentadas con BAL Específicas

Existe una gran oportunidad para el desarrollo de productos lácteos funcionales con nuevas bacterias ácido lácticas que además de poseer propiedades tecnológicas para el desarrollo de productos lácteos fermentados, puedan generar péptidos bioactivos con efecto cardioprotector

(Beltrán-Barrientos *et al*., 2016; Shiby y Mishra 2013). En este sentido, la evaluación de nuevas cepas nativas de BAL obtenidas de productos lácteos artesanales pueden ser prometedoras debido a la capacidad tecnológica y funcional que poseen, lo cual les permitiría competir con bacterias actualmente usadas a nivel comercial (Beltrán-Barrientos *et al*., 2016).

En este sentido, se caracterizaron 18 cepas específicas de *Lactobacillus* spp. a partir de queso Cocido artesanal (Sonora, México) (Heredia-Castro *et al*., 2015). En diversos estudios se ha demostrado que varias de estas cepas poseen actividades biológicas como la liberación de compuestos antimicrobianos (Heredia-Castro *et al*., 2015); potencial probiótico de las cepas *Lactobacillus fermentum* (J20, J23, J28,), *Lactobacillus pentosus* (J24, J27, J37) y *Lactobacillus plantarum* (J25), así como el potencial efecto inmunomodulador de leches fermentadas por estas cepas, en un modelo *murino* (Santiago-López *et al*., 2018); potencial efecto antiinflamatorio de leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* (J20, J23 y J28) en un modelo *murino* (Reyes-Díaz *et al*., 2018) y la capacidad de inhibitoria a la ECA *in vitro* de las fracciónes < 3 kDa de leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* (J23, J28, J38) *Lactobacillus plantarum* (J25) *Lactobacillus pentosus* (J31, J34, J37) (Salazar-Enciso, 2013).

En otro estudio, se identificaron por medio de técnicas moleculares, BAL aisladas de queso de Poro genuino de Balancán (Benítez-Romero, 2013), entre ellas, se identificaron bacterias del genero *Lactobacillus*, *Lactoccocus* y *Enterococcus*, las cuales podrían ser las responsables de las cualidades sensoriales peculiares de este producto (Benítez-Romero, 2013). Se ha reportado que, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* han sido reconocidos como cepas probióticas y se utilizan en la industria alimentaria para la producción de alimentos “probióticos” (Ramírez *et al*., 2011). Por lo que el estudio de estas cepas aisladas de queso de Poro abre un área de oportunidad que conlleva a continuar su caracterización y funcionalidad (Benítez-Romero, 2013).

2.12. Biodisponibilidad de Péptidos Bioactivos

Al estudiar el papel de compuestos bioactivos derivados de alimentos en la salud humana, la determinación de la presencia de compuestos bioactivos en los alimentos no es suficiente para

predecir los posibles efectos *in vivo*. Esto se debe a que los metabolitos que lleguen al torrente sanguíneo, pueden ser diferentes de los compuestos que se encuentran originalmente en los alimentos. Lo anterior, es atribuido al metabolismo intensivo que tiene lugar durante la digestión gastrointestinal y su absorción. Por todo lo anterior la eficacia nutricional de los productos alimenticios puede garantizarse mediante la determinación de su biodisponibilidad (Carbonell-Capella *et al*., 2014).

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en ingles), define biodisponibilidad como la fracción relativa de una dosis administrada por vía oral que se absorbe y se encuentra en la circulación sistémica (Chen *et al*., 2001). En consecuencia, en términos de biodisponibilidad, debe demostrarse que el componente es digerido, asimilado y luego, una vez absorbido, ejercer un efecto positivo en la salud humana (Holst y Williamson 2008). Sin embargo conocer la biodisponibilidad de compuestos bioactivos es algo complicado. Antes de ser biodisponibles, estos deben de ser liberados de la matriz alimentaria (bioaccesibles), pudiendo sufrir modificaciones por efecto de la digestión gastrointestinal. Por lo anterior, antes de concluir que un alimento tiene cualquier potencial efecto en la salud, es necesario analizar si el proceso de digestión afectará a su bioaccesibilidad y su estabilidad, ya que esto a su vez afectará su biodisponibilidad así como, sus posibles efectos benéficos a la salud (Rein *et al*., 2012).

En este sentido, bioaccesibilidad se define como la cantidad o fracción que se libera de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal y se encuentra disponible para su absorción (Heaney 2001). Esto incluye la transformación digestiva de los alimentos en material listo para su asimilación y en el epitelio intestinal. La bioaccesibilidad es generalmente evaluada mediante procedimientos de digestión *in vitro*, mediante simulaciones de digestión gastrointestinal que imitan de forma parcial pero con precisión las complejas condiciones fisicoquímicas y fisiológicas del mismo (Carbonell-Capella *et al*., 2014).

La digestión de las proteínas comienza en el estómago donde, el HCl segregado reduce el pH a 1-2 con la consecuente desnaturalización de las proteínas de la dieta. La desnaturalización despliega las cadenas polipeptídicas y hace que las proteínas sean más accesibles a la actividad enzimática. Las proteínas se fragmentan por la hidrólisis de los enlaces peptídicos, esto por acción de las enzimas peptidasas, las cuales se dividen en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas descomponen los polipéptidos largos en oligopéptidos de menor tamaño, sobre los que actúan las exopeptidasas para elaborar los productos finales de la digestión proteica, aminoácidos y dipéptidos

y tripéptidos que, a continuación, son absorbidos por los enterocitos. En función del origen de las peptidasas, el proceso de digestión proteica puede dividirse en fase gástrica, pancreática e intestinal (Kulkarni y Broom 2011).

De esta manera, los péptidos bioactivos generados durante el procesamiento de los alimentos, pueden ser aún más hidrolizados durante la digestión gastrointestinal dando lugar a un conjunto de péptidos con diferentes secuencias y longitudes lo cual, puede afectar o incluso mejorar su bioactividad (Aspri *et al*., 2018; Rendón-Rosales *et al*., 2018). Es por eso que, estos péptidos deben ser absorbido en su forma activa a través de la barrera intestinal y alcanzar el flujo sanguíneo para ejercer su acción fisiológica (Toldrá *et al*., 2018).

En este sentido, antes de concluir que un alimento tiene cualquier potencial efecto en la salud, es necesario analizar si el proceso de digestión afectará a los compuestos bioactivos, su estabilidad y su biodisponibilidad (Rein *et al*., 2012). Debido a que en diversos estudios han demostrado que LF con cepas específicas de *Lactobacillus* spp. poseen actividades biológicas como la liberación de péptidos antimicrobianos (Heredia-Castro *et al*., 2015), características probióticas e imnonumoduladoras (Santiago-López *et al*., 2018), potencial antiinflamatorio (Reyes-Díaz *et al*., 2018), así como la capacidad de inhibir a la ECA (Salazar-Enciso, 2013). Y por otro lado cepas específicas de *Enterococcus faecium* aisladas de queso de Poro de Bacalán presentan potenciales características tecnológicas y funcionales (Benítez-Romero, 2013). Aún se desconoce su potencial efecto cardioprotector. Por todo lo anterior, es importante estudiar si estas LF presentan actividad inhibidora de la ECA y de la enzima trombina después de someterlas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada y así poder evaluar su bioaccesibilidad.

3. HIPÓTESIS

Leches fermentadas con BAL específicas presentan potencial efecto antihipertensivo y antitrombótico aún después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar los efectos potencialmente antihipertensivo y antitrombótico de leches fermentadas con BAL específicas después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

4.2. Objetivos Específicos

Evaluar el grado de hidrólisis del proceso fermentativo y del proceso de digestión gastrointestinal simulada en leches fermentadas con BAL específicas.

Evaluar *in vitro* la actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina de leches fermentadas con BAL específicas después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

Evaluar *in vitro* la capacidad de inhibición de la enzima trombina de leches fermentadas con BAL específicas después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas Bajo Estudio

Las cepas empleadas para la elaboración de leches fermentadas (Cuadro 5) pertenecen al cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (CTAOA), del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD, A.C.). Las cepas del género *Lactobacillus* fueron aisladas previamente a partir del queso Cocido artesanal (Heredia-Castro *et al*., 2015); mientras que la cepa de *Enterococcus* fue aislada a partir del queso de Poro de Balancán (Benítez-Romero, 2013).

Cuadro 5. Cepas empleadas para la fermentación de leches en el presente estudio.

Código	Cepa	Fuente
J20	*Lactobacillus fermentum*	Leche
J23	*Lactobacillus fermentum*	Leche
J25	*Lactobacillus plantarum*	Suero
J28	*Lactobacillus fermentum*	Suero
J34	*Lactobacillus pentosus*	Cuajada
J37	*Lactobacillus pentosus*	Suero
J38	*Lactobacillus fermentum*	Suero
L50	*Enterococcus faecium*	Queso de poro de Balancán

5.2. Reactivación y Propagación de las Cepas

Las cepas bajo estudio, se reactivaron en caldo de Man Rogosa y Sharpe (MRS BD Difco™, Le Pont de Claix, Francia), mediante tres sub-cultivos consecutivos. Cada sub-cultivo consistió de un

inóculo al 1% (v/v) en 3 mL medio MRS. Se incubaron a 37° C por 24, 18 y 12 h, consecutivamente. Al subcultivo de 12 h se le realizaron 3 lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) y posteriormente se le ajustó la densidad a 600 nm para obtener una concentración celular de *ca*. 10^8 UFC/mL (Santiago-López *et al*., 2018).

5.3. Elaboración de Leches Fermentadas

Para la elaboración de las leches fermentadas, se realizó un preinóculo a partir de un cultivo iniciador siguiendo la metodología de Santiago-López *et al*. (2018). Se reconstituyó leche descremada en polvo comercial al 10% (p/v) y se le dio un tratamiento térmico (110°C, 10 min). Posteriormente, esta fue inoculada al 3% (v/v) y se incubó a 37 °C por 24 h, seguido de un segundo sub-cultivo de 12 h bajo las mismas condiciones.

Para la fermentación de las leches se siguió la metodología propuesta por Beltrán-Barrientos *et al*. (2018a). Para ello se utilizó leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v) con agua purificada estéril. Se le dió un tratamiento térmico (80 °C, 30 min) y se inoculó al 3% (v/v) con el cultivo iniciador de 12 h. Posteriormente, se incubaron a 37 °C por 24 o 48 h. Finalmente, el proceso de fermentación se detuvo con un tratamiento térmico (75 °C, 15 min), seguido de un enfriamiento con hielo hasta alcanzar una temperatura de 4 °C. Se tomaron 500 μL de cada leche fermentada para evaluar el grado de hidrólisis del proceso fermentativo mediante la cuantificación de grupos amino libres por el método espectrofotométrico 0-ftalaldehido (OPA), el cual se describe en una sección posterior. Las leches fermentadas fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

5.4. Simulación de Digestión Gastrointestinal *in vitro* de Leches Fermentadas

Las leches fermentadas por 24 o 48 h se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal simulada, de acuerdo a la metodología previamente reportada por Kopf-Bolantz *et al*. (2012), con algunas modificaciones. Se utilizó leche descremanda no fermentada y agua bidestilada como

testigos negativos. Todos los fluidos digestivos empleados se prepararon de acuerdo a las concentraciones descritas en el Cuadro 6 y se mantuvieron a temperatura fisiológica (37 ± 1 °C) previo a su utilización. Para llevar a cabo la incubación de las muestras se utilizó un baño con agitación constante (55 RPM) y temperatura controlada (37 ± 1 °C) (Orbital Shaker Bath, Lab-Line, EE. UU.). El proceso de digestión consistió en tres pasos, simulando la boca, el estómago y el intestino delgado. En el primer paso, se mezclaron 4 mL de solución de saliva artificial (pH de 6.5-6.8) con 3 mL de cada leche fermentada, 3 mL de leche sin fermentar o 3 mL de agua. Las mezclas se incubaron durante 5 min, posteriormente, se adicionaron 8 mL de jugo gástrico ajustando el pH entre 2-3 con HCl (1 M) y se dejó incubar por 2 h. Posteriormente, 8 mL de jugo pancreático y 4 mL de bilis se adicionaron a las mezclas la cuales se incubaron por 2 h más. El pH fue ajustado a 6.5-7 con NaOH (1 M).

Una vez finalizado el proceso digestivo simulado, se tomaron alícuotas de 500 μL para evaluar el grado de hidrólisis mediante el método de OPA, como se describe a continuación.

Cuadro 6. Composición de los diferentes jugos digestivos empleados en la simulación gastrointestinal

SALIVA			**JUGO GÁSTRICO**			**JUGO PANCREÁTICO**			**BILIS**		
V	**Componente**	**SM**	**V**	**Componente**	**SM**	**V**	**Componente**	**SM**	**V**	**Componente**	**SM**
mL		gL^{-1}	mL		gL^{-1}	mL			mL		gL^{-1}
10	KCI	46.72	28	KCI	46.72	5.4	KCI	46.72	5.4	KCI	46.72
1	KSCN	50	0.9	KH_2PO_4	68	0.8	KH_2PO_4	68	17.8	KH_2PO_4	68
20	KH_2PO_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	$MgCI_2(HO)_6$	30	1.1	$MgCI_2(HO)_6$	30	1.1	$MgCI_2(HO)_6$	30
1	$MgCI_2(HO)_6$	30	1	NH_4CI	27.28				10	$NaH_2PO_4(H_2O)$	187.7
			1	Ácido glucoronico	9.7						
			1	Glucosamina	167.5						
			1	Galactosa	160.35						
El pH se ajustó a 6.8±0.2			El pH se ajustó a 1.3±0.2			El pH se ajustó a 8.1±0.2			El pH se ajustó a 8.2±0.2		

El volumen final de cada solución se aforó a 500 mL 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	$CaCI_2(H_2O)_2$		0.15	$CaCI_2(H_2O)_2$	588	0.15	$CaCI_2(H_2O)_2$	588	0.925	$CaCI_2(H_2O)_2$	588
20	Mucina		20	Mucina	70	40	Mucina	35	7.2	Mucina	250
0.2	Amilasa	12.5(mg/mL)	4						200	Bilis	300
0.2	Lisozima	93.5	4	Pepsina	625	50	Pancreatina	360			

V: volumen, SM: Solución madre

5.5. Determinación del Grado de Hidrólisis de las Leches Fermentadas Antes y Después del Proceso Digestivo Simulado

Se evaluó el grado de hidrólisis mediante la cuantificación de grupos amino libres. La determinación se realizó por el método de Fluoraldehyde™ o-Phthaldialdehyde (OPA, Thermo Fisher, México). Una alícuota (500 μL) de las muestras digeridas y no digeridas (leche fermentada, leche sin fermentar o agua) fue adicionada con un mililitro de ácido tricloroacético (TCA) 0.75 N y 100 μL de agua bidestilada. La mezcla se agitó por 1 min y se dejó reposar por otros 10 min (Church *et al*., 1983). Posteriormente, las mezclas se centrifugaron a 1879 x *g*, 4 °C durante 45 min (Thermo Scientific, Chelmsford, MA, EE. UU.). El sobrenadante se filtró con un filtro de 0.22 μm (MLLEX Millipore). Para las lecturas espectrofotométricas, la reacción se realizó en una microplaca de 96 pocillos, donde se colocaron 10 μL de las muestras filtradas con 200 μL del reactivo de OPA (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE. UU.). Las mezclas se dejarón reposar por 2 min a temperatura ambiente en completa oscuridad. La fluorescencia fue registrada usando un espectrofotómetro (Spectro Max M3, Sunnyvale, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 330 nm y emisión de 436 nm. Como testigo se utilizó leche descremada no fermentada y las mediciones fueron realizadas por triplicado. Se utilizó el aminoácido L-leucina como estándar (0-0.250 mg/mL). Se consideraron los respectivos coeficientes de dilución en los resultados, a saber, 3.2 para el de grado de hidrólisis de la leche fermentada sin digerir, considerando la preparación de la muestra con TCA y agua bidestilada. Mientras que, para el caso de las leches fermentadas digeridas el coeficiente de dilución fue de 9 y de 3.2 en la preparación de la muestra con TCA y agua bidestilada. Para el calcular el porcentaje de hidrólisis, se preparó una muestra de hidrólisis total de leche siguiendo la metodología de Vázquez-Ortiz *et al*. (1995) con HCl (6 M) a una temperatura de 150 °C por 6 h.

El porcentaje de hidrólisis se calculó con la siguiente ecuación:

(Eq 1) $$Hidrólisis\ (\%) = \left(\frac{h}{htotal}\right) * 100$$

h = Hidrólisis de la muestra

$h$total= Hidrólisis total

5.6. Fraccionamiento de Leches Fermentadas

Las leches fermentadas a las 24 o 48 h, digeridas y no digeridas, se centrifugaron a 4696 *x g*, 4 °C durante 45 min. El sobrenadante (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 muestras fraccionadas se almacenaron a -20 °C hasta posteriores análisis.

5.7. Cuantificación de Proteína

El contenido peptídico de las leches fermentadas se determinó por el método de Lowry (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, EE. UU.). utilizando una curva de calibración con BSA (albúmina sérica bovina) (0-2 mg/mL) como estándar. A 5 µL de cada extracto <3 kDa se añadieron 25 µL del reactivo A y, posteriormente, 200 µL del reactivo B. La mezcla de soluciones se dejó en reposo por 15 min en condiciones de oscuridad y se registró la absorbancia en un espectrofotómetro (Spectro Max M3, Sunnyvale, CA, EE. UU.) a 750 nm.

5.8. Determinación de las Bioactividades

5.8.1. Evaluación de la Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La actividad inhibidora de la ECA se determinó siguiendo la metodología propuesta por Cushman y Cheung (1971) y Rodríguez-Figueroa *et al*. (2010). En el ensayo se empleó ECA (0.1 U/mL) (Pulmón de conejo, EC. 3.4.15.1); solución amortiguadora (pH 8.3) de metaborato de sodio

tetrahidratado (0.1 M) adicionado con NaCl (0.3 M) y el sustrato de la ECA, Hippuril-L-Histidil-L-Leucina (5 mM). Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se prepararon cuatro viales como se indica a continuación:

A= 100 μL Solución amortiguadora sustrato + 40 μL de H_2O milli-Q + 20 μL ECA

B= 100 μL Solución amortiguadora sustrato + 20 μL de H_2O milli-Q + 40 μL Fracción <3 kDa

C= 100 μL Solución amortiguadora sustrato + 40 μL de Fracción <3 kDa + 20 μL ECA

D= 100 μL Solución amortiguadora sustrato + 60 μL de H_2O milli-Q

Todos los viales se colocaron a 37 °C por 35 min en una incubadora. Posteriormente, se detuvo la reacción mediante la adición de 250 μL de HCI 1 M a cada vial. El ácido hipúrico resultante de la reacción se extrajo incorporando 1 mL de acetato de etilo mediante agitación vigorosa por 30 s y se centrifugó a 1500 *x g*, 10 min, 4 °C. Posteriormente, 750 μL de la fase orgánica se extrajo y se evaporó con un equipo Centrivap Cold Trap (Labconco, Kansas City, EE. UU.) (75 °C, 15 min). La muestra de cada tubo se resuspendió en 1 mL de agua Milli-Q y se registró la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA). El porcentaje de inhibición de la ECA se calculó utilizando la siguiente ecuación:

(Eq 2) $$Actividad\ inhibidora\ de\ la\ ECA\ (\%) = \left(1 - \frac{(C-B)}{(A-D)}\right) * 100$$

El porcentaje de inhibición de la ECA obtenido corresponde a la concentración de proteína determinada. Por lo que el IC_{50} teórico es a la concentración de proteína requerida para inhibir el 50% de actividad enzimática. Se realizaron dos repeticiones con sus respectivos duplicados y el IC_{50} se reportó en mg/mL.

5.8.2. Actividad Inhibidora de Trombina

La actividad antitrombótica se determinó utilizando el método turbidimétrico en microplaca, de acuerdo Zhang *et al*. (2008) con algunas modificaciones, en el cual se determinó la inhibición de

la enzima trombina. Las fracciones < 3 kDa se diluyeron 3 veces en solución amortiguadora 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 40 µL de muestra o solución amortiguadora y 140 µL de fibrinógeno al 0.109%. 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 30 µL de trombina humana (4.417 UI/mL) (EC: 3.4.21.5), a la mezcla en cada pocillo. Después de 10 min de incubación, se registraron nuevamente las absorbancias. Se utilizó heparina (1 mg/mL) como testigo positivo. Los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Los porcentajes de inhibición se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación:

(Eq 3) $$Inhibición\ de\ la\ enzima\ trombina\ (\%) = \left(\frac{(C-CB)-(M-MB)}{(C-CB)}\right) * 100$$

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

CB: Fibrinógeno + solución amortiguadora, antes de incubación, después de incubación, antes de adicionar enzima

M: Fibrinógeno + muestra, después de incubación, después de adicionar enzima

MB: Fibrinógeno + muestra, después de incubación, antes de adicionar enzima

Se elaboraron curvas dosis-respuesta con 3 concentraciones de las fracciones < 3 kDa, con la finalidad de calcular la concentración de proteína necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima (IC_{50}). Se realizaron dos repeticiones con sus respectivos duplicados y el IC_{50} se reportó en µg/mL.

5.9. Análisis Estadístico

Se realizó un diseño completamente al azar y se verificó la normalidad de los datos. Donde los

factores fueron cada una de las fracciones < 3 kDa de las leches fermentadas por las cepas J20, J23, J25, J28, J34, J37, J38, L50 a las 24 o 48 h de fermentación, y las variables de respuesta fueron el grado de hidrólisis, la actividad inhibidora de la ECA y la actividad inhibidora de trombina. El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó la prueba de Tukey-Kramer para la comparación de medias. Se realizó una prueba d t-Student para comprar las diferencias entre tiempos de fermentación (24 o 48 h). Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las bioactividades. Se utilizó un nivel de significancia del 95%. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se expresaron como la media ± desviación estándar. Se utilizó el programa estadístico NCSS 2019 (Statistical Sftware 2019. NCSS, LLC. Kaysville, UT, EE.UU.) para procesar los datos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Grado de Hidrólisis y pH de Leches Fermentadas

Los valores del potencial de hidrógeno (pH) de LF con BAL específicas a las 24 o 48 h de fermentación se muestran en la Figura 5. Los valores de pH de las LF estuvieron dentro de un rango de 5.08 a 6.28 a las 24 h de fermentación y de 4.01 a 6.05 a las 48 h de fermentación. Los valores de pH fueron significativamente menores ($p < 0.05$), en las LF por la cepa J20 (5.08 ± 0.07) a las 24 h de fermentación. Para las 48 h de fermentación, el pH de las LF por las cepas J20 y J28 (4.01 ± 0 y 4.015 ± 0.03, respectivamente), seguido de las LF por las cepas J23 y J25 (4.38 ± 0.07 y 4.69 ± 0.38, respectivamente), fueron significativamente menores ($p<0.05$). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), en el pH de las LF entre las 24 y 48 h de fermentación, siendo las LF a las 48 h con menores valores de pH. Estos resultados son similares a los reportados por Santiago-López (2013) para LF a las 48 h con las mismas cepas de *Lactobacillus* spp., donde las leches fermentadas por las cepas J20, J23, J25 y J28 presentaron estadísticamente, los menores valores de pH. De igual manera Reyes-Díaz *et al*. (2018), reportan valores de pH similares a los encontrados en nuestro estudio para las LF por las cepas J20, J23 y J28 a las 24 y 48 h de fermentación. En otros estudios, se han publicados valores de pH de leches fermentadas con diferentes BAL específicas que varían de 6.3 a 3.4 después de 48 h de fermentación (Aspri *et al*., 2018; González-Córdova *et al*., 2011).

Según el CODEX ALIMENTARIUS (FAO y OMS 2011), la leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de microorganismos y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica) y formación de ácido láctico. Estos cultivos de microorganismos pueden ser viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. La velocidad de fermentación y el descenso de pH son factores claves para la producción de leches fermentadas. Es por esto que se espera que cultivos iniciadores de BAL tengan la capacidad de disminuir el pH de la leche en un periodo de

tiempo corto. Además otra característica importante es que mantenga un pH estable durante su almacenamiento (Tamime *et al*., 2006).

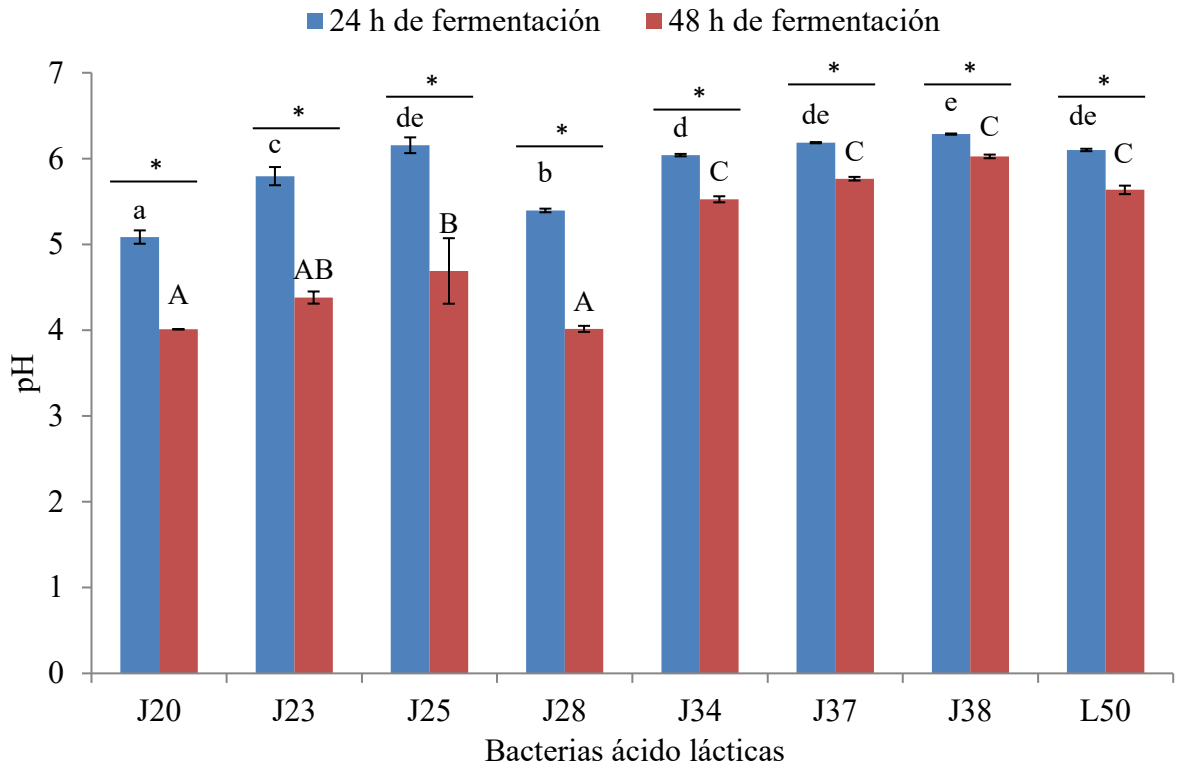


Figura 5. Valores de pH de leches fermentadas por BAL específicas durante 24 o 48 h. Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre las diferentes leches fermentadas en los tiempos de fermentación (24 h, minúsculas) (48 h, mayúsculas). * Representa diferencias ($p<0.05$) entre los tiempos de fermentación para una leche fermentada por la misma cepa.

Durante la fermentación de la leche, el sistema proteolítico de las BAL es capaz de hidrolizar las proteínas lácteas, para la producción de péptidos y liberación de aminoácidos esenciales los cuales, son fundamentales para el crecimiento bacteriano. Este proceso es de gran importancia en la industria alimentaria ya que, contribuye significativamente en el desarrollo de compuestos que le dan las características organolépticas los productos lácteos fermentados (Savijoki *et al*., 2006; Liu *et al*., 2010). Además, durante este proceso pueden liberarse péptidos con distintas actividades biológicas (Lim *et al*., 2019).

Se determinó el grado de hidrólisis en las leches fermentadas por BAL específicas (Figura 6). Este grado de hidrólisis de las LF se encontró en un rango del 0.40-0.54% a las 24 h de fermentación y del 0.47-1.14% a las 48 h de fermentación. Las LF que presentaron significativamente mayor ($p<0.05$) grado de hidrólisis a las 24 h de fermentación, fueron fermentadas por las cepas J20 (0.53 ± 0.002%), J23 (0.54 ± 0.01%) y J25 (0.54 ± 0.01%). Asimismo, para las 48 h de fermentación, por las cepas J20 (1.14 ± 0.01%) y J23 (1.09 ± 0.01%), seguido de las LF por las cepas J25 (0.86 ± 0.06%) y J28 (0.80 ± 0.03%), presentaron significativamente mayor ($p<0.05$) grado de hidrólisis. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), en el grado de hidrólisis en las LF entre las 24 y 48 h de fermentación, con un mayor grado de hidrólisis a las 48 de fermentación, a excepción de las LF por la cepa J38.

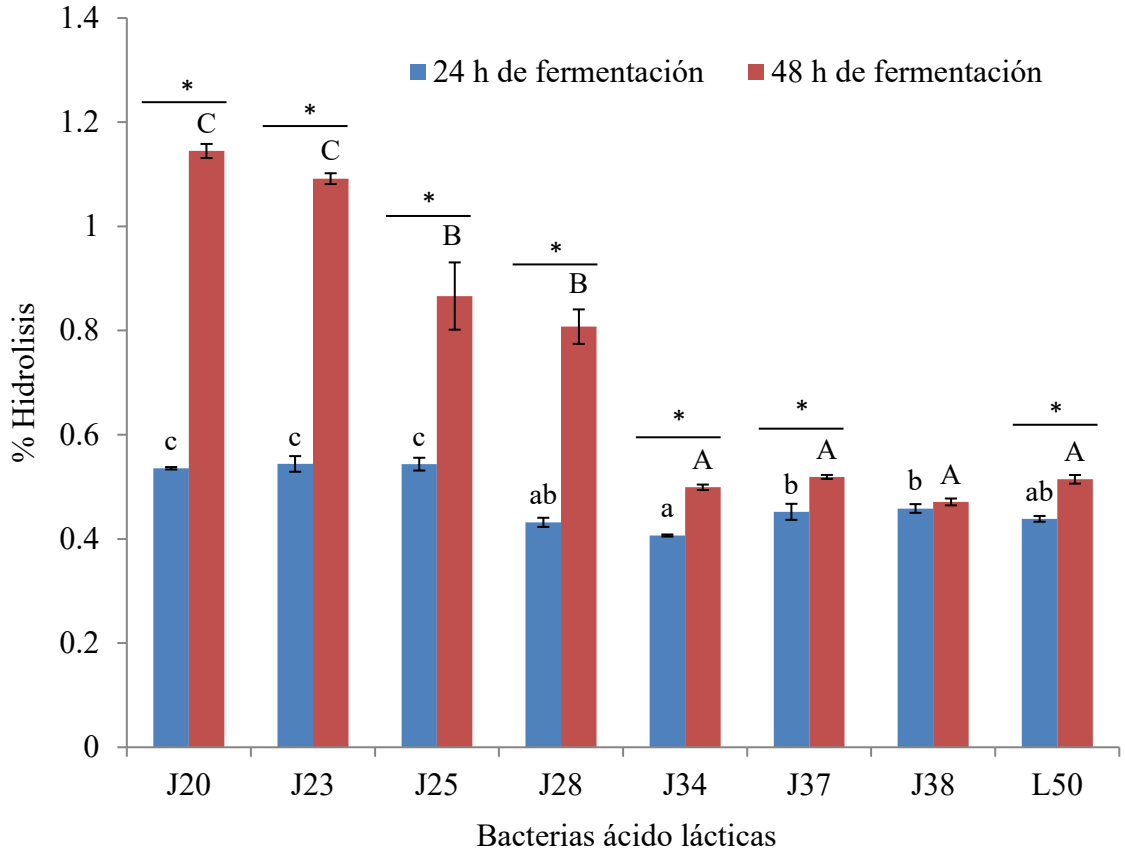


Figura 6. Grado de hidrólisis de leches fermentadas por BAL específicas, expresado como porcentaje (%). Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre las diferentes leches fermentadas en los tiempos de fermentación (24 h, minúsculas) (48 h, mayúsculas). * Representa diferencias ($p<0.05$) entre los tiempos de fermentación para una leche fermentada por la misma cepa.

En un estudio previo realizado por Santiago-López (2013) se evaluó la actividad proteolítica de las mismas cepas específicas de *Lactobacillus* spp. En sus resultados se reportó que en las LF por 48 h con las cepas J20, J23, J25 y J28 presentaron estadísticamente, mayor actividad proteolítica. Esto se ve reflejado en nuestro estudio, ya que las LF por estas mismas cepas fueron las que presentaron mayor grado de hidrólisis. Los resultados obtenidos evidencian que las diferencias entre la disminución de pH y el grado de hidrolisis en LF es cepa dependiente. En este sentido, en un estudio realizado por Lim *et al.* (2019), evaluaron 17 cepas específicas de *Pediococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. y encontraron que cada cepa poseía un sistema proteolítico extracelular versátil, con una amplia capacidad en producción de varios aminoácidos tales como, metionina, lisina, treonina y triptófano. También, reportaron que la capacidad para producir aminoácidos y péptidos biactivos fue cepa dependiente. Debido a que las diferentes cepas mostraron diferentes afinidades y eficiencia en la producción de aminoácidos y péptidos, se determinó que las 17 cepas de BAL poseen actividad proteolítica en un amplio rango de pH (Lim *et al.,* 2019).

6.2. Grado de Hidrólisis de Leches Fermentadas Digeridas

Durante la ingesta de las leches fermentadas, la biodispobibilidad de los péptidos presentes puede modificarse debido, entre otras cosas, a la acción de proteasas gastrointestinales. Como resultado de la hidrólisis extensiva en condiciones gastrointestinales simuladas, la concentración de péptidos generalmente se ve aumentada. Esto se debe a la acción de las enzimas digestivas tales como, pepsina, tripsina y quimotripsina las cuales actúan hidrolizando las proteínas de la leche o péptidos derivados de la fermentación de la leche. Asimismo, esta hidrólisis puede actuar sobre los péptidos derivados de la fermentación lo que se verá reflejado en el aumento o disminución de la bioactividad (Toldrá *et al*., 2018; Singh y Vij, 2018). En este sentido resulta importante la evaluación del grado de hidrólisis como un indicador del impacto de las condiciones gastrointestinales sobre los péptidos o sobre las proteínas aún intactas. Por lo cual, cuando se realiza fermentación con BAL para la obtención de péptidos bioactivos, un modelo de simulación gastrointestinal es útil para evaluar cómo afectan las condiciones gastrointestinales a la bioactividad de estos péptidos (Kopf-Bolanz *et al*. 2012; Carbonell-Capella *et al*., 2014).

Por lo anterior, se determinó el grado de hidrólisis de las LF después de haber sido sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal (Figura 7). Los resultados indicaron el grado de hidrólisis para la leche no fermentada fue de 50.34 ± 1.04%, resultando similar al obtenido por Kopf-Bolanz *et al*. (2012), quienes reportaron un porcentaje de hidrólisis de 50%, lo que evidencia la reproducibilidad del método de simulación. Respecto a las LF después del proceso de digestión gastrointestinal simulada, el grado de hidrólisis se encontró dentro de un rango de 55-60%. Estos valores fueron significativamente mayores ($p<0.05$) a los de la leche sin fermentar digerida. Estas diferencias se pueden atribuir a la pre-hidrólisis originada por las BAL durante la fermentación. Este mismo comportamiento se observó en un estudio previo realizado por Rendón-Rosales *et al*. (2019) quienes usaron cinco cepas de *Lactococcus lactis* y dos tiempos de fermentación diferentes.

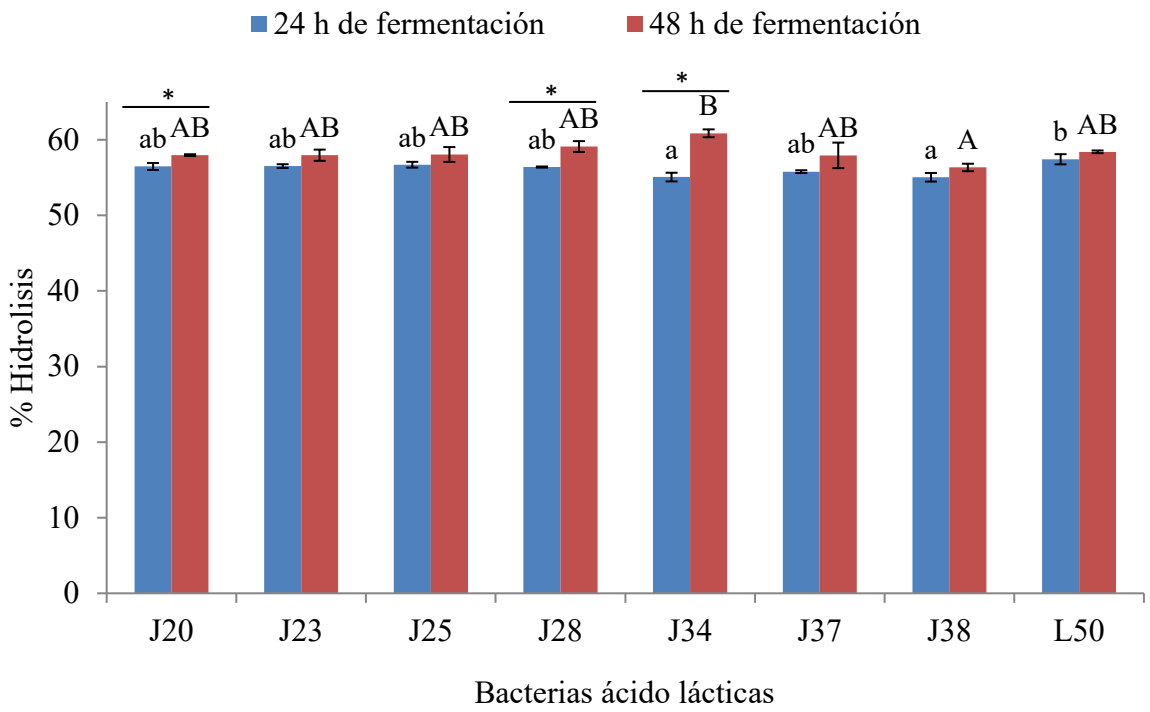


Figura 7. Grado de hidrólisis de leches fermentadas por BAL específicas digeridas expresado como porcentaje (%). Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre leches fermentadas, literales en minúsculas a las 24 h y literales en mayúsculas a las 48 h de fermentación, * representa diferencias ($p<0.05$) entre tiempos de fermentación.

6.3. Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina de Leches Fermentadas Después del Modelo de Digestión Gastrointestinal Simulada

La ECA es clave en la regulación de la presión arterial, esta actúa catalizando la angiotensina I en angiotensina II la cual es un potente vasoconstrictor (Ondetti y Cushman, 1982). En la Figura 8, se presentan los resultados del porcentaje de inhibición de la ECA de las fracciones < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada. En el caso del agua digerida se obtuvo un resultado de 4.05 ± 1.91% de inhibición, lo cual podría deberse a la hidrolisis de las enzimas digestivas presentes en los jugos gastrointestinales, por lo cual, se restó este resultado a los resultados obtenidos en las leches fermentadas y la leche sin fermentar digeridas. Por otro lado, todas las LF presentaron actividad inhibidora de la ECA en un rango del 41-83% a las 24 h de fermentación y de 35-90% a las 48 h de fermentación. Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), entre tiempos de fermentación en cuanto al porcentaje de IECA de las LF por las cepas J20, J28 y J38. Además las LF que presentaron mayor ($p<0.05$) porcentaje de IECA fueron por la cepa J28 (83.5 ± 0.83%), seguido de las cepas J20 (75.35 ± 2.49%), J23 (71.62 ± 3.82%) y L50 (70.27 ± 5.73%) a las 24 h de fermentación. En cuanto a las LF por 48 h de fermentación las que presentaron significativamente mayor ($p<0.05$) porcentaje IECA fueron por las cepas J20 (90.54 ± 0.00%), J38 (de 89.47 ± 2.49%), L50 (80.06 ± 5.82%) y J28 (75.24 ± 2.33%). Por otro lado, para la leche sin fermentar digerida se registró 21.62 ± 5.73% de inhibición, este resultado indica una mayor IECA en las LF, lo cual se debe al proceso fermentativo de la leche.

En un estudio previo reportado por Salazar-Enciso (2013), se evaluó la IECA de leches fermentadas con algunas de las cepas del presente estudio; no obstante, no se determinó la bioactividad después de haber sido sometidas a condiciones gastrointestinales. En este sentido, Salazar-Enciso (2013) reporta un porcentaje de IECA del 45% para la leche fermentada 24 h por la cepa J28; sin embargo, en el presente estudio se observó que dicha actividad incrementó 1.8 veces después de haber sido sometida a condiciones de digestión gastrointestinal simulada. Por otro lado, la leche fermentada 24 h por la cepa J38, se mantuvo en un 60% de inhibición. Estos resultados podrían sugerir que las condiciones gastrointestinales modifican la estructura de los péptidos en cuanto a tamaño y especificidad, lo cual resulta en el aumento de la eficiencia de los péptidos para inhibir a la ECA.

Con respecto a esto, Epigmenio-Chávez (2018), evaluó la inhibición de la ECA de LF por cepas específicas de *Lactococcus lactis,* y observó que después de ser sometidas a condiciones gastrointestinales la bioactividad se modificó positivamente o viceversa.

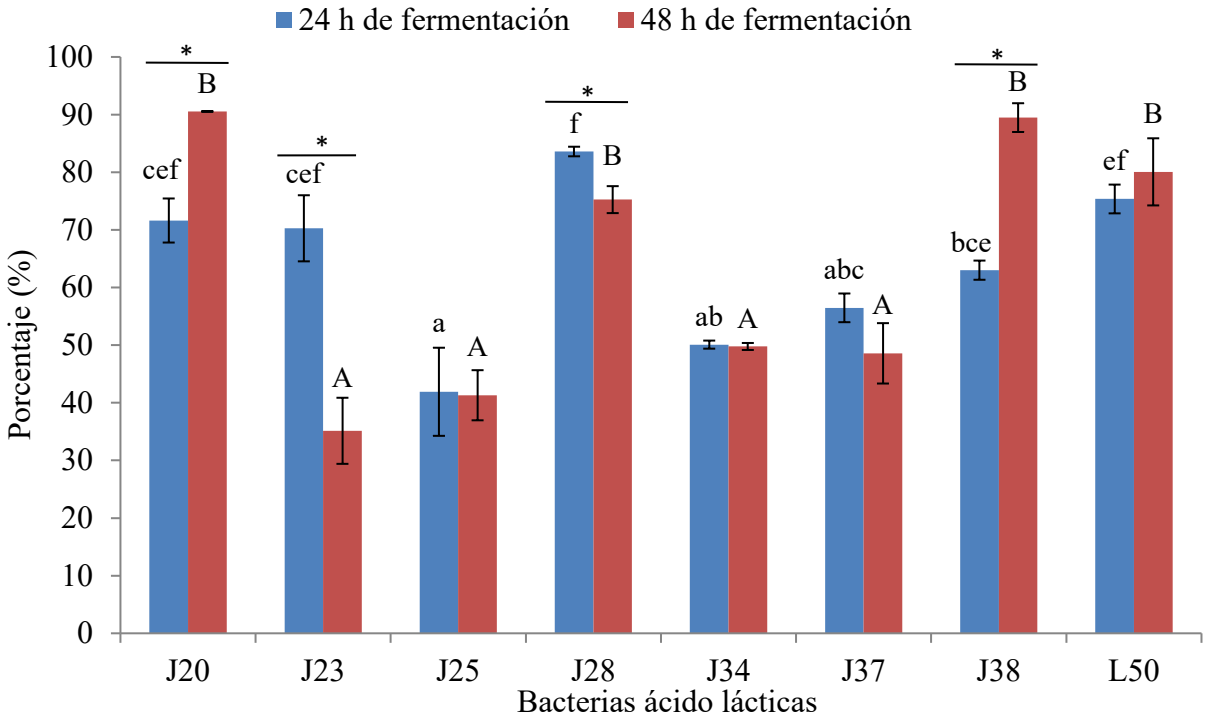


Figura 8. Porcentaje de inhibición ECA de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas digeridas. Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre FSA, literales en minúsculas a las 24 h de fermentación y literales en mayúsculas a las 48 h de fermentación, * representa diferencias ($p<0.05$) entre tiempos de fermentación.

Sin embargo, es conveniente determinar el IC_{50}, el cual representa la concentración mínima de proteína (concentración peptídica) necesaria para inhibir el 50% la actividad de la enzimática. En el Cuadro 7 se muestran los valores obtenidos de IC_{50} de las leches fermentadas a 24 y 48 h después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada. Los resultados mostraron valores en un rango de 0.27-0.82 mg/mL a las 24 h de fermentación y de 0.27-0.78 mg/mL a las 48 h de fermentación. Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), entre los tiempos de fermentación (24 y 48 h) en cuanto al IC_{50} en las LF por las cepas J23 y J38. Los

menores ($p<0.05$) IC_{50} se presentaron en las LF por las cepas J20 (0.39 ± 0.03 mg/mL), J23 (0.28 ± 0.05 mg/mL), J28 (0.27 ± 0.02 mg/mL), J38 (0.38 ± 0.01 mg/mL) y L50 (0.36 ± 0.01 mg/mL) a las 24 h de fermentación. Por otro lado, los menores ($p<0.05$) IC_{50} después de 48 h de fermentación se presentaron para las cepas J20 (0.33 ± 0.06 mg/mL), J28 (0.29 ± 0.01 mg/mL), J38 (0.27 ± 0.02 mg/mL) y L50 (0.30 ± 0.01 mg/mL). Estos resultados indican que en el caso de la leche fermentada por las cepas J20, J23, J28, J38 y L50, 24 h de fermentación es suficiente para la liberación de péptidos con alta actividad inhibidora de la ECA. Por otro lado, los resultados obtenidos por las LF con las diferentes cepas de BAL específicas (*Lb. fermentum*, *Lb. plantarum, Lb. pentosus* y *E. faescium)* nos indica diferencias intra e inter género y especie bacteriana en la producción de péptidos bioactivos eficientes, tal como lo reportan Aspri *et al*. (2018).

Cuadro 7. Valores de IC_{50} de IECA (mg/mL) de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

Cepa	Leche fermentada 24 h	Leche fermentada 48 h
J20	0.39 ± 0.03^{a}	0.33 ± 0.06^{A}
J23	$0.28 \pm 0.05^{*a}$	$0.54 \pm 0.03^{*B}$
J25	0.78 ± 0.10^{b}	0.60 ± 0.12^{BC}
J28	0.27 ± 0.02^{a}	0.29 ± 0.01^{A}
J34	0.82 ± 0.05^{b}	0.78 ± 0.02^{C}
J37	0.65 ± 0.06^{b}	0.60 ± 0.004^{BC}
J38	$0.38 \pm 0.01^{*a}$	$0.27 \pm 0.02^{*A}$
L50	0.36 ± 0.01^{a}	0.30 ± 0.01^{A}

Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre leches fermentadas, literales en minúsculas a las 24 h y literales en mayúsculas a las 48 h de fermentación, * representa diferencias ($p<0.05$) entre tiempos de fermentación.

En este sentido, los resultados de nuestro estudio pueden ser comparados con lo reportado por Hernández-Ledesma *et al.* (2011), quienes evaluaron la IECA de LF por *Lactobacillus rhamnosus* CECT 287, antes y después de ser sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Sus resultados mostraron que el valor de IC_{50} fue modificado tras el proceso de digestión gastrointestinal simulada. El IC_{50} de la leche fermentada y su fracción < 3 kDa antes de la digestión

gastrointestinal simulada fue de 0.756 y 0.103 mg/mL, respectivamente. Posteriormente, se evaluó la IECA del extracto soluble en agua y la fracción < 3 kDa de la leche fermentada después de ser sometida al modelo de digestión gastrointestinal simulada y se observó que la IECA aumentó notablemente después de la hidrólisis con pepsina, con un IC_{50} de 0.110 y 0.087 mg/mL, respectivamente. Al final de la digestión gastrointestinal simulada la IECA disminuyó ligeramente debido a la acción de la hidrólisis de las enzimas pancreáticas donde se obtuvo un IC_{50} de 0.174 y 0.195 mg/mL en el extracto soluble en agua y en la fracción < 3 kDa, respectivamente (Hernández-Ledesma *et al*., 2011).

En otro estudio realizado por Aspri *et al*. (2018), evaluaron la IECA de leche de burra fermentada por 48 h con BAL específicas del genero *Enteorococcus* y *Lactobacillus* (aisladas previamente de leche de burra cruda) después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. En sus resultados reportan que las LF por la cepa de *Lactobacillus casei* DM214 presentó un IC_{50} de 0.04 mg/mL y las LF por las cepas del genero *Enteorococcus* obtuvieron un IC_{50} en un rango de 0.06 a 2.17 mg/mL, donde las LF por las cepas *Enteorococcus faescium* (DM18, DM224, DM270, DM33) presentaron un IC_{50} de 0.017, 0.54, 2.71, 0.35 mg/mL respectivamente. En este sentido, sus resultados son comparables a los obtenidos en nuestro estudio, donde de igual manera los resultados de IC_{50} reportados fueron cepa dependiente (Aspri *et al*., 2018).

Por otro lado, en un estudio previo realizado por Reyez-Díaz *et al*. (2018) se identificaron los péptidos presentes en leche fermentada por *Lb. fermentum* J28 sin ser sometida a digestión gastrointestinal simulada. Los resultados mostraron péptidos con un peso molecular < 3 kDa (de 7 a 32 aminoácidos); 12 secuencias peptídicas fueron derivadas del lactosuero y 3 derivadas de las caseínas. Dentro de los péptidos previamente identificados, la secuencia RYPSYGLN de la κ-CN (f 55-62), ha sido previamente reportada con actividad IECA en otras leches fermentadas por cepas específicas de *Lactococcus lactis* (YPSYGL y YPSYG) (Rodríguez-Figueroa *et al*., 2012) y de hidrolizados de caseína (RYPSYG) (Jiang *et al*., 2010). Así mismo, se identificó el péptido VLPVPQKAV de la β-CN (185–193) (Reyes-Díaz *et al*., 2018), la cual se ha reportado anteriormente con actividad IECA en otro estudio de leche fermentada por BAL comerciales incluyendo *Lactobacillus casei*, (VLPVPQ) (Hernández-Ledesma *et al*., 2004). Además, se identificó el péptido LDAQSAPLRVYVEELKPT de la β-Lactoglobulina (f48–65) (Reyez-Diaz *et al*., 2018), en el cual se encuentra encriptado el di-péptido antihipertensivo VY (Matsui *et al*., 2002), y este podría liberarse durante la digestión gastrointestinal y así ejercer su efecto hipotensor.

No obstante, aún es necesario realizar un análisis donde se identifiquen las fracciones peptídicas con IECA de las LF con BAL específicas evaluadas en el presente estudio, así como el análisis y la identificación de péptidos mediante HPLC-MS/MS de las fracciones antes y después de la simulación gastrointestinal para comprender el impacto a nivel estructural de los péptidos en el proceso fermentativo y gastrointestinal.

6.4. Actividad Inhibidora de la Enzima Trombina de Leches Fermentadas Después del Modelo de Digestión Gastrointestinal Simulada

Debido al daño endotelial causado por diferentes factores como la hipertensión o el rompimiento de la placa ateroesclerótica, se activa la cascada de coagulación donde la enzima trombina actúa catalizando la polimerización del fibrinógeno para formar fibrina, donde, unido a la agregación plaquetaria se da la formación de trombos (Mackman *et al*., 2007). En este estudio se evaluó el potencial antitrombótico mediante la actividad inhibidora de la enzima trombina de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada (Figura 9). En el caso del agua digerida se obtuvo un resultado de 4.57 ± 1.02% de inhibición, el cual fue restado a todos los resultados obtenidos. Los resultados mostraron que solamente las LF por las cepas J20, J23, J28 y J38 a las 24 y 48 h de fermentación presentaron inhibición de la enzima trombina después de ser sometidas a condiciones de digestión gastrointestinal simulada. El porcentaje de inhibición de la enzima trombina se presentó dentro de un rango del 29-98% a las 24 h de fermentación y de 75-98% a las 48 h de fermentación. Se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), entre tiempos los diferentes tiempos de fermentación en cuanto al porcentaje de inhibición de la enzima trombina en las LF por las cepas J20 y J23. Los porcentajes más altos ($p<0.05$) de inhibición de trombina fueron en las LF por las cepas J28 (98 ± 0.04% y 98.42 ± 0.94%) y J38 (94.93 ± 0.59% y 95.77 ± 0.70%) en los tiempos de 24 y 48 h fermentación, respectivamente. En cuanto a la leche sin fermentar se obtuvo un 9.59 ± 0.62 % de inhibición, este resultado nos indica que hay una mayor IT en las LF, lo cual se debe al proceso fermentativo de la leche.

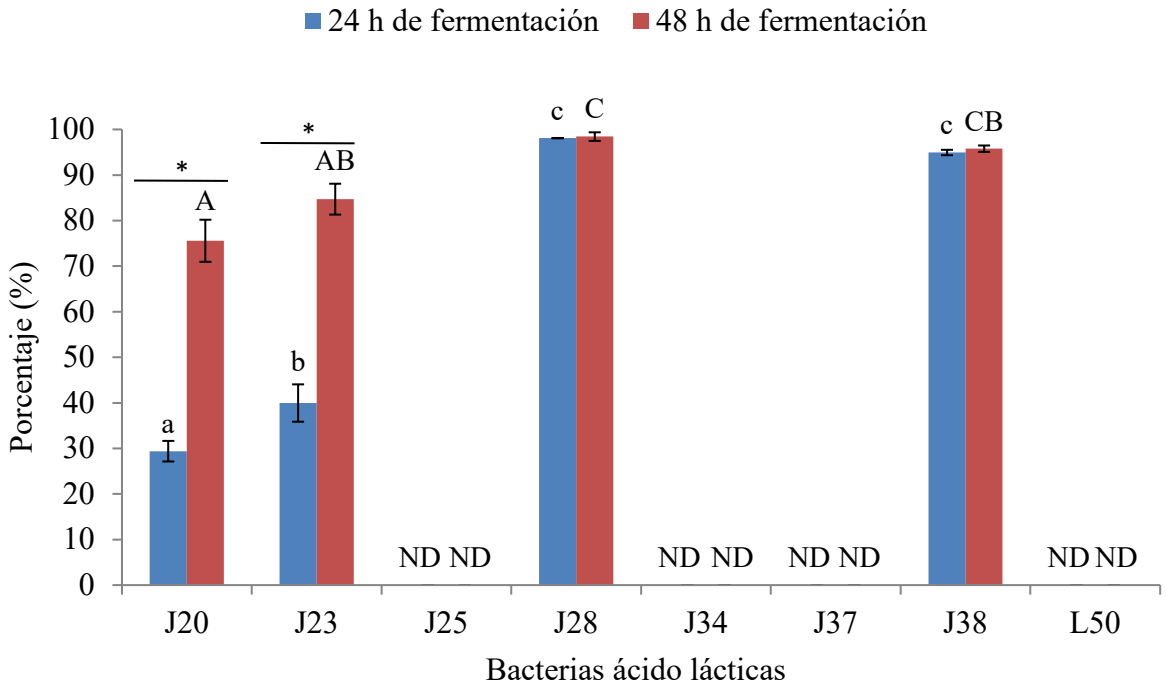


Figura 9. Porcentaje de inhibición de la enzima trombina de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por BAL específicas. digeridas. Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre leches fermentadas, literales en minúsculas a las 24 h y literales en mayúsculas a las 48 h de fermentación, * representa diferencias ($p<0.05$) entre tiempos de fermentación. ND. No se detectó inhibición.

Además se determinó el IC_{50} para inhibir a la enzima trombina, con la finalidad de conocer la efectividad de las diferentes LF. En este sentido, se realizaron curvas de dosis-respuesta de las LF, donde, a partir de la pendiente lineal se obtuvo el valor de IC_{50}. En el Cuadro 8, se presentan los resultados obtenidos de IC_{50} para IT. Los resultados obtenidos se presentaron en un rango de 0.19-1.09 mg/mL a las 24 h de fermentación y de 0.21-0.41 mg/mL a las 48 h de fermentación. Se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$), entre tiempos de fermentación en cuanto al IC_{50} de la IT LF por las cepas J20 y J23. Los resultados de IC_{50} significativamente menores ($p<0.05$) se presentaron en las LF por las cepas J23, J28 y J38 a las 24 h de fermentación, con valores de 0.64 ± 0.04 mg/mL, 0.19 ± 0.03 mg/mL y 0.31 ± 0.00 mg/mL, respectivamente. Para las 48 h de fermentación, los resultados de IC_{50} significativamente menores ($p<0.05$), fueron en las LF por J20, J23, J28 y J38 con valores de 0.38 ± 0.07 mg/mL, 0.24 ± 0.01 mg/mL, 0.21 ± 0.004 mg/mL y 0.31 ± 0.07 mg/mL, respectivamente. Estos resultados indican que leche fermentada por las cepas J23,

J28 y J38, a las 24 h de fermentación, es suficiente para la liberación de péptidos con buena actividad inhibidora de la enzima trombina. Por lo anterior, las LF por las cepas J20, J23, J28 y J38, tienen la capacidad de liberar péptidos inhibidores de trombina, con potencial efecto antitrombótico, ya que esta bioactividad se observó después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

Cuadro 8. Valores de IC_{50} de IT (mg/mL) de la fracción < 3 kDa las leches fermentadas por BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada.

Cepa	Leche fermentada 24 h	Leche fermentada 48 h
J20	$0.98 \pm 0.10^{*b}$	$0.38 \pm 0.07^{*A}$
J23	$0.64 \pm 0.04^{*ab}$	$0.24 \pm 0.01^{*A}$
J25	ND	ND
J28	0.19 ± 0.03^{a}	0.21 ± 0.004^{A}
J34	ND	ND
J37	ND	ND
J38	0.31 ± 0.00^{a}	0.31 ± 0.07^{A}
L50	ND	ND

Los resultados están expresados como la media (n=2) ± desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias ($p<0.05$) entre leches fermentadas, literales en minúsculas a las 24 h y literales en mayúsculas a las 48 h de fermentación, * representa diferencias ($p<0.05$) entre tiempos de fermentación. ND. No se detectó inhibición.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, fueron similares a los resultados reportados en un estudio realizado por Rendón-Rosales *et al.* (2019), quienes evaluaron la actividad antitrombótica de LF por cepas específicas de *Lactococcus lactis* antes y después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. En dicho estudio, se reportaron valores de IC_{50} dentro de un rango de 0.045-0.91 mg/mL y 0.049–0.98 mg/mL a las 24 h y 48 h de fermentación, respectivamente. En otro estudio, reportado por Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) evaluaron en un medio de caseína fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota, y observaron un 80.7% de inhibición de la enzima trombina a las 27 h de fermentación. Posteriormente, identificaron la secuencia peptídica YQEPVLGPVRGPFPIIV de la β-CN (f193-209), con una masa molecular de 1.88 kDa, la cual presento IT e IECA con una eficiencia inhibitoria de 4.6%/($\mu g/mL^{-1}$) concentración

peptídica. Esta fue sometida a digestión con pepsina y tripsina, y la bioactividad no fue afectada (Rojas-Ronquillo *et al.,* 2012).

Por otro lado, en un estudio por realizado Tu *et al.* (2017), evaluaron la actividad inhibidora en un medio de caseína hidrolizado con tripsina donde determinaron un porcentaje de inhibición promedio del 45.47% a una concentración de 3.5 mg/mL. En este sentido, los resultados de actividad inhibidora de la enzima trombina de leches fermentadas con BAL específicas obtenidos en nuestro estudio nos indican que las LF pudieran ser más eficientes en comparación a los hidrolizados de caseína con tripsina, debido a que es necesaria una menor concentración de proteína para inhibir el 50% de actividad enzimática. Esto podría estar relacionado al proceso fermentativo de la leche con BAL donde se pudieran estar liberando péptidos con alta capacidad inhibidora de trombina. Siendo el proceso fermentativo de la leche por BAL, una estrategia prometedora para la producción de péptidos inhibidores de trombina. Además, estos péptidos podrían ser derivados de las proteínas lácteas, no solo de las caseínas, sin embargo, es necesario un análisis donde se identifiquen las fracciones peptídicas con actividad inhibidora de trombina y su procedencia.

En este sentido, las leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* J20, J23, J28 y J38 presentaron actividad inhibidora de la ECA y de la enzima trombina después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada, por lo cual, se realizó un análisis de correlación entre el IC_{50} para inhibir a la ECA y el IC_{50} para inhibir a la enzima trombina. Los resultados (Figura 10) mostraron una correlación baja ($r = 0.0268$), la cual no fue significativa ($p>0.05$), mediante un análisis de correlación de Pearson. Sin embargo, aún es necesario identificar las fracciones peptídicas que presentan ambas bioactividades y así evaluar la presencia o no, de péptidos bifuncionales previamente reportados (Rojas-Ronquillo *et al.* 2012) con capacidad de inhibir a la ECA y a la enzima trombina en estas leches fermentadas.

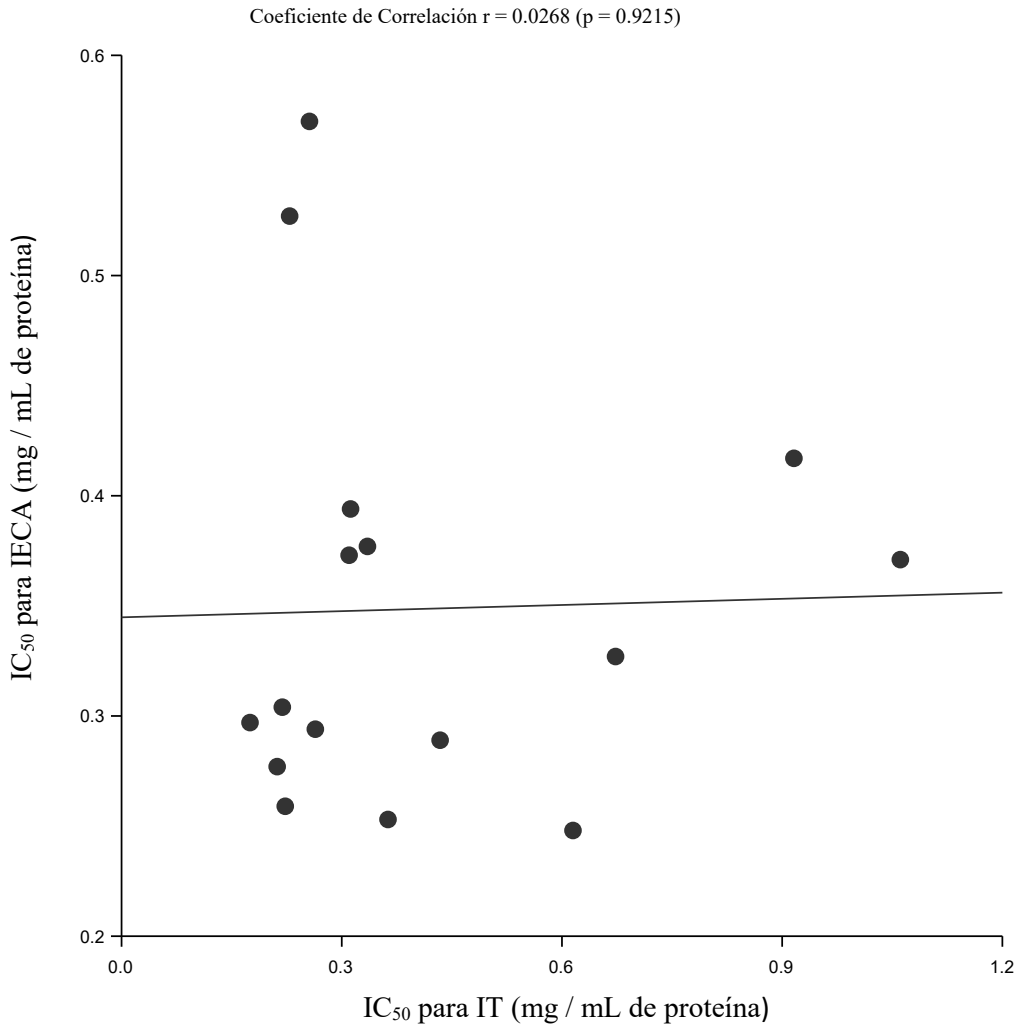


Figura 10. Asociación entre IC_{50} (mg/mL de proteína) para inhibir a la ECA y a la enzima trombina de la fracción < 3 kDa de leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* (J20, J23, J28 y J38), después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. El coeficiente r (0.0268) no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$) mediante un análisis de correlación de Pearson.

7. CONCLUSIONES

El presente estudio evaluó el potencial antihipertensivo y antitrombótico de leches fermentadas por 8 BAL específicas después de ser sometidas a un modelo de digestión gastrointestinal simulada. Los resultados mostraron que todas las leches fermentadas presentaron actividad inhibidora de la ECA, siendo las leches fermentadas por las cepas de *Enteroccocus faecium* L50 y *Lactobacillus fermentum* J20, J23, J28 y J38 las que presentaron mejor actividad inhibidora de la ECA. Además las leches fermentadas por las cepas de *Lactobacillus fermentum* J20, J23, J28 y J38 mostraron actividad inhibidora de la enzima trombina a las 24 y 48 h de fermentación. Dichas bioactividades fueron cepa-dependiente. Lo cual sugiere que el efecto se debe a las fracciones peptídicas específicas liberadas durante la fermentación. Debido a que las leches fermentadas por las cepas *Lactobacillus fermentum* J20, J23, J28, y J38 fueron las que presentaron menores IC_{50} para ambas bioactividades, mostrando potencial efecto antihipertensivo y antitrombótico, podrían ser utilizadas en la fermentación de leches con efecto cardioprotector bifuncional y ser evaluadas en un modelo *in vivo*. En un futuro, podrían ser utilizadas en el desarrollo de alimentos funcionales como alternativa para coadyuvar en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

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. 2016. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. Journal of Dairy Science. 100:65–75.

Alissa E.M. y Ferns G.A. 2012. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. Journal of Nutrition and Metabolism. 2012:1-16. DOI: 10.1155/2012/569486

American Heart Association (AHA). 2017. ¿Qué es la presión arterial alta? Disponible en linea: https://www.heart.org/-/media/data-import/downloadables/4/c/5/whatishighbloodpressure_span-ucm_316246.pdf

American Heart Association (AHA). 2020. Consequences of High Blood Pressure. Disponible en línea: https://www.heart.org/-/media/files/health-topics/high-blood-pressure/consequences-of-high-blood-pressure-infographic-pdf-ucm_464947.pdf

Arnett D.K., Blumenthal R.S., Albert M.A., Buroker A.B., Goldberger Z.D., Hahn E.J., Himmelfarb C.D., Khera A., Lloyd-Jones D., McEvoy J.W., Michos E.D., Miedema M.D., Muñoz D., Smith S.C., Virani S.S., Williams K.A., Yeboah J. y Ziaeian B. 2019. ACC/AHA Guideline on the primary prevention of cardiovascular disease. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Circulation.140:e596-e646.

Ashraf M., Paninjath G. y Kotha P.K. 2018. A comparative study of risk factors of cardiovascular diseases in young adults with family history of hypertension/diabetes mellitus. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences. 7(52):5492-5496.

Asgary S., Rastqar A. y Keshvari M. 2018. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. Journal of the American College of Nutrition. DOI: 10.1080/07315724.2017.1410867

Aspri M., Leni M., Galaverna G. y Papademas P. 2018. Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.119

Atlas S.A. 2008. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy. 13(8):S9-S20

Badimon L. y Vilahur G. 2008. Enfermedad aterotrombótica coronaria: avances en el tratamiento antiplaquetario. Revista Española de Cardiología. 61(5):501-513.

Beltrán-Barrietos L.M., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A., Torres-Inguanzo E.H., Astiazarán-García H., Esparza-Romero J. y Vallejo-Córdoba B. 2018a. Randomized double-blind controlled clinical trial of the blood pressure–lowering effect of fermented milk with *Lactococcus lactis*: A pilot study. Journal of Dairy Science. 101:1–7.

Beltrán-Barrientos L.M., Hernández-Mendoza A., González-Córdova A.F., Astiazarán-García H., Esparza-Romero J. y Vallejo-Córdoba B. 2018b. Mechanistic pathways underlying the antihypertensive effect of fermented milk with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 in spontaneously hypertensive rats. Nutrients. 10:262.

Beltrán-Barrientos L.M., Hernández-Mendoza A., Torres-Llanez M.J., González-Córdova A.F. y Vallejo-Córdoba B. 2016. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of Dairy Science. 99:4099–4110.

Benítez-Romero L. 2013. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de queso de Poro genuino de Balancán, Tabasco. Tesis profesional. Universidad Autónma Chapingo.

Borghia C., Rodriguez-Artalejob F., De Backerd G., Dallongevillee J., Medinaf J., Guallarg E., Perkh J., Banegasb J.R., Tubachi F., Royi C. y Halcoxm J.P. 2016. The association between blood pressure and lipid levels in Europe: European study on cardiovascular risk prevention and management in usual daily practice. Journal of Hypertension. 34(11):2155-2163

Carbonell-Capella J.M., Buniowska M., Barba F.J., Esteve M.J. y Frígola A. 2014. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 13:155-171.

Carey R.M. y Siragy H.M. 2003. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocrine Reviews. 24(3):261–271.

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

Chang O.K., Seol K.H., Jeong S.G. Oh M.H., Park B.Y., Perrin C. y Ham J.S. 2013. Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. Journal of Dairy Science. 96(9):5544–5555.

Chen M.L., Shah V., Patnaik R., Adams W., Hussain A., Conner D., Mehta M., Malinowski H, Lazor J., Huang S., Hare D., Lesko L., Sporn D. y Williams R. 2001. Bioavailability and bioequivalence: An FDA regulatory overview. Pharmaceutical Research. 18(12):1645-1650.

Chen D., Wang S., Diao X., Zhu Q., Shen H., Han X., Wang Y., Gong G. y 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.

Chen L., Zhang Q., Jib Z., Shu G. y Chen H. 2018. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. Food Science and Technology. 91:532–540.

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(2):881-888.

Companys J., Pla-Pagà L., Calderón-Pérez L., Llauradó E., Solà R., Pedret A. y Valls R.M. 2020. Fermented dairy products, probiotic supplementation, and cardiometabolic diseases: A

systematic review and meta-analysis. Advances in Nutrition. Nmaa030. DOI: 10.1093/advances/nmaa030

Corral P y Schreier L. 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. Clínica e Investigación en Arteriosclerosis. 26(2):78-84.

Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A. y Steele J.L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 76:217–246.

Cushman D.W. y Cheung H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochemistry and Pharmacology. 20:1637-1648.

Díaz-Aragón A., Fernández-Barros C.L., Enciso-Muñoz J.M., Ceballos-Reyes G., Gutiérrez-Salmeán G., León-Hernández F.J., Jiménez-Orozco J.H., Ramos-Corrales M.A., Gómez-Álvarez E., Puente-Barragán A., Alcocer-Chauvet A. y Meaney E. 2018. Posicionamiento en torno al diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. Revista Mexicana de Cardiología. 29(3):148-168.

Dominiczak M.H. 2011. Lipoproteínas y transporte de lípidos. En: Bioquímica Médica. Baynes J.W. y Dominiczak M.H. Elsevier. España. 219-236.

Douglas G. y Channon K.M. 2014. The pathogenesis of atherosclerosis. Medicine. 42(9):480–484.

Ebringer L., Ferencik M. y Krajcovic J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. Folia Microbiologica. 53(5):378–394.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2018. Presentación de resultados. Disponible en línea: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf

Fitz-Gerald R.J., Murray B.A. y Walsh D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. Journal of Nutrition. 134:980S–988S.

Gaertner F. y Massberg S. 2016. Blood coagulation in immunothrombosis - At the frontline ofintravascular immunity. Seminars in Immunology. 28(2016):561–569.

González-Córdova A.F., Torres-Llanez M.J., Rodríguez-Figueroa J.C., Espinosa de los Monteros J.J., García H.S. y Vallejo-Córdoba B. 2011. Actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina en leches fermentadas con cepas de *Lactobacillus*. Journal of Food. 9(2):146-151.

Grundy S.M. 1995. Atherogenic dyslipidemia: upoprotein abnormalities and implications for therapy. American Journal of Cardiology. 75:45B-52B.

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.

Heaney R.P. 2001. Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. American Society for Nutritional Sciences. 1344s-1348s.

Heredia-Castro P., Méndez-Romero J.I., Hernández-Mendoza A., Acedo-Félix E., González-Córdova A.F. y Vallejo-Cordoba B. 2015. Antimicrobial activity and partial characterization

of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. Journal of Dairy Science. 98:8285–8293.

Hernández-Ledesma B., Amigo L., Ramos M. y Recio I. 2004. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52:1504–1510.

Hernández-Ledesma B., Contreras M. y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Advances in Colloid and Interface Science. 165(1):23-35.

Hill D., Sugrue I., Arendt E., Hill C., Stanton C. y Ross P.R. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. F1000Research. 6(F1000 Faculty Rev):751.

Holst B. y Williamson G. 2008. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. Current Opinion in Biotechnology. 19:73–82.

Instituto Méxicano del Seguro Social (IMSS). 2016. Diagnóstico y tratamiento de dislipidemias (hipercolesterolemia) en el adulto. Disponible en línea: http://imss.gob.mx/profesionales-salud/gpc

Instituto Nacional de Cardiología (INC). 2019. Estadísticas: causas de mortalidad Enero-Marzo (2019). Instituto Nacional de Cardiología y Secretaria de Salud. Disponible en línea: www.cardiologia.org.mx

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2019. Características de las defuciones registradas en México durante 2018. Comunicado de prensa núm. 538/19.

Jiang Z., Tian B., Brodkorb A. y Huo G. 2010. Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. Food Chemistry. 123:779–786.

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 descomposition in humans. The Journal of Nutrition. 142: 245-250.

Korhonen H. y Pihlanto A. 2007. Technological options for the production of health promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. Current Pharmaceutical Design. 13:829-843.

Kulkarni U.V. y Broom I. 2011. Función del tracto gastrointestinal. En: Bioquímica Médica. Baynes J.W. y Dominiczak M.H. Elsevier. España. 115-128.

Kunji E.R.S., Mierau I., Hagting A., Poolman B. y Konings W.N. 1996. The proteotytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 70(2-4):187–221.

Lim Y., Foo H., Loh T., Mohamad R. y Abdullah N. 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. Journal of Animal Science and Biotechnology. 10, 15. DOI: 10.1186/s40104-019-0323-z

Liu M., Bayjanov J.R., Renckens B., Nauta A. y Siezen R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. BMC Genomics. 11(36):1-15.

Lowe M. 2013. Hemostasia y trombosis. En: Bioquímica Médica. Baynes J.W. y Dominiczak M.H. Elsevier. España. 73-85.

Ma T., Kam K., Yan B. y Lam Y. 2010. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: current status. British Journal of Pharmacology. 160:1273-1292.

Maeno M., Yamamoto N. y Takano T. 1996. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. Journal of Dairy Science. 79(8):1316-1321.

Mackman N., Tilley R.E. y Key N.S. 2007. Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 27(8):1687–1693.

Matsui T., Tamaya K., Seki E., Osajima K., Matsumo K. y Kawasaki T. 2002. Absorption of Val-Tyr with *in vitro* angiotensin i-converting enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of mild hypertensive subjects. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 25:1228–1230.

Martínez-Sánchez S.M., Gabaldón-Hernández J.A. y Montoro-García S. 2020. Unravelling the molecular mechanisms associated with the role of food derived bioactive peptides in promoting cardiovascular health. Journal of Functional Foods. 64 (2020) 103645

Martínez-Triguero M.L., Veses-Martínb S., Garzón-Pastorb S. y Hernández-Mijaresa A. 2012. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. Medicine. 11(19):1125-9

Martirosyan D.M. y Singh J. 2015. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?. Functional Foods in Health and Disease. 5(6):209-223.

Mitrovic I. 2010. Trastornos cardiovasculares: enfermedad del corazón. Stephen J. y Hammer G. (6ª edición). Fisiopatología de la enfermedad. Una introducción a la medicina clínica (pp. 285-298). Mc Graw Hill.

Moriya J. 2018. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. Journal of Cardiology. 73(1):22-27.

Mulero J., Zafrilla P., Martinez-Cachá A., Leal M. y Abellán J. 2011. Péptidos bioactivos. Clinica e Investigación en Arteriosclerosis. 23(5):219-227.

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 β-Lactoglobulin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 281:11-17.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. y Takano T. 1995. Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitors from sour milk. Journal Dairy Science. 78(1):777-783.

Núñez-Cortés JM., Botet-Montoya JP., Pintó-Sala X. y Residual Risk Reduction Initiative (R3i) y Grupo de Trabajo sobre Dislipemia Aterogénica. Dislipidemia aterogénica y riesgo residual. 2014. 26(6):287-292.

Ondetti M.A. y Cushman D.W. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science. 196:441-444.

Ondetti M.A. y Cushman D.W. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. Annual Review of Biochemistry. 51:283-308

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS). 2011. Norma del codex para leches fermentadas. CODEX STAN 243-2003. Codex Alimentarius. Segunda edición. 6-16.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2013. A global brief on Hypertension. Silent killer, global public health crisis. Disponible en línea: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Preguntas y respuestas sobre la hipertensión. Recuperado de: https://www.who.int/features/qa/82/es/

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2017. Enfermedades cardiovasculares (Nota descriptiva). Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2019. Hipertensión. (Nota descriptiva). Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension

Pocovi-Mieras M., Mozas-Alonso P. y Cía-Gómez P. 2004. Hiperlipidemias: concepto, clasificación y mecanismo etiopatogénico. Hiperlipidemias primarias. Medicine. 9(18):1089-1104.

Paul M., Mehir A.P. y Kreutz R. 2006. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. Physiological Reviews. 86:747–803.

Pihlanto A. 2013. Lactic Fermentation and Bioactive Peptides. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. 13:309-332.

Ramírez, R. J., Rosas, U. P., Velázquez, G. M., Ulloa, J. A. y Arce, R. F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente Año 2, No. 7, abril-junio.

Rein M., Renouf M., Cruz-Hernandez C., Actis-Goretta L., Thakkar S.K. y Pinto M.S. 2012. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. British Journal of Clinical Pharmacology. 75(3):588–602.

Rendón-Rosales M.A., Torres-Llanez M.J., González-Córdova A.F., Hernández-Mendoza A., Mazorra-Manzano M.A. y Vallejo-Cordoba B. 2019. *In vitro* antithrombotic and hypocholesterolemic activities of milk fermented with specific strains of *Lactococcus lactis*. Nutrients. 11:2150.

Reyes-Díaz A., Mata-Haro V., Hernández J., González-Córdova A., Hernández-Mendoza A., Reyes-Díaz R. y Vallejo-Cordoba B. 2018. Milk Fermented by Specific *Lactobacillus Strains* Regulates the Serum Levels of IL-6, TNF-α and IL-10 Cytokines in a LPS-Stimulated Murine Model. Nutrients. 10(6):691.

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 activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. Journal of Dairy Science. 93:5032–5038.

Rodríguez-Figueroa J.C., Reyes-Díaz R., González-Córdova A.F., Troncoso-Rojas R., Vargas-Arispuro I., y Vallejo-Córdoba B. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory

peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. Journal of Dairy Science. (95):5536-5543.

Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A.F., Astiazaran-García H. y Vallejo-Córdoba B. 2013a. Hypotensive and heartrate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. British Journal of Nutrition. 109:827-833.

Rodríguez-Figueroa J.C., González-Córdova A.F., Astiazaran-García H., Hernández-Mendoza A. y Vallejo-Cordoba B. 2013b. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. Journal Dairy Science. 96:4094-4099.

Rojas-Ronquillo R., Cruz-Guerrero A., Flores-Nájera A., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., Reyes-Grajeda J.P., Jiménez-Guzmán J. y García-Garibay M. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. International Dairy Journal. 26:147-154.

Rubak Y.T., Nuraida L., Iswantini D. y Prangdimurti E. 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. Veterinary World. 13(2):345-353.

Salvo F., Bezin J., Bosco-Levy P., Letinier L., Blin P., Pariente A. y Moore N. 2016. Pharmacological treatments of cardiovascular diseases: evidences from real-life studies. Pharmacological Research. 118:43-52.

Salazar-Enciso R. 2013 Evaluación in vitro de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina por extractos acuosos obtenidos de leches fermentadas con diferentes cepas de *Lactobacillus*. Tesis profesional. Instituto tecnológico de Acapulco.

Santiago-López L. 2013. Evaluación de propiedades tecnológicas y fisiológicas de bacterias potencialmente probióticas en leche. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Santiago-López L., Hernández-Mendoza A., Mata-Haro V., Vallejo-Cordoba B. y González-Córdova A.F. 2018. Immune response induced by fermented milk with potential probiotic strains isolated from artisanal Cocido cheese. Food and Agricultural Immunology 29(1):911–929.

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

Singh B.P. y Vij S. 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

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):482-496.

Taboada M. y Jiménez A.V. 2005. Fármacos hipolipemiantes en prevención cardiovascular primaria y secundaria. Atención Primaria. 36(2):40-6.

Tamime A.Y., Skriver A., Nilsson L.-E. 2006. Starter cultures. In A.Y. En Tamime (Ed), Fermented milks.). Oxford, UK: Blackwell Publishing. pp. 11–52.

Toldrá F., Reig M., Aristory M.C. y Mora L. 2018. Generation of bioactive peptides during food processing. Food Chemistry. 2067:395-404.

Torruco-Uco J.G., Domínguez-Magaña M.A., Dávila-Ortíz G., Martínez-Ayala., Chel-Guerrero L.A. y Betancur-Ancona D.A. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. Ciencia y Tecnología Alimentario. 6(2):158-168.

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.

Tuefel E. 2018. Riks factors for cardiovascular diseases. En: Ramachandram S. Y Douglas S.B. Encyclopedia of Cardiovascular Research and Medicine. Elseivier Inc. Primera edición. USA. 307-314 pp.

Tuomilehto J., Lindstrom J., Hyyrynen J., Korpela R., Karhunen M.L., Mikkola L., Jauhiainen T., Seppo L. y Nissinen A. 2004. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. Journal of Human Hypertension. 18:795–802.

Upadhyay R.K. 2015. Emerging risk biomarkers in cardiovascular diseases and disorders. Journal of Lipids. 2015:1-50.

Valenzuela A.B., Valenzuela R., Sanhueza J. y Morales G. 2014. Alimentos funcionales, nutraceúticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? Revista Chilena de Nutrición. 41(2):198-204.

Vasiliki Lagouri. 2018. Introductory Chapter: Functional Foods. Functional Foods. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.82304.

Vázquez-Ortiz, F.A., Caire G., Higuera-Ciapara, I. y Hernandez-Watanabe G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in Shrimp-J. Liquid Chromatography. 18(10):2059-2068.

Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M. y Reitsma P. H. 2013. New fundamentals in hemostasis. Physiological Reviews. 93(1):327–358.

Yamada K., Sato-Mito N., Nagata J. y Umegaki, K. 2008. Health claim evidence requirements in Japan. The Journal of Nutrition. 138(6):1192S–1198S.

Wakabayashi, H., Takase M. y Tomita M. 2003. Lactoferricin derived from milk protein Lactoferrin. Current Pharmaceutical Design. 9(16):1277–1287.

Whelton P.K., Carey R.M., Aronow W.S., Casey D. E., Collins K.J., Himelfarb C.D., DePalma S. M., Gidding S., Jamerson K.A., Jones D.W., MacLaughlin E.J., Muntner P., Ovbiagele B., Smith S.C., Spencer C.C., Stafford R.S., Taler S. J., Thomas R.J., Williams K. A., Williamson J,D., y Wright J.T. 2017. Guideline for the prevention, detection, evaluation, and managementent of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. Hypertension. 72(2):1-283.

Zárate A., Manuel-Apolinara L., Basurtoa L., de la Chesnayeb E. y Saldívara I. 2016. Colesterol y aterosclerosis. Consideraciones históricas y tratamiento. Archivos de Cardiología de México 86(2):163-169.

Zhang S.B., Wang Z. y Xu S.Y. 2008. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85:521–527.