



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

**“ACTIVIDAD INHIBIDORA DE LA ENZIMA
CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA DE LECHE
FERMENTADAS CON *Lactococcus lactis* EN UN
MODELO DE DIGESTIÓN *in vitro*”**

POR:

ALEJANDRO SANTOS ESPINOSA

TESIS APROBADA POR LA

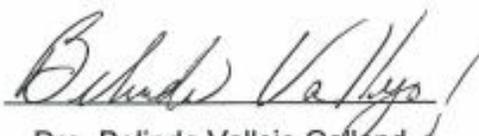
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

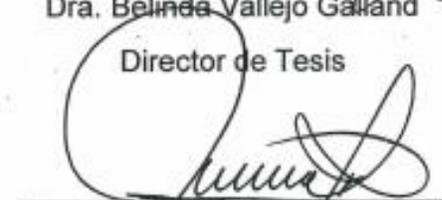
APROBACIÓN

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



Dra. Belinda Vallejo Galland

Director de Tesis



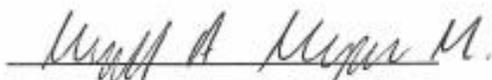
Dr. Aarón Fernando González Córdova

Asesor



Dr. Adrián Hernández Mendoza

Asesor



Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano

Asesor



Dr. Hugo Sergio García Galindo

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

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

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



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca que me otorgó para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.)**, por abrirme las puertas de sus instalaciones con el fin de ampliar mis horizontes intelectuales.

Agradecimiento especial a mi directora de tesis la **Dra. Belinda Vallejo Galland** por la posibilidad que me ha brindado de adentrarme un poco más en la investigación. Por la confianza depositada en mí, sus enseñanzas, orientaciones y contribuciones en la tesis.

Agradezco al **Dr. Aarón Fernando González Córdova, Dr. Adrián Hernández Mendoza, Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano y Dr. Hugo Sergio García Galindo** por asesorar este proyecto desde el inicio, por sus contribuciones al mismo y por formar parte del Comité de Revisión de tesis.

Muchas Gracias **Dra. María de Jesús Torres Llenez**, por todo el apoyo técnico de este trabajo, así como consejos brindados durante la fase experimental y redacción de la tesis.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Lácteos, **M.C. María del Carmen Estrada Montoya** por el asesoramiento en la fase experimental y apoyo técnico brindado a lo largo de la fase experimental. Al **M.C. Ricardo Reyes Díaz** por toda la ayuda brindada durante la redacción de la tesis y apoyo técnico durante toda la estancia de la Maestría. Muchas gracias.

Al personal de la biblioteca **Gerardo Reyna** y **Luis Conde** y personal que siempre me atendieron amablemente en todos los trámites concernientes a la Maestría, **Faly Gil Lamadrid, Laura García, Verónica Araiza** y **Argelia Marín**.

Gracias a mis compañeros de Generación: **Trinidad López, José Eleazar Aguilar, Fausto Cantú, José Isidro Méndez, José Daniel Wicochea** y **Christian Gómez**.

Agradecimiento especial a **Jesús Sosa, Priscilia Heredia** y **Trinidad López**, por todas las experiencias vividas a lo trago de nuestra estancia en el CIAD.
Gracias ☺

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio de Lácteos por el insuperable ambiente de trabajo, a **Jesús Sosa, Priscilia Heredia, Vanessa Saracho, Jesús Monzón, Aline Reyes, Lilia Beltrán, Lourdes Santiago, Olga Ramírez, Samanta Loiza, Ángeles de la Rosa, Ángel Ortiz, Martin Moreno, Trinidad López, Eleazar Aguilar, Fausto Cantú, Isidro Méndez, Daniel Wicochea, Christian Gómez, Sinaí Ojeda, Karmina Álvarez, Gesuri Nazario, Tania García, Erick Valenzuela, Maricarmen Torres, Nantly Sarahí Guzmán, Francisco Castro, Isabel Jiménez** y **Andrés Pacheco** muchas gracias.

DEDICATORIA

A **Dios** por el regalo de la vida y por cada momento vivido que ha hecho de mí una persona única y especial.

Dedicatoria especial a mi abuelita **Felipa Martínez Mortera**, fuiste alguien muy importante en mi vida, gracias por todo tu cariño y fe depositada en mí. Siempre te recordaré.

A mis padres, **Raymundo Santos Martínez** y **Andrea Espinosa Martínez**, por todo el cariño, consejos y esfuerzos realizados para que culminara la Maestría y que de forma incondicional me han apoyado en todo.

A mis hermanos, **Leticia, Raymundo** y **José Guadalupe**, ya que en las buenas y en las malas sé que siempre cuento con ellos. Gracias por todo el apoyo incondicional brindado. También dedico esta tesis a **Juan Antonio, Maribel, Ana María, José Antonio, Estrella Guadalupe, Olaf Gerardo, Amairany, María José, Josué, Dayana** y **Andrea**, quienes son parte importante de mi familia.

A mis mejores amigos **Eduardo Santiago** y **Herminio Soto**, quienes además de brindarme su amistad, siempre han estado presentes en todos los momentos importantes a lo largo de la Maestría. Siempre me han apoyado y motivado a seguir adelante.

Dedico esta tesis a **Rosa Adriana Rames Valderrama**, por todo el cariño, apoyo, motivación y nuevas experiencias que compartimos juntos. Te quiero mucho.

Gracias

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Hipertensión Arterial.....	4
2.1.1 Control de la Hipertensión.....	6
2.1.1.1 Control farmacológico.....	7
2.1.1.2 Control no farmacológico.....	8
2.1.2 Sistemas Reguladores de la Hipertensión Arterial.....	10
2.1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	11
2.2 Péptidos Bioactivos.....	13
2.2.1 Producción de Péptidos Bioactivos.....	14
2.2.1.1 Hidrólisis enzimática por enzimas digestivas.....	14
2.2.1.2 Procesamiento de alimentos.....	15
2.2.1.3 Fermentación microbiana.....	15
2.2.2 Actividad Biológica.....	17
2.2.3 Estabilidad Gastrointestinal.....	19
2.3 Péptidos Inhibidores de la ECA.....	19
2.3.1 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos.....	20
2.3.2 Péptidos Antihipertensivos.....	22
2.3.3 Péptidos Derivados de Proteínas Vegetales.....	23
2.3.4 Péptidos Derivados de Proteínas de Origen Animal.....	23
2.3.4.1 Cárnicos.....	23
2.3.4.2 Productos del mar.....	24
2.3.4.3 Huevo.....	24
2.3.4.4 Productos lácteos.....	24
2.3.4.5 Péptidos inhibidores de la ECA en leche fermentada con <i>Lactococcus lactis</i>	26
III. HIPÓTESIS.....	28

CONTENIDO (continuación)

IV.	OBJETIVOS	29
4.1	General	29
4.2	Particulares	29
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1	Medios de Cultivo y Reactivos.....	30
5.2	Cepas y Condiciones de Propagación	30
5.3	Preparación del Inóculo y Fermentación de la Leche	31
5.4	Capacidad Acidificante y Producción de Ácido Láctico.....	32
5.5	Determinación de la Actividad Proteolítica.....	32
5.6	Obtención de Extractos Acuosa (< 3 kDa)	33
5.7	Ensayo <i>in vitro</i> de la Inhibición de la ECA de los Extractos Acuosa	33
5.8	Evaluación de la IECA en un Modelo de Digestión <i>in vitro</i>	34
5.9	Análisis Estadístico.....	37
VI.	RESULTADOS Y DISCUSION	38
6.1	Cinéticas de Crecimiento.....	38
6.2	pH y Acidez Titulable	39
6.3	Evaluación de la Actividad Proteolítica	41
6.4	Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina	42
6.5	Contenido Peptídico e IC ₅₀	44
6.6	Simulación Gastrointestinal	47
VII.	CONCLUSIÓN.....	49
VIII.	REFERENCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema Renina-Angiotenina-Aldosterona.	12
2	Efecto de la ECA sobre las arterias.	13
3	Modelo de interacción del centro activo de la ECA.	21
4	Curva de crecimiento de las cepas de <i>Lactococcus lactis</i> en medio suplementado con lactosa y glucosa.	38
5	Evolución del pH durante la fermentación de la leche por cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .	40
6	Evolución de la acidez titulable durante la fermentación de la leche con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .	41
7	Actividad proteolítica de leche fermenta con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> después de 48 h de fermentación.	42
8	Porcentaje de inhibición de la ECA de la leche fermentada con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .	44
9	Contenido de nitrógeno peptídico de la leche fermentada con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> .	46
10	IC ₅₀ de la leche fermentada con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> en dos tiempos de fermentación.	46
11	Porcentaje de inhibición de la ECA de la leche fermentada con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> posterior a la simulación gastrointestinal.	47
12	Comparación de los valores de IC ₅₀ de los extractos de leche fermentada con cepas de <i>Lactococcus lactis</i> en los dos tiempos de fermentación antes y después de la simulación gastrointestinal.	48

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18 años.	5
2	Sistemas reguladores de la presión arterial.	11
3	Péptidos bioactivos y sus efectos saludables.	18
4	Actividad inhibidora de ECA de proteínas lácteas.	20
5	Estudios realizados con péptidos inhibidores de la ECA.	27
6	Cepas de <i>Lactococcus lactis</i> empleadas en el estudio.	31
7	Mezcla de reacciones y controles para evaluar la inhibición de la ECA de los extractos acuosos de leches fermentadas.	33
8	Composición (de un 1 litro solución) de los diferentes fluidos digestivos empleados en el modelo gastrointestinal simulado.	36

RESUMEN

En los últimos años se ha demostrado que la actividad proteolítica de las bacterias ácido lácticas (BAL) que intervienen en la fermentación de la leche, contribuye a la generación de péptidos potencialmente antihipertensivos (PPA). Dicha actividad proteolítica es específica de cada tipo de BAL, por lo que la capacidad de producir PPA es cepa dependiente. La actividad antihipertensiva de éstos péptidos ha sido asociada principalmente a su capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), enzima que juega un papel fundamental en la regulación de la presión arterial. Sin embargo, recientes investigaciones han evaluado la actividad inhibidora de la ECA de fracciones peptídicas ante condiciones del sistema gastrointestinal y con ello poder predecir si podrán conservar su efecto a nivel fisiológico. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos (< 3 kDa) obtenidos a partir de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅), y evaluar dicha actividad ante la exposición a enzimas gastrointestinales en un modelo *in vitro*. Los resultados mostraron que la actividad inhibidora de la ECA en extractos acuosos (<3 kDa) aumentó significativamente ($p < 0.05$) y el IC₅₀ (concentración peptídica requerida para inhibir a la ECA en un 50%) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) conforme transcurrió el tiempo de fermentación de la leche. Los extractos acuosos que presentaron menores valores de IC₅₀ fueron los obtenidos a las 48 h de fermentación a partir de la cepa R₁, (8.7 µg/mL). Además, los obtenidos a partir de las cepas Q₂, Q₃ y Q₅ presentaron valores de IC₅₀ menores a 16 µg/mL y no fueron significativamente ($p > 0.05$) diferentes. Por otro lado, los extractos acuosos (< 3 kDa) que presentaron valores de IC₅₀ menores a 21 µg/mL aún después de la simulación gastrointestinal correspondieron a las cepas Q₂ y Q₃. Por lo anterior, las leches fermentadas por estas dos cepas podrían presentar actividad inhibidora de la ECA a nivel fisiológico y ejercer un efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo*.

Palabras clave: ECA, hipertensión, leche fermentada, *Lactococcus lactis*, proteólisis, estabilidad gastrointestinal.

ABSTRACT

In recent years it has been demonstrated that the proteolytic activity of the lactic acid bacteria (LAB) involved in the fermentation of milk, contributes to the generation of potentially antihypertensive peptides (PPA). Said proteolytic activity is specific to each type of BAL, so the ability to produce PPA is strain dependent. The antihypertensive activity of these peptides has been associated mainly to its ability to inhibit angiotensin converting enzyme (ACE), an enzyme that plays a fundamental role in regulating blood pressure. However, recent research has evaluated the ACE inhibitory activity of peptide fractions to conditions of the gastrointestinal system and thus to predict whether they will retain their effect on the physiological level. Therefore, the objective of this research was to determine the ACE inhibitory activity of aqueous extracts (<3 kDa) obtained from fermented milk with *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ and Q₅), and evaluate the activity when exposed to gastrointestinal enzymes in an in vitro model. The results showed that the ACE inhibitory activity in aqueous extracts (<3 kDa) was significantly increased ($p < 0.05$) and IC₅₀ (peptide concentration required to inhibit ACE by 50%) decreased significantly ($p < 0.05$) as elapsed time of fermentation of milk. The aqueous extracts showed lower IC₅₀ values were obtained at 48 h of fermentation of the R₁ strain, (8.7 µg/mL). In addition, those obtained from strains of the Q₂, Q₃ and Q₅ IC₅₀ values were less than 16 µg/mL and were not significantly ($p > 0.05$) different. Furthermore, aqueous extracts (<3 kDa) that had IC₅₀ values less than 21 µg/mL even after gastrointestinal simulation corresponded to Q₂ and Q₃ isolates. Therefore, milks fermented by these two strains could present ACE inhibitory activity at physiological levels and exert antihypertensive effect in an in vivo model.

Keywords: ACE, hypertension, fermented milk, *Lactococcus lactis*, proteolysis, gastrointestinal stability.

I. INTRODUCCIÓN

El acelerado estilo de vida del ser humano ha generado importantes cambios en materia alimentaria a nivel mundial, estos cambios incluyen hábitos alimenticios, muchas veces poco saludables, los cuales junto con sedentarismo y el estrés han inducido al incremento de enfermedades crónico degenerativas, como la hipertensión arterial (Sarmiento, 2006). Esta enfermedad es actualmente una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Se estima que provoca 7.5 millones de muertes a nivel mundial, aproximadamente el 12.8% de las muertes anuales (OMS, 2012).

Recientes investigaciones han demostrado que la enzima convertidora de angiotensina (ECA) juega un papel importante en la regulación de la presión arterial a través de dos reacciones diferentes en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Fleming, 2006). Primero, la ECA afecta la presión arterial mediante la conversión de angiotensina I a angiotensina II, la angiotensina II se une a los receptores AT_1 de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos, provocando una vasoconstricción. Segundo, la angiotensina II estimula la secreción de aldosterona, hormona que promueve la reabsorción de agua y sodio, que en conjunto elevan el fluido corporal y por lo tanto la presión arterial. Adicionalmente, la ECA hidroliza la bradiquinina, péptido vasodilatador que relaja los vasos sanguíneos a través de la estimulación de la producción de óxido nítrico, por lo tanto la inhibición de la ECA representa un medio eficaz para controlar la hipertensión (Dasgupta y Zhang, 2011; Izzo y Weir, 2011).

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias para lograr el control de la hipertensión a través de la inhibición de la ECA, incluyendo el uso de fármacos y alimentos específicos, tales como los alimentos funcionales (Chen *et al.*, 2009). Dentro de estos alimentos se encuentran aquellos que contienen péptidos con capacidad antihipertensiva, ya que muestran actividad de inhibición de la ECA sin causar efectos secundarios (Baró *et al.*, 2001; Wang y González, 2005).

En general los péptidos antihipertensivos son pequeñas cadenas peptídicas compuestas por hasta 20 residuos de aminoácidos que pueden ser liberados de la proteína precursora (*e.g.* productos lácteos, huevo, soya) por la acción de las enzimas proteolíticas intrínsecas de la materia prima o del tracto gastrointestinal, o por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL), provenientes de fuentes exógenas (Vioque *et al.*, 2000).

Dichas BAL (*e.g.* *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*) son capaces de producir péptidos antihipertensivos durante su crecimiento en la leche (fermentación) por la acción de las proteasas extracelulares, proteinasas de la pared celular y peptidasas intracelulares (Korhonen y Pihlanto, 2006). Sin embargo, las condiciones de fermentación y la actividad proteolítica específica de cada cepa modulan la producción de péptidos inhibidores de ECA (Otte *et al.*, 2011). Dentro de los péptidos que se han obtenido a partir de leche fermentada se encuentran las secuencias VPP e IPP, las cuales han demostrado conservar su capacidad inhibidora de la ECA, aun después de haber sido sometidas a condiciones gastrointestinales simuladas; no obstante aún no es claro si estos péptidos son capaces llegar hasta el órgano diana en condiciones *in vivo* (Kajimoto *et al.*, 2001; Jing *et al.*, 2014).

Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han reportado que cepas específicas de *Lactococcus lactis* pueden producir péptidos con actividad antihipertensiva durante la fermentación de la leche (Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010; 2013a,b).

Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos relativos a la especificidad de las cepas, a los mecanismos de acción de los péptidos antihipertensivos generados, y sobre todo, a la estabilidad gastrointestinal de los péptidos una vez que son ingeridos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos (< 3 kDa) obtenidos a partir de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅), y evaluar dicha actividad después de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Hipertensión Arterial

El sistema cardiovascular está formado por el corazón, que actúa como una bomba que impulsa la sangre para que circule por todo el organismo, y una red de arterias, venas y capilares que transportan y distribuyen la sangre por todos los tejidos. La función primaria de este sistema es la de conducir el oxígeno y otras sustancias nutritivas hacia todas las células del cuerpo, así como los productos residuales a los órganos a través de los cuales son eliminados (Martínez, 2000).

La presión arterial es la presión que ejerce la sangre contra la pared de los vasos sanguíneos. Se diferencia en dos subtipos: la presión arterial sistólica (PAS) y la presión arterial diastólica (PAD). La PAS se genera por la sístole ventricular que bombea la sangre del corazón y la PAD corresponde a la presión arterial durante la diástole ventricular (McArdle *et al.*, 2004).

Debido a que en sístole la sangre es expulsada con mucha fuerza, esta ejerce más presión y, por ello, PAS es mayor que PAD. En un adulto, los valores normales deben ser inferiores a 140 mm Hg durante la sístole ventricular y decaen hasta valores menores de 90 mm Hg en la diástole ventricular; aunque los valores óptimos son de 120/80 mm Hg, respectivamente (Merí, 2005).

La Hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad sistémica que consiste en la elevación crónica de la presión arterial por encima de los valores normales. Es decir, cuando las cifras de PAS son ≥ 140 mm Hg y la PAD ≥ 90 mm Hg (López-Jaramillo *et al.*, 2013). De acuerdo al Séptimo Informe del Comité Nacional sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial (JNC7, por sus siglas en inglés) emitido en 2003, la presión sanguínea en adultos se clasifica de la siguiente manera de acuerdo a los valores de PAS y PAD (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de la presión arterial para adultos mayores de 18 años según el JNC7

Categoría	Presión arterial sistólica (mm Hg)	Presión arterial diastólica (mm Hg)
Normal	< 120	< 80
Normal alta	120-139	80-89
Hipertensión (Estado 1)	140-159	90-99
Hipertensión (Estado 2)	≥ 160	≥ 100

(Chobanian *et al.*, 2003)

Además de que la hipertensión arterial es considerada una de las mayores causas de mortalidad a nivel mundial, también es un factor de alto riesgo implicado en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares tales como: arterosclerosis cardiovascular, morbimortalidad por eventos cardíacos, eventos cerebrovasculares, insuficiencia renal y enfermedad vascular periférica (Erdmann *et al.*, 2008).

En México, la prevalencia de la hipertensión, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), es de 33.3% en hombres y 30.8% en mujeres. Este padecimiento en su fase inicial es asintomático, lo que dificulta una detección oportuna e incrementa los factores de riesgo asociados al inicio de tratamientos de control tardíos (INSP-Instituto Nacional de Salud Pública, 2012).

Los factores que detonan la hipertensión arterial son diversos, por lo que se considera una enfermedad multifactorial. Algunos factores obedecen a cuestiones hereditarias y hábitos de vida, mientras que otros pueden ser activados por otras patologías (McPhee *et al.*, 2001). Entre las causas más importantes se encuentran la predisposición genética, el envejecimiento, el sobrepeso, el estilo de vida y la nutrición, el índice de colesterol elevado, la diabetes y la falta de actividad física (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2010). Además se ha señalado que el consumo de sal, alcohol, café y tabaco, así como la resistencia vascular, la hemodinámica circulatoria, la función renal y factores hormonales, también podrían convertirse en causantes de la hipertensión arterial (Mataix, 2002).

2.1.1. Control de la Hipertensión

La elevada prevalencia de la hipertensión arterial a nivel mundial y el aumento progresivo de la población de edad superior a 60 años, edad en la que es frecuente, hace que el control de la hipertensión arterial sea un objetivo fundamental a la hora de reducir la carga de morbilidad cardiovascular en la población. Se estima que el 66.8% de las muertes por enfermedades cardiovasculares ocurridas está relacionado con la HTA y el 58% es directamente atribuible a ella (Armario *et al.*, 2009).

Estudios han evidenciado que un descenso de 4 mm Hg de PAS, y 2 mm Hg de PAD puede reducir en un 27% el ictus (enfermedad cerebrovascular que afecta a los vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro), un 35% los eventos cardíacos, un 32% los coronarios, y un 33% la muerte cardiovascular. Este descenso de la presión arterial denota un claro beneficio, por lo cual, es fácil entender la importancia de corregir este factor de riesgo (Liu *et al.*, 2005).

Para tomar la decisión acerca de qué tipo de tratamiento es el más adecuado, se debe considerar la magnitud de la presión arterial, la presencia de otros factores

de riesgo cardiovascular, y la presencia de daño de órganos blanco. Si la modificación del estilo de vida para la prevención y control de la HTA es insuficiente, o si el paciente presenta una hipertensión etapa 1 con repercusión orgánica, diabetes asociada a la hipertensión o una hipertensión en etapa 2, es recomendable el tratamiento farmacológico (Chobanian *et al.*, 2003).

2.1.1.1 Control farmacológico. Actualmente, la única forma de controlar la hipertensión arterial era usando medicamentos reductores de la presión arterial. Tales medicamentos actúan como vasodilatadores, diuréticos, bloqueadores de calcio y bloqueadores de los receptores de angiotensina II (Hernández *et al.*, 2009). Algunos de los fármacos antihipertensivos más empleados son los siguientes:

- ✓ **β -bloqueadores:** actúan bloqueando los receptores cardíacos β -1, impidiendo el aumento de la contractibilidad y frecuencia cardíaca mediada por el sistema autonómico simpático, impidiendo el aumento del débito cardíaco, disminuyendo la presión arterial. Ejemplos: Atenolol, Metoprolol, Nadolol.

- ✓ **Diuréticos:** actúan a nivel renal, aumentando la excreción de sodio y así disminuyendo la volemia y el volumen circulante de este mineral; al disminuir este volumen disminuye la sangre que llega al corazón para cada bombeo disminuyendo el gasto cardíaco y así disminuyendo la presión arterial. Ejemplos: Hidroclorotiazida, Furosemida, Indapamida.

- ✓ **Vasodilatadores o bloqueadores de los canales de calcio:** actúan bloqueando el mecanismo de contracción arterial, disminuyendo consiguientemente la resistencia sistémica y así disminuyendo la presión arterial. Ejemplos: Nifedipina, Diltiazem, Verapamilo

- ✓ **Bloqueadores del receptor de angiotensina II:** evitan que la angiotensina II actúe sobre la musculatura lisa (y no ocurra

vasoconstricción) y también sobre la estimulación que produce la liberación de aldosterona en la glándula suprarrenal. Ejemplos: Losartan, Candesartán.

- ✓ **Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina:** inhiben la conversión de angiotensina I a II, es uno de los fármacos más empleados. Ejemplos: Enalapril, Captopril, Cilazapril.

Los tratamientos modernos incluyen bloqueadores adrenérgicos e inhibidores de la ECA (Hernández *et al.*, 2009). Dependiendo del tipo de inhibidor, se puede producir inhibición competitiva o no competitiva. Los inhibidores competitivos compiten con el sustrato por el centro activo de la enzima. En este caso, el aumento en la concentración del sustrato da lugar a una disminución de la capacidad del inhibidor para competir con éste. Los inhibidores no competitivos se unen a la enzima en una zona diferente al centro activo, deformándolo, de manera que impide el enlace con el sustrato, siendo este tipo de inhibición independiente de la concentración de sustrato (Hernández *et al.*, 2005).

Investigaciones han alertado que ciertos inhibidores de la ECA como: Benazepril (Lotensin[®]), Captopril (Capoten[®]), Enalapril/Enalaprilat (Vasotec[®] oral e inyectable), Fosinopril (Monopril[®]), Lisinopril (Zestril[®] y Prinivil[®]), Moexipril (Univasc[®]), Perindopril (Aceon[®]), Quinapril (Accupril[®]), Ramipril (Altace[®]) y Trandolapril (Mavik[®]), empleados durante el primer trimestre de embarazo, pueden estar asociados con el incremento de riesgo de malformaciones congénitas del recién nacido; hipotensión, incremento de niveles de potasio, reducción de la función renal, angioedema, tos y erupciones en la piel (Cooper *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, ha surgido el interés por identificar alternativas que puedan tener un efecto benéfico en la reducción de la presión arterial sin tener efectos adversos al organismo.

2.1.1.2 Control no farmacológico. Las medidas no farmacológicas están dirigidas a cambiar el estilo de vida y deben ser instauradas en todos los hipertensos o

individuos con presión arterial normal-alta, ya sea como tratamiento de inicio (riesgo añadido bajo-moderado) o bien, como complemento del tratamiento farmacológico antihipertensivo. El propósito de dichas medidas es reducir la presión arterial y prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Guía española de hipertensión arterial, 2005).

En todo paciente hipertenso, y más si padece de otros factores de riesgo, deberían aconsejarse las siguientes medidas para modificar el estilo de vida, ya que si se llevan a cabo de manera eficiente pueden controlar por sí solas la hipertensión, y/o reducir el número y dosificación de medicamentos antihipertensivos necesaria para un buen control de la presión arterial. Dentro de las prácticas cotidianas que pueden ayudar a regular y mantener valores óptimos de presión arterial, están la actividad física y una dieta equilibrada (Mendoza *et al.*, 2008).

La actividad física es un factor favorable para el buen mantenimiento del sistema cardiovascular. El ejercicio físico aeróbico tiene un moderado efecto antihipertensivo (reducción de 3-4 mm Hg de PAS), aunque combinado con la restricción calórica se logran mayores efectos, tanto en la reducción de la presión arterial como en el mantenimiento de un peso bajo (Sosa, 2010).

Los ejercicios que son recomendados para reducir los niveles de la presión arterial son por naturaleza moderados en intensidad y de larga duración, se deben de realizar al menos tres veces por semana y con activación de todas las extremidades del cuerpo. Se asume que estos deben ser agradables y no requieren en ningún momento esfuerzos vigorosos o extenuantes. En esta categoría encajan ejercicios tales como caminar, trotar, nadar, correr, patinar, bailar, montar en bicicleta, entre otros (Secretaría de Salud, 2010).

La Dieta DASH (acrónimo de "Dietary Approaches to Stop Hypertension") o enfoques alimenticios para detener la hipertensión, es un régimen que apuesta por una dieta baja en sodio, con gran cantidad de frutas, verduras, productos

lácteos bajos en grasa, cereales integrales, legumbres, semillas, carnes magras, pescados, y nueces, y que limita el consumo de grasas saturadas, las carnes rojas, dulces y bebidas que contienen azúcar. Este patrón de alimentación fue diseñado básicamente para normalizar la presión arterial en pacientes con hipertensión, y una gran cantidad de datos podría confirmar sus efectos benéficos sobre los niveles de presión arterial (Bhupathiraju y Tucker, 2011).

En comparación con las dietas habituales, la dieta DASH proporciona cantidades inferiores de grasa total, grasa saturada, y colesterol de la dieta, mientras que proporciona una mayor cantidad de potasio, de calcio, de magnesio, fibra y proteína. Por lo tanto, algunos estudios han propuesto otros efectos útiles de este enfoque de la dieta, tales como la reducción de la resistencia a la insulina y el control de azúcar en la sangre en ayunas y los perfiles de lípidos; sugiriendo así que es un buen patrón de dieta para la prevención de las enfermedades cardiovasculares (Azadbakht *et al.*, 2011; Salehi-Abargouei *et al.*, 2013).

De forma general, el consumo de alimentos que ayudan a mejorar la salud, pudiendo incluirse los alimentos funcionales, y un régimen de actividad física se pueden considerar como alternativas viables para reducir la hipertensión arterial (De la Sierra *et al.*, 2008).

2.1.2 Sistemas Reguladores de la Hipertensión Arterial

A nivel sistémico existen diferentes mecanismos que actúan como reguladores de la presión arterial, dentro de ellos hay sistemas que aumentan la presión arterial (sistemas presores) o que la disminuyen (sistemas depresores), debiendo haber un equilibrio entre estos dos para la óptima regulación de la presión arterial (Maicas *et al.*, 2003).

Muchos mecanismos fisiológicos están implicados en el mantenimiento de la presión arterial y su alteración juega un rol muy importante en el desarrollo de la

enfermedad. Estos mecanismos van desde anomalías funcionales y estructurales (tabla 2), incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo y la deficiencia de vasodilatadores (Prostaciclina, el Óxido Nítrico) actúan como mediadores de la resistencia vascular periférica (Beevers *et al.*, 2001).

Tabla 2. Sistemas reguladores de la presión arterial

Sistemas presores	Sistemas depresores
Aumento de la resistencia Angiotensina II Norepinefrina Epinefrina Vasopresina Endotelina Tromboxano A ₂ Neuropeptido Y	Disminución de la resistencia Bradikinina Óxido nítrico Péptido atrial natriurético Prostaglandinas Prostaciclina

Modificado de Maicas *et al.*, 2003

Actualmente, diversos estudios consideran el tejido endotelial como uno de los principales órganos de regulación vascular, el cual está implicado en diversos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunes (Feletou y Vanhoutte, 2006). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones acerca de los mecanismos que influyen para la alteración de la presión arterial se basan en alteraciones del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA)

2.1.3 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es uno de los sistemas de regulación central de la presión arterial sanguínea y la patogénesis de la hipertensión está estrechamente asociada con desórdenes del SRAA (Matsui *et al.*, 2002). Este sistema estimula la activación simpática de secreción de renina por las células yuxtarglomerulares (Brown y Vaughan, 1998), siendo el riñón, la principal fuente de renina activa en la circulación, aunque también se han encontrado en diversos

tejidos de animales y humanos, tales como el cerebro, glándula adrenal y glándula submandibular, entre otros (Pan y Gross, 2005).

El angiotensinógeno es una glicoproteína que se produce en el hígado y es el sustrato inicial del sistema renina-angiotensina. La renina es la enzima que reacciona con el angiotensinógeno circulante, dando lugar a un deca péptido, la angiotensina-I (Ang-I) (Scow *et al.*, 2003). La ECA rompe el enlace peptídico en la posición histidina-leucina) del c-terminal del deca péptido Angiotensina-I (inactiva) convirtiéndola en el octapéptido angiotensina-II (Ang-II), el cual es el componente activo principal del SRAA (Figura 1) (Scow *et al.*, 2003).

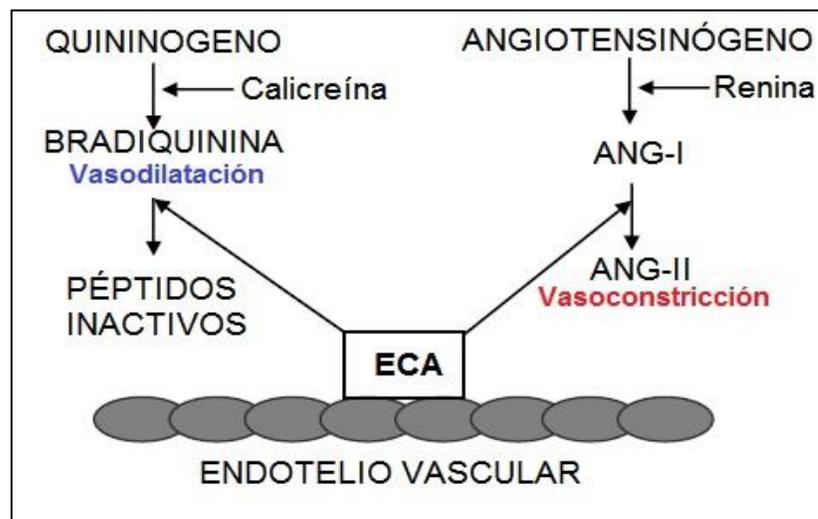


Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Adaptado de Brown y Vaughan, 1998).

La angiotensina II es un compuesto de elevada potencia vasoconstrictora. Su acción provoca la contracción rápida de las arteriolas y, por tanto, el incremento de la presión arterial, ya que estimula la secreción de aldosterona por las glándulas suprarrenales, hormona que induce la excreción de potasio (Figura 2). La retención de sodio y agua, provoca el incremento del volumen extracelular y la neutralización de la producción de renina. Este sistema es, quizás, el más importante de los diferentes mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores implicados en la regulación de la presión sanguínea (Botey, 2002).

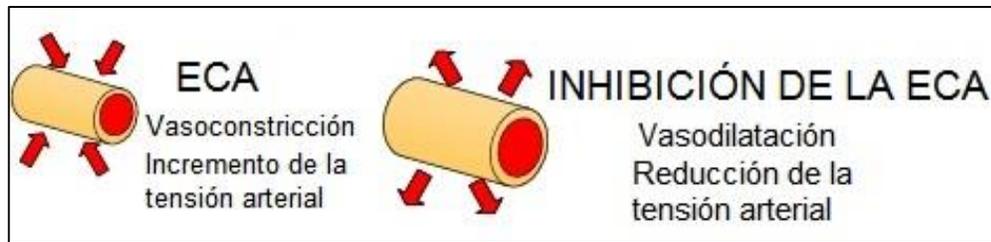


Figura 2. Efecto de la ECA sobre las arterias (adaptado de Domínguez, 2009).

La ECA actúa simultáneamente en el sistema quinina-caliceína catalizando la degradación de las bradiquininas, compuestos de potente acción vasodilatadora, y de esta manera se favorece el incremento de la presión arterial. El incremento de la disponibilidad de bradiquininas, debido a la inhibición de la ECA, puede ser parcialmente responsable del efecto benéfico de la inhibición de la ECA sobre la presión sanguínea (Mulero *et al.*, 2011); por lo que la ECA puede aumentar la presión arterial por incremento de la angiotensina II y por disminución de las bradiquininas (Johnson *et al.*, 1997).

2.2 Péptidos Bioactivos

En la actualidad, las proteínas alimentarias se investigan no sólo desde el punto de vista tecnológico, nutricional o funcional, sino como materia prima para la obtención de péptidos, ya que toda fuente de proteínas alimentarias es susceptible de aportar péptidos con propiedades bioactivas (Mulero *et al.*, 2011).

Los péptidos bioactivos, o con actividad biológica, son secuencias de aminoácidos, generalmente de tamaño pequeño (2 a 20 aminoácidos y con pesos moleculares <6 kDa). Estos se encuentran inactivos dentro de la estructura primaria de la proteína precursora, pudiendo ser liberados y activados tras la hidrólisis de la proteína a través del procesamiento (fermentación) o digestión gastrointestinal (Korhonen y Pihlanto, 2006).

Una vez ingeridos, los péptidos pueden ejercer diferentes funciones, ya sean en el sistema digestivo, inmunológico, nervioso y/o cardiovascular. Esto es debido a que hay evidencia que donde algunos péptidos pueden atravesar el epitelio intestinal y con ello llegar al torrente sanguíneo que facilita su traslado y posible efecto a nivel sistémico (FitzGerald y Meisel, 2000).

2.2.1. Producción de Péptidos Bioactivos

Los péptidos bioactivos pueden ser generados a partir de alimentos ricos en proteína. La formación de péptidos a partir de leche se puede realizar de diversas maneras: hidrólisis enzimática por enzimas digestivas, por acción de enzimas derivadas de microorganismos o plantas, así como por el procesamiento y digestión de los alimentos. Aunque diversos estudios han demostrado que combinaciones han demostrado ser eficaces para la generación de péptidos con actividad biológica (Phelan *et al.*, 2009).

2.2.1.1 Hidrólisis enzimática por enzimas digestivas. Diversos estudios han reconocido que las proteínas y péptidos en la dieta son susceptibles a la hidrólisis durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal, es decir, la ingestión, digestión y absorción. Una vez ingeridas, estas proteínas y péptidos se someten a hidrólisis por diferentes enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina y peptidasas en la superficie de las células epiteliales para liberar péptidos de diferentes longitudes (Vermeirssen *et al.*, 2004).

La utilización de enzimas de distintos orígenes (vegetales y microbianas) para hidrolizar proteínas es una de las técnicas más empleadas en la producción y caracterización de péptidos bioactivos. La liberación de los péptidos con actividad depende del sustrato, de la enzima utilizada para llevar a cabo la proteólisis, y de

las condiciones del proceso de hidrólisis tales como temperatura, pH, tiempo, entre otras (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

Con el fin de examinar el efecto que tienen las proteasas gastrointestinales sobre la liberación y degradación de péptidos inhibidores de la ECA a partir de proteínas alimentarias, se han llevado a cabo simulaciones de los procesos de digestión con proteínas vegetales, huevo, carne, pescado y leche, en donde se han encontrado que después de la simulación gastrointestinal hay diversos péptidos con actividad biológica, ya sean antioxidante o inhibidores de la ECA. Sin embargo, no se sabe cuál es la cantidad de péptidos que permanecen intactos, se liberen, o se activen después de ingestión de los alimentos, todo ello debido a la amplia especificidad de enzimas proteolíticas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011).

2.2.1.2 Procesamiento de alimentos. Los cambios químicos y estructurales que se producen durante el procesamiento de las proteínas de los alimentos pueden dar lugar a la liberación de péptidos bioactivos. En particular, el calor y / o tratamiento alcalino puede generar enlaces covalentes inter- e intra-moleculares adicionales que son resistentes a la hidrólisis. Tales condiciones de procesamiento también promueven la conversión racémica de L-aminoácidos a los D-isómeros y, por consiguiente, conducen a enlaces peptídicos indigeribles. La formación potencial de las secuencias de péptidos indigeribles durante el procesamiento de alimentos es digno de mención, ya que esto puede promover tanto la formación y absorción de los péptidos bioactivos que no se producen naturalmente en la proteína precursora. Tales péptidos bioactivos se pueden generar durante la fabricación de varios productos de leche y por lo tanto pueden ser ingeridos como componentes de los alimentos (Arihara y Ohata, 2010).

2.2.1.3 Fermentación microbiana. Se han realizado diferentes estudios relacionados con la generación de péptidos bioactivos derivados de la fermentación de diversa matrices alimentarias (Otte *et al.*, 2011). Las proteínas

de la leche han sido consideradas la fuente más importante de péptidos bioactivos, por lo que algunas BAL (iniciadoras y no iniciadoras) utilizadas en la fabricación de productos lácteos fermentados (e.g., *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* y *Streptococcus thermophilus*) han sido utilizadas para liberar dichos péptidos (Udenigwe y Aluko, 2012).

El sistema proteolítico de dichas BAL, tienen proteinasas de amplia especificidad y son capaces de liberar un gran número de diferentes oligopéptidos (4-8 aminoácidos), mediante un sistema de transporte, ruta principal para la entrada de nitrógeno en la célula y peptidasas, situado intracelular requerido para la degradación de péptidos (Singh *et al.*, 2014). En los productos lácteos fermentados la actividad autolítica puede ser deseable y con ello aumentar la producción de péptidos bioactivos. Por otra parte, la presencia de endopeptidasas específicas de prolina (PepP, PepR, PepX), liberada en el medio sobre la lisis de células aumenta la proporción de prolina C-terminal de péptidos que han sido relacionados con la bioactividad de los péptidos (FitzGerald *et al.*, 2004).

La producción de péptidos bioactivos es afectada tanto por la manipulación de las condiciones de crecimiento y la naturaleza de los microorganismos proteolíticos (o sus enzimas) utilizados (Fuglsang *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2009). Sin embargo, un aspecto que aún no ha sido explorado a fondo, es si la variedad de sus nichos ecológicos puede ofrecer variantes en la producción de péptidos bioactivos por cepas de *Lactobacillus* genéticamente relacionadas. Esto es de gran importancia práctica, dada la posibilidad de obtención de cepas con actividades proteolíticas únicas.

Comparativamente, la fermentación microbiana es el proceso más barato en lugar de la hidrólisis enzimática para la producción de péptidos bioactivos porque

los microorganismos son una fuente barata de proteasas y reconocidos como seguros. Los costos de cultivo son relativamente bajos, ya que requieren un mínimo de requisitos de nutrición y corto tiempo de crecimiento (Agyei y Danquah, 2011). De esta manera, debido al contenido proteico elevado en la leche y al diferente grado de proteólisis de las BAL es que existe una gran diversidad de péptidos con actividad biológica diferente (Torres-Llanez *et al.*, 2005).

2.2.2 Actividad Biológica

En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta que tienen una actividad biológica importante, regulando procesos fisiológicos, además de su valor nutricional (Baró *et al.*, 2001). Los diferentes efectos beneficios que estas secuencias peptídicas específicas pueden tener sobre el organismo incluyen actividad antioxidante, antimicrobiana, anticariogénica, inmoduladora, antitrombótica y antihipertensiva (tabla 3). Sin embargo, para que exista un efecto fisiológico, es necesario que estos péptidos alcancen el sitio donde ejercen su acción en el tracto intestinal o después de su reabsorción en los órganos periféricos (Segura *et al.*, 2010).

Es importante destacar que varios péptidos derivados de la leche poseen propiedades multifuncionales, es decir, secuencias específicas de péptidos que presentan dos o más actividades biológicas. Algunas regiones de la estructura primaria de β -caseína contienen secuencias las cuales presentan diferentes efectos biológicos (Gobbetti *et al.*, 2000). La actividad biológica está relacionada con el peso molecular, estructura, composición y secuencia de los aminoácidos (Pihlanto-Lepälä *et al.*, 1998).

Tabla 3. Péptidos bioactivos y sus efectos saludables

Proteína	Fracciones peptídicas	Efectos
β -CN, α_1 -CN	f(60-70), f(50-53), f(102-105)	Opioides
α_1 -CN, β -CN, κ -CN, α -La	f(1-23), β - casomorfina, Tyr- Gly-GI, Tyr-Gly	Inmunomoduladores
κ -CN Lactoferrina	f(106-116), fragmento Lys-Arg- Asp-Ser	Antitrombóticos
α_1 -CN, α_2 -CN y β -CN	Caseinofosfopéptidos	Antioxidantes
α_1 -CN, α_2 -CN	f(1-23), f(164-179) f(183-207)	Antimicrobianos
Fracciones peptídicas	IPP, VPP	Antihipertensivos

(Recopilado de Figueroa-Hernández, 2007)

Los péptidos bioactivos, debido a su origen natural, son considerados más seguros en comparación a los fármacos o aditivos alimentarios sintéticos, ya que pueden ser absorbidos fácilmente, además, son considerados compuestos de alto valor, tanto económico como nutricional (Lee *et al.*, 2010). Aunque la potencia de los péptidos derivados de la leche es menor que la de los péptidos utilizados en fármacos, los primeros podrían tener un efecto fisiológico importante debido a que la ingesta de proteínas lácteas es alta atribuible al consumo de leche y productos lácteos (Vioque y Millan, 2006).

2.2.3 Estabilidad Gastrointestinal

Diversos estudios han reconocido que las proteínas y péptidos en la dieta son susceptibles a la hidrólisis durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal, es decir, la ingestión, digestión y absorción. Una vez ingeridas, las proteínas y péptidos se someten a hidrólisis por diferentes enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, tales como pepsina, tripsina, quimotripsina y peptidasas en la superficie de las células epiteliales para liberar péptidos de diferentes longitudes (Vermeirssen *et al.*, 2004).

Estos péptidos se digieren adicionalmente por peptidasas en el borde de cepillo, en la superficie de las células epiteliales intestinales, para producir aminoácidos, mientras que algunos oligopéptidos permanecen intactos. Algunos de estos péptidos pueden ejercer una función directa en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, otros péptidos pueden ser absorbidos para llegar a los órganos y tejidos diana a través de la circulación sistémica (Shimizu, 2004).

2.3 Péptidos Inhibidores de la ECA

Varios péptidos inhibidores de la ECA han sido identificados en la digestión proteolítica de las proteínas de la leche. Los inhibidores de la ECA derivados de caseína han sido identificados dentro de las secuencias de β -caseína y κ -caseína, principalmente (tabla 4). Asimismo, también han sido derivados por digestión trípica de α 1-caseína y β -caseína de bovino (Clare y Swaisgood, 2000).

Tabla 4. Actividad inhibidora de ECA de proteínas lácteas

Proteína	Fragmento peptídico	IC ₅₀ (μmol/L)
α _{s1} -caseína	f(25-27)	2.0
	f(23-27)	6.0
α _{s2} -caseína	f(174-179)	4.3
	f(198-202)	400.0
β-caseína	f(74-76)	5.0
	f(158-175)	25.0
κ-caseína	f(185-190)	52.0
	f(25-34)	720.0
α-lactoalbúmina	f(104-108)	77.0
	f(99-108)	327.0
β-lactoglobulina	f(142-148)	42.6
	f(32-40)	635.0

Saito *et al.*, 2000

2.3.1 Relación Estructura-Actividad de los Péptidos

Diversas investigaciones han demostrado que los péptidos antihipertensivos son moléculas de tamaño pequeño (generalmente de dos a doce residuos de aminoácidos). El residuo en la posición 2 del C-terminal debe tener una configuración L para que se lleve a cabo la unión con el sitio activo de la ECA. Los cambios conformacionales (cis-tras) de la prolina en el C-terminal puede alterar significativamente la unión entre el péptido y la enzima (Hernández *et al.*, 2011).

Ondetti *et al.*, 1977, propusieron un modelo, en donde proponen que 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 (Figura 3). Una de las subunidades presenta un grupo con una carga positiva que forma un enlace iónico con el grupo carboxilo terminal del péptido. La siguiente

subunidad contiene un grupo capaz de interactuar con el enlace peptídico del aminoácido carboxilo terminal (C-terminal), probablemente mediante un puente de hidrógeno. La tercera subunidad presenta un átomo de Zn^{++} que es capaz de polarizar el grupo carbonilo del enlace peptídico entre el antepenúltimo y el penúltimo aminoácido del sustrato haciéndolo más susceptible a la hidrólisis (Ondetti y Cushman., 1982).

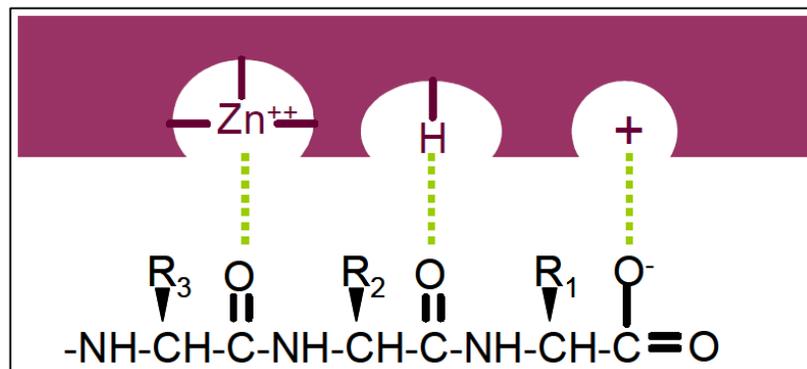


Figura 3. Modelo de interacción del centro activo de la ECA (Ondetti y Cushman., 1982).

La unión de los péptidos a la ECA está influida por la secuencia tripeptídica c-terminal de los mismos, que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la ECA (Ondetti y Cushman, 1982). Los aminoácidos de carácter hidrofóbico, como triptófano, tirosina, fenilalanina o prolina favorecen la unión a estas zonas. El péptido con secuencia C-terminal Phe-Ala-Pro, análogo al encontrado en el inhibidor presente en el extracto del veneno de serpiente, es uno de los más favorables para unirse al centro catalítico, mientras que la carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la Arginina o Lisina, respectivamente, pueden contribuir a la potencia inhibidora (Cheung *et al.*, 1980).

La presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la secuencia peptídica o de prolina como penúltimo aminoácido disminuye o anula la actividad inhibitoria de la ECA (Erdös, 1976). El extremo N-terminal también influye en la actividad, y así, la presencia de valina o de isoleucina en esta posición incrementa la actividad inhibitoria de la ECA en el péptido (Martínez, 1992).

Aunque la relación actividad/estructura de los péptidos inhibidores de la ECA aún no ha sido establecida, estos péptidos muestran algunas características comunes. La ECA tiene preferencia por sustratos o inhibidores competitivos con residuos de amino ácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadena ramificada) en cada una de las tres posiciones C-terminal, aunque la mayoría de los péptidos inhibidores contienen prolina en la posición C-terminal. Las casocininas (péptidos derivados de las caseínas) también contienen lisina o arginina en el residuo C-terminal y la carga positiva del grupo guanidino o del grupo ϵ -amino de la posición C-terminal de arginina o lisina, respectivamente, contribuyen al potencial inhibitorio. Se plantea que el mecanismo de inhibición de la ECA también involucra la interacción con sitios, que normalmente no están ocupados por sustratos o con un sitio de enlace a un inhibidor aniónico que es diferente al sitio catalítico de la enzima (Meisel, 1997).

2.3.2 Péptidos Antihipertensivos

Algunos de los péptidos reportados que muestran actividad antihipertensiva están formados por la secuencia tripéptica VPP e IPP. Estas secuencias de aminoácidos se encuentran en la estructura primaria de β -caseína y κ -caseína (Takano, 1998). También se ha descrito que las proteínas séricas α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, e hidrolizados del suero obtenidos con pepsina, tripsina y quimotripsina, contienen péptidos con acción inhibitoria de la ECA (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Diversos ensayos clínicos han demostrado que la VPP e IPP reducen de manera leve la presión arterial si se administran en dosis pequeñas durante varias semanas. Sin embargo, aunque muchos de los efectos antihipertensivos de los péptidos inhibidores de la ECA han sido reportados en estudios *in vivo*, los mecanismos y acciones de estos péptidos todavía no están claras (Yamaguchi *et al.*, 2009).

2.3.3 Péptidos Derivados de Proteínas Vegetales

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de diversas fuentes de péptidos bioactivos, se ha explorado con los cereales (trigo, maíz), leguminosas (soya, garbanzo, chícharo), canola, espinaca, girasol, cacahuete y demás vegetales (Yust *et al.*, 2003; Phelan *et al.*, 2009; Jakubczyk *et al.*, 2013). La ventaja de estas fuentes de péptidos bioactivos radica en el bajo costo de su obtención, así como su disponibilidad.

2.3.4. Péptidos Derivados de Proteínas de Origen Animal

La obtención de péptidos inhibidores de la ECA a partir de productos de origen animal es muy variada, se han reportado estudios en donde analizan el músculo de diversos animales (cerdo, res); productos marinos, derivados lácteos y huevo (Katayama *et al.*, 2003; Aleixandre *et al.*, 2008; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010).

2.3.4.1 Cárnicos. Se han realizado investigaciones con hidrolizados enzimáticos de proteínas del músculo porcino con actividad inhibidora de la ECA. La miosina B, miosina, actina, tropomiosina, troponina y proteínas solubles en agua, fueron digeridos por ocho tipos de proteasas, incluyendo la pepsina, α -quimotripsina y tripsina. Después de la digestión, los hidrolizados producidos a partir de todas las proteínas mostraron actividades inhibidoras de la ECA, y el hidrolizado peptídico mostró la actividad más fuerte (Katayama *et al.*, 2003).

Sentandreu y Toldrá (2007) evaluaron secuencias específicas generadas por la acción de la Dipeptidil peptidasas a partir de músculo esquelético porcino que tienen capacidad para inhibir la actividad de la ECA mediante un ensayo fluorimétrico. Estos investigadores reportaron que la fracción peptídica Arg-Pro mostró mayor actividad inhibidora de la ECA, siendo capaz de suprimir más de 60% de la actividad inicial de la enzima.

2.3.4.2 Productos del mar. Algunos péptidos inhibidores de la ECA han sido obtenidos por digestión enzimática a partir de proteína muscular de atún, sardina, bonito seco, algas y otros productos marinos (Fujita *et al.*, 1995; Suetsuna y Chen, 2001; Hwang, 2010).

Hidrolizados de proteínas han mostrado efectos *in vitro* (mediante la inhibición de la ECA) e *in vivo* (efectos antihipertensivos). Liu *et al.* (2012) evaluaron varios hidrolizados de proteínas de medusa, mediante la aplicación de diversas enzimas, ellos reportaron que los hidrolizados contenían altos niveles de Gly, Glu, Pro, Asp y Ala, con potencial actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, también se encontró que la presión arterial sistólica se redujo notablemente en ratas espontáneamente hipertensas después de la administración oral, presentado un efecto antihipertensivo. Los hidrolizados de algas son también una fuente importante de péptidos biológicamente activos, algunos de los cuales han sido identificados y presentan las actividades inhibitorias de la ECA (Sheih *et al.*, 2009).

2.3.4.3 Huevo. Hasta este momento se han descrito pocos estudios en donde traten de identificar péptidos inhibidores de la ECA procedentes de proteínas de huevo. Se han identificado y caracterizado dos péptidos derivados de la proteína de clara de huevo, estos son la ovokinina, un octapéptido (Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu) aislado a partir de ovoalbúmina hidrolizada con pepsina (Yamada *et al.*, 2002). Rao *et al.* (2012) analizaron hidrolizados de clara de huevo mediante la adición de enzimas gastrointestinales (pepsina, quimotripsina y tripsina) bajo condiciones fisiológicas simuladas, el hidrolizado mostró una potente actividad inhibidora de ECA, además se identificaron 3 fracciones peptídicas Met-Lys-Arg, Arg-Gly Tyr y Val-Ala-Trp con actividad inhibidora de la ECA.

2.3.4.4 Productos lácteos. Un gran número de péptidos inhibidores de la ECA se han aislado de productos lácteos (hidrolizados de suero de leche, queso, leche, leche fermentada, entre otros). Algunos de ellos han mostrado reducción de la

actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, así como efectos en la reducción de la presión arterial en animales de experimentación espontáneamente hipertensos y en pacientes con hipertensión (Aleixandre *et al.*, 2008; Torres-Llanez *et al.*, 2011; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012, 2013).

Los hidrolizados de proteínas de suero de leche han mostrado efecto benéfico para el control de la presión arterial. O'Loughlin *et al.* (2014) analizaron diferentes hidrolizados a partir de suero de leche, en donde obtuvieron mayor actividad inhibidora de la ECA posterior a la hidrólisis enzimática. Por otro lado, Pan *et al.* (2012) purificaron y estudiaron hidrolizados de suero de leche y reportaron que fracciones con un peso molecular de <6 kDa tenía la mayor actividad inhibidora de la ECA e identificaron el péptido Leu-Leu (LL).con las mayores características de inhibición de la ECA.

Estudios llevados a cabo en diferentes tipos de quesos han demostrado que tienen el potencial de ser una fuente para producir péptidos con actividad inhibitoria de la ECA, dependiendo de un proceso de digestión proteolítica. La proteólisis que tiene lugar durante el almacenamiento o maduración de los quesos podría aumentar la tasa de actividad inhibitoria de la ECA a un cierto nivel. En donde varía el momento óptimo de maduración para la producción de péptidos inhibidores de la ECA, siendo único para cada tipo de queso (Saito *et al.*, 2000; Ryhänen *et al.*, 2001; FitzGerald *et al.*, 2004). Torres-Llanez *et al.* (2011), menciona que se pueden producir péptidos con potencial actividad inhibidora de la ECA a partir de quesos frescos inoculados con cultivos lácticos específicos.

Estudios realizados en leche fermentada son muy diversos, variando los microorganismos utilizados así como las condiciones específicas de fermentación. Pihlanto *et al.* (2010) evaluaron la capacidad de 25 cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*) para producir péptidos inhibidores de la ECA, reportan que el grado de la actividad inhibidora

de la ECA durante la fermentación se correlaciona directamente con el grado de hidrólisis en la leche, mediante un análisis de HPLC y espectrometría de masas identificaron fracciones peptídicas provenientes de la β -caseína, además, leche fermentada con *Lactobacillus jensenii* produjo una disminución transitoria de la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas.

2.3.4.5 Péptidos inhibidores de la ECA en leche fermentada con *Lactococcus lactis*. Los estudios con leche fermentada con actividad inhibidora de la ECA son muy amplios, en donde se han utilizado diferentes cepas de BAL (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, etc.), así como diferentes condiciones en la fermentación de la leche (tiempo, temperatura), lo cual puede influir en la producción de péptidos (González-Cordová *et al.*, 2011; Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2012).

Los estudios realizados con leche fermentada empleando cepas de *Lactococcus lactis* han incluido estudios *in vitro*, *in vivo* (mediante la utilización de ratas espontáneamente hipertensas) y estudios clínicos con pacientes hipertensos. Sin embargo, es poca la investigación realizada acerca de la estabilidad gastrointestinal de los péptidos inhibidores de la ECA (tabla 5).

Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010, 2013) inicialmente evaluaron la actividad inhibidora de la ECA *in vitro* de leche fermentada con diferentes cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de diversos nichos, reportan que la mayor actividad inhibidora de la ECA provienen de las cepas aisladas de productos lácteos artesanales con valores de IC₅₀ 13 μ g/mL. Adicionalmente, en un estudio con ratas espontáneamente hipertensas reportan una reducción de los valores de presión arterial sistólica y diastólica, con ello demuestran el potencial beneficio de la leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis* para el control de la presión arterial.

Por otro lado, del total de las leches fermentadas con las diferentes cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de productos lácteos por nuestro laboratorio, solo dos de ellas han sido estudiadas. Por lo que es importante, estudiar el potencial efecto antihipertensivo del resto de las cepas de *Lactococcus lactis* aisladas e identificadas. Además, como paso previo al estudio *in vivo*, es necesario evaluar si la actividad inhibitoria de la ECA se mantendría al ser expuesta a condiciones gastrointestinales en un modelo *in vitro*.

Tabla 5. Estudios realizados con péptidos inhibidores de la ECA

Microorganismo	Estudio	Efecto	Referencias
<i>E. faecalis</i>	Actividad <i>in vivo</i>	21.8±4.5 mmHg PAS 28.5±3.2 mmHg PAD	Quirós <i>et al.</i> (2007)
<i>Lb. helveticus</i> y <i>S. Cerevisiae</i>	Estudio <i>in vivo</i>	PAS y PAD	Kim <i>et al.</i> (2010)
<i>L. lactis</i>	Actividad ECA	IC ₅₀ 0.034±0.002 µg/mL 0.041±0.003 µg/mL	Rodríguez <i>et al.</i> , 2012
<i>E. faecalis</i>	Actividad ECA y estabilidad gastrointestinal	Degradación y formación de péptidos	Quirós <i>et al.</i> , 2008

III. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅) presentan actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina; además, mantienen su actividad aun después de haber sido expuestos a condiciones gastrointestinales simuladas.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Determinar la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos (< 3 kDa) obtenidos a partir de leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅), y evaluar dicha actividad después de la exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

4.2 Particulares

- Determinar la actividad inhibidora de la ECA de extractos acuosos (<3 kDa) obtenidos a partir de leche fermentada durante 24 y 48 h con cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅).
- Determinar la actividad inhibidora de la ECA del extracto acuoso (<3 kDa) después de ser expuestos a la acción de enzimas gastrointestinales en un modelo simulado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Medios de Cultivo y Reactivos

Se utilizaron caldo M17, agar granulado y lactosa de Difco (Spark, MD) para la propagación y crecimiento de las cepas. La leche en polvo fue de la marca comercial Alpura (México). El reactivo de Bradford y la albumina sérica bovina (BSA) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories INC (Hercules, CA). Las membranas de ultrafiltración (3 kDa) Amicon se obtuvieron de Millipore (Bedford, MA) y el reactivo O-phthaldialdehído de Fluka Biochemika (Suiza).

El tetraborato de sodio, dodecil sulfato de sodio (SDS), metanol, 2-mercaptoetanol, cloruro de sodio, acetato de etilo, acetonitrilo, ácidos trifluoroacético y clorhídrico, ECA (Pulmón de conejo, EC. 3.4.15.1, 5 unidades), Hippuril-L-Histidil-L-Leucina, cloruro de potasio, sulfocianuro de potasio, fosfato de sodio y de potasio, bicarbonato de sodio, cloruro de calcio, magnesio y amonio, urea, glucosa, ácido glucorónico, glucosamina hidrociorada, ácido úrico, mucina, bilis, α -amilasa, pepsina, pancreatina y lipasa se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

5.2 Cepas y Condiciones de Propagación

Las bacterias empleadas en este estudio forman parte de la colección de bacteria ácido lácticas del Laboratorio de Calidad y Autenticidad de los alimentos, 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 (CIAD, A. C.), Unidad Hermosillo, Sonora

Las cepas fueron aisladas previamente a partir de diferentes productos lácteos artesanales (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2008) y preservadas en congelación (-80°C en 20% de glicerol). Las cuatro cepas fueron anteriormente identificadas con técnicas moleculares y pertenecen a la especie de *Lactococcus lactis* (tabla 6).

Tabla 6. Cepas de *Lactococcus lactis* empleadas en el estudio

Cepa	Código
<i>L. lactis</i> NRRLB-50598	R₁
<i>L. lactis</i> NRRLB-50599	Q₂
<i>L. lactis</i> NRRLB-50600	Q₅
<i>L. lactis</i> Q3	Q₃

Las bacterias fueron reactivadas inoculando cada cepa al 1% v/v en caldo M17 estéril y suplementado con lactosa o glucosa al 10%. Los cultivos fueron incubados durante 24 h a 30 °C. Posteriormente cada cepa se subcultivó dos veces de acuerdo a lo descrito por Rodríguez *et al.* (2010). Cada subcultivo consistió en inóculos de 1% (v/v) en caldo M17 suplementado con lactosa o glucosa al 10% e incubación durante 24 h a 30 °C para obtener una concentración final del segundo subcultivo de 10⁸ UFC mL⁻¹.

5.3 Preparación del Inóculo y Fermentación de la Leche

El inóculo de cada cepa fue preparado mediante la adición de una alícuota (1% v/v) del segundo subcultivo en 35 mL de leche reconstituida (10%) estéril. La leche inoculada se incubó durante 18 h a 30 °C. Una vez transcurrido el periodo de incubación se tomó una alícuota (3% v/v) y se inoculó en 200 mL de leche estéril. La leche inoculada fue incubada durante 24 y 48 h a 30 °C.

5.4 Capacidad Acidificante y Producción de Ácido Láctico

Las muestras colectadas en los tiempos establecidos fueron empleadas para monitorear el pH y la acidez titulable (expresada en gramos de ácido láctico L⁻¹) de acuerdo a la metodología establecida en la Norma Oficial Mexicana (NOM-243-SSA1-2010).

5.5 Determinación de la Actividad Proteolítica

El grado de proteólisis se cuantificó por medio de la determinación espectrofotométrica de grupos NH₃ libres utilizando el método del o-phthaldialdehído (OPA) (Church *et al.*, 1983). El procedimiento consistió en mezclar 5 mL de ácido tricloroacético 0.75% (p/v) con 2.5 mL de leche fermentada y agitación durante 1 min en un Vortex (VWR, USA). La mezcla se filtró después de 10 min de reposo, utilizando papel Whatman No. 2. Los filtrados que contenían la fracción peptídica soluble en TCA se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de grupos NH₃ libres, se tomaron alícuotas (30 µL) de la fracción peptídica soluble en TCA y se les añadió 600 µL del reactivo OPA. Después de 2 min de reposo a temperatura ambiente (20 °C), se registró la absorbancia de la disolución a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Los resultados se reportan en relación a la densidad óptica mostrada de cada uno de los extractos acuosos en los diferentes tiempos de fermentación.

El reactivo OPA se preparó mezclando 3.81 g de tetraborato de sodio, 1 g de SDS, y 80 mg de o-phthaldialdehído en 2 mL de metanol y 200 µL de 2-mercaptoetanol (β-ME) en un volumen total de 100 mL y fue preparado fresco cada vez que se realizó las determinación.

5.6 Obtención de Extractos Acuosa (< 3 kDa)

Los extractos acuosa se obtuvieron aplicando la metodología descrita por Muguerza *et al.*, (2006) con algunas modificaciones. Para ello, las muestras de leche fermentada por 24 y 48 h fueron pasteurizadas (75 °C, 1 min) inmediatamente después de haber sido colectadas. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (4696 x g, 1 h a 4 °C) en una centrifuga refrigerada (Sorvall ST 16, Thermo Scientific) y el sobrenadante fue recuperado y ultrafiltrado empleando membranas con tamaño de poro < 3 kDa. Las fracciones < 3 kDa obtenidas se almacenaron a -80 °C hasta su análisis posterior.

5.7 Ensayo *in vitro* de la Inhibición de la ECA de los Extractos Acuosa

Los estudios de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina se realizó siguiendo la metodología propuesta por Cushman y Cheung (1971), con modificaciones. En el ensayo se empleó ECA (0.1 U mL⁻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). Los extractos < 3 kDa, la solución amortiguadora y agua milli-Q (blanco) se incubaron a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se prepararon cuatro tubos como se indica en la tabla 7.

Tabla 7. Mezcla de reacciones y controles para evaluar la inhibición de la ECA de los extractos acuosa de leches fermentadas.

Tubos	Solución amortiguadora	Agua Milli-Q	Extracto < 3 kDa	ECA
A	100 µL	40 µL	---	20 µL
B	100 µL	20 µL	40 µL	---
C	100 µL	---	40 µL	20 µL
D	100 µL	60 µL	---	---

Todos los tubos se colocaron a 37 °C por 45 min en una incubadora (VWR Modelo 1545). Posteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de 250 µL de HCl 1 M a cada tubo. El ácido hipúrico resultante de la reacción se extrajo incorporando 1 mL de acetato de etilo mediante agitación vigorosa por 30 s y centrifugación a 1500 x g, 10 min (Eppendorf 5417R, Alemania). Posteriormente, 750 µL de la fase orgánica se evaporará con un equipo Centrivap (75 °C, 20 min, Labconco, USA). La muestra de cada tubo se resuspendió en 1 mL de agua Milli-Q y registró la absorbancia a 228 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA).

El porcentaje de inhibición de la ECA se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{1-(C-B)}{A-D} \right) * 100$$

Las literales de la fórmula se describen en el Cuadro 7.

El contenido peptídico de las fracciones (< 3 kDa) se determinó por el método de Bradford utilizando una curva de calibración con BSA como testigo. Para el cálculo del IC₅₀ (concentración peptídica requerida para inhibir a la ECA en un 50%) se realizó una regresión lineal graficando % de inhibición de la ECA de la fracción peptídica a tres concentraciones. Se realizaron tres repeticiones con sus respectivos duplicados y el IC₅₀ fue reportado en µg/mL (Vermeirssen *et al.*, 2005).

5.8 Evaluación de la IECA en un Modelo de Digestión *in vitro*

Los modelos de digestión *in vitro* de humanos simulan los procesos de digestión en el tracto gastrointestinal de una manera simplificada mediante la aplicación de las condiciones de base fisiológica. Es decir, la composición química de los fluidos digestivos, pH y los períodos de tiempo de residencia típicos para cada compartimento. En este estudio se empleó un procedimiento de tres fases

continuas: simulación de procesos digestivos en la boca, el estómago y el intestino delgado (Versantvoort *et al.*, 2005)

Todos los fluidos digestivos (tabla 8) empleados se mantuvieron a una temperatura fisiológica de 37 ± 2 °C previo a su utilización. La digestión comenzó mediante la adición de 6 mL de solución saliva a 4 mL de muestra. La mezcla se incubó durante 5 min a pH 6.8. Después se añadieron 12 mL de jugo gástrico, y la mezcla se mantuvo con agitación durante 2 h, manteniendo el pH entre 2 y 3. Finalmente, se añadieron, simultáneamente, 12 mL de jugo duodenal, 6 mL de bilis y 2 mL de solución de bicarbonato (1 M). La mezcla se recirculó durante 2 h empleando una bomba peristáltica P1 (Healthcare, GE) para simular el movimiento natural del intestino. El pH se mantuvo entre 6.5 y 7. Todo el sistema se mantuvo a 37 °C en agitación (50 rpm) utilizando un agitador orbital (Lab Line, USA). Al final del proceso digestivo, las muestras fueron centrifugadas a 2750 x g durante 5 min y ultrafiltradas utilizando una membrana de 3 kDa.

A las muestras ultrafiltradas se les evaluó el contenido de proteína mediante el método de Bradford y la inhibición de la ECA mediante el ensayo de Cushman y Cheung (1971). Los resultados fueron expresados en % de inhibición de la ECA e IC_{50} como se describió anteriormente.

Tabla 8. Composición (de un 1 litro solución) de los diferentes fluidos digestivos empleados en el modelo gastrointestinal simulado

	Saliva	Jugo gástrico	Jugo duodenal	Bilis
Solución inorgánica	10 mL KCl 89.6 g/L 10 mL KSCN 20 g/L 10 mL NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/L 10 mL NaSO ₄ 57 g/L 1.7 ml NaCl 175.3 g/L 20 mL NaHCO ₃ 84.7 g/L	15.7 mL NaCl 175.3 g/L 3.0 ml NaH ₂ PO ₄ 88.8 g/L 9.2 mL KCl 89.6 g/L 18 mL CaCl ₂ *2H ₂ O 22.2 g/L 10 mL NH ₄ Cl 30.6 g/L 6.5 mL HCl 37% g/g	40 mL NaCl 175.3 g/L 40 ml NaHCO ₃ 84.7 g/L 10 mL KH ₂ PO ₄ 8 g/L 6.3 mL KCl 89.6 g/L 10 mL MgCl ₂ 5 g/L 180 µL HCl 37% g/g	30 mL NaCl 175.3 g/L 68.3 mL NaHCO ₃ 84.7 g/L 4.2 mL KCl 89.6 g/L 150 µL HCl 37% g/g
Solución orgánica	8 mL urea 25g/L	10 mL glucosa 65 g/L 10 mL ácido glucoronico 2 g/L 3.4 mL urea 25 g/L 10 ml glucoseamina hydrochloride 33 g/L	4 mL urea 25 g/L	10 mL urea 25 g/L
Otros componentes	290 mg α-amilasa 15 mg ácido úrico 25 mg mucina	1 g BSA 2.5 g pepsina 3 g mucina	9 mL CaCl ₂ *2H ₂ O 22.2 g/L 1 g BSA 9 g pancreatina 1.5 g lipasa	10 mL CaCl ₂ *2H ₂ O 22.2 g/L 1.8 g BSA 30 g bilis
pH	6.8 ± 0.2	1.30 ± 0.02	8.1 ± 0.2	8.2 ± 0.2

5.9 Análisis Estadístico

Se buscó la normalidad de los datos por medio de estadística descriptiva (pH, acidez titulable, proteólisis, % inhibición e IC_{50}). El análisis de los datos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA). En el caso de existir diferencias entre las medias se analizaron por la prueba de Tukey-Kramer y se consideró significativo cuando $p < 0.05$. El análisis para ver las diferencias antes y después de la simulación gastrointestinal se realizó mediante una t-pareada del parámetro IC_{50} . Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para procesar los datos se utilizará el programa estadístico NCSS 2007 (NCSS Inc., Kaysville, UT).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Cinéticas de Crecimiento

En la Figura 4 se presentan las curvas de crecimiento de las diferentes cepas cultivadas en medio suplementado con lactosa o glucosa expresadas en densidad óptica. Las cepas R₁ y Q₂ presentaron el mayor crecimiento en medio con lactosa, mientras que las cepas Q₃ y Q₅ presentaron menos crecimiento. Por otra parte, cuando las cepas fueron cultivadas en medio suplementado con glucosa, todas presentaron un retraso en crecimiento en la fase de adaptación. No obstante, todas las cepas mostraron un mayor crecimiento al compararlas con el crecimiento en medio suplementado con lactosa.

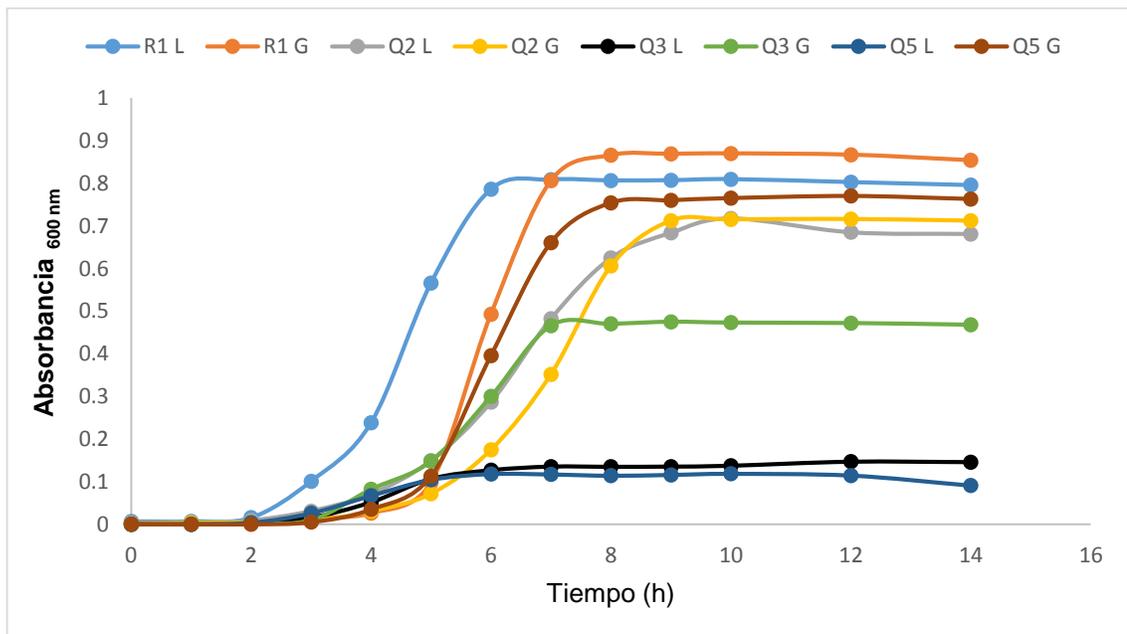


Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas de *Lactococcus lactis* en medio suplementado con lactosa o glucosa

En un estudio realizado por Garrigues *et al.* (1997) evaluaron el crecimiento de *L. lactis* en lactosa, glucosa y galactosa, y observaron que las cepas presentan un crecimiento más rápido en el medio enriquecido con glucosa y significativamente menor crecimiento en los medios con lactosa y galactosa. Por otro lado, Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010) evaluaron el crecimiento de las cepas en medio suplementado con lactosa y sus resultados correspondieron a los datos obtenidos en el presente estudio.

Cada una de las cepas tiene diferente metabolismo y por ende diferente capacidad para metabolizar los azúcares en la leche. Se ha demostrado que el complejo paquete enzimático (presencia de β -glicosidasas) de *Lactococcus lactis* es lo que podría influir en la capacidad para el crecimiento de las cepas, debido a la variabilidad en las subespecies (Aleksandrak-Piekarczyk *et al.*, 2005).

6.2 pH y Acidez Titulable

La Figura 5 muestra los valores de pH de leche fermentada por las cuatro cepas de *Lactococcus lactis* durante 48 h de fermentación. Los valores estuvieron dentro de un intervalo de 6.43 a 4.25. En general se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) del pH conforme transcurrió el tiempo de fermentación. Después de 48 h de fermentación, la cepa Q₂ fue la más acidificante, seguida por R₁, Q₅ y finalmente Q₃. En este trabajo se obtuvieron valores de pH similares a los resultados reportados por González *et al.* (2010), los cuales fermentaron leche con cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Rodríguez-Figueroa *et al.* 2010 evaluó diversas cepas de *Lactococcus lactis* suplementadas con lactosa durante 48 h y obtuvo valores de pH por arriba de 4.8. Sin embargo, en este estudio se obtuvieron valores de 4.25 ± 0.02 y 4.5 ± 0.04 , para las cepas Q₂ y R₁, respectivamente.

La Figura 6 muestra los valores de capacidad acidificante de las cuatro cepas de *Lactococcus lactis* durante 48 horas de fermentación. Los valores se encuentran dentro de un intervalo general de 0.17 a 0.73 g ácido láctico/100 mL. Los datos de capacidad acidificante son lo inverso a los valores de pH y con las cuatro cepas se tuvo el mismo comportamiento presentando diferencias significativas ($p < 0.05$). Las cepas con mayor capacidad acidificante correspondieron a Q₂ y R₁.

La disminución de pH y capacidad acidificante de las cepas en las leches fermentadas se debe a la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo de los azúcares presentes en la leche. La presencia de la enzima β -glucosidasa es relevante e influye en la capacidad de acidificación de los *Lactococcus* sobre la leche (Aleksandrzyk-Piekarczyk *et al.*, 2005).

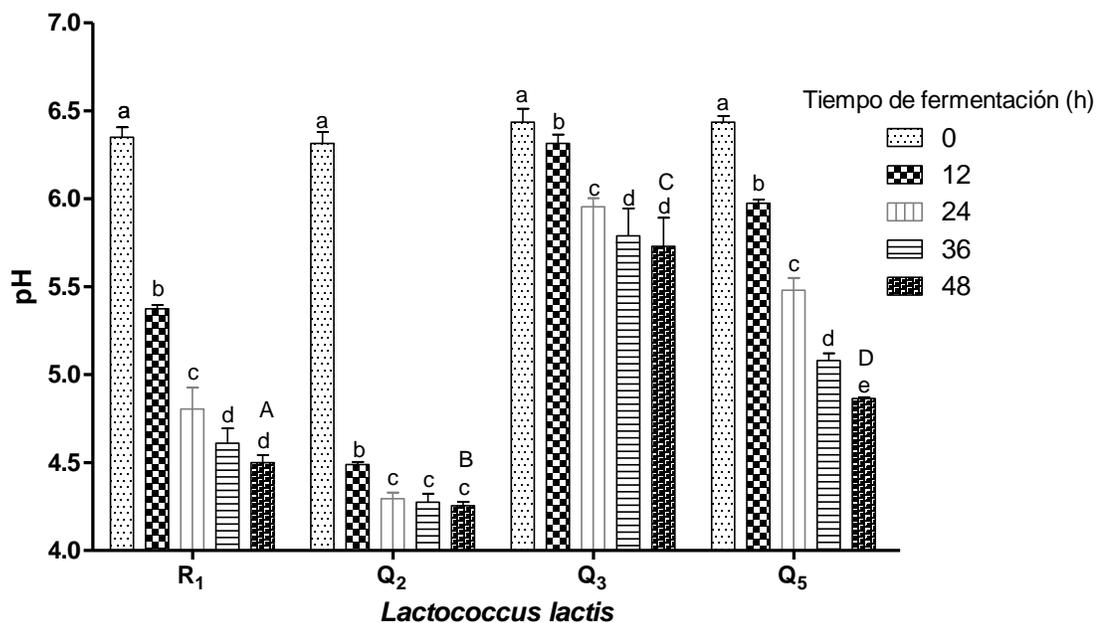


Figura 5. Evolución del pH durante la fermentación de la leche por cepas de *Lactococcus lactis*. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo (48h).

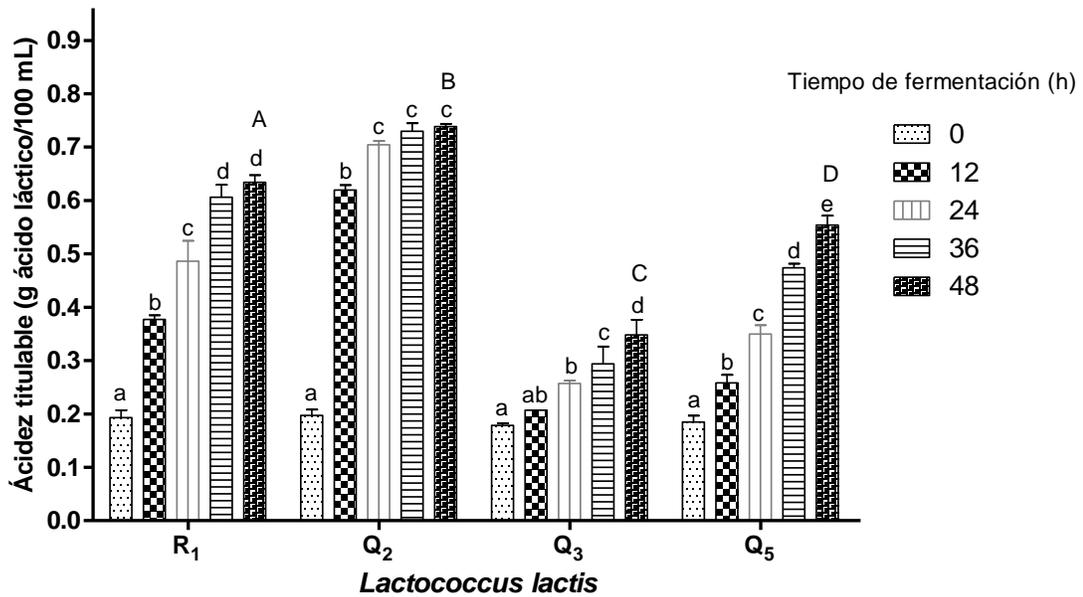


Figura 6. Evolución de la acidez titulable durante la fermentación de la leche con cepas de *Lactococcus lactis*. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo (48 h).

6.3 Evaluación de la Actividad Proteolítica

En la Figura 7 se muestran los resultados correspondientes a la actividad proteolítica expresada como densidad óptica de las cepas de *Lactococcus lactis* durante 48 h de fermentación. Los valores de densidad óptica de manera general se encuentran entre los valores de 0.01 a 0.15 entre las cuatro cepas de *Lactococcus*. Los valores de densidad óptica reportados se encuentran relacionados directamente con los grupos amino generados por el sistema proteolítico de las cepas de *Lactococcus lactis*.

Los resultados mostraron que conforme transcurrió el tiempo de fermentación la actividad proteolítica aumentó gradualmente ($p < 0.05$), sin embargo para las cepas R₁, Q₃ y Q₅, el tiempo óptimo fue a las 36 h, ya que no hubo diferencia significativa con la fermentación a 48 h. Rodríguez *et al.*, 2010, analizó la actividad proteolítica de diversas cepas de este mismo género y reportó

densidades superiores a 0.24 en densidad óptica, siendo estos valores superiores a los reportados en este estudio. Dicha actividad proteolítica pudiera asociarse al paquete enzimático que presentó cada una de las cepas, en donde se pudieron producir peptidasas y proteasas en mayor o menor grado, las cuales pudieran degradar las proteínas de la leche.

Quirós *et al.* (2007) evaluaron la fermentación de leche con cepas de *Enterococcus faecalis* durante 48 h. La actividad proteolítica reportada fue superior a la obtenida en este trabajo. Las diferencias se pudieron deber a la cepa utilizada y a la capacidad para degradar la proteína de la matriz alimentaria.

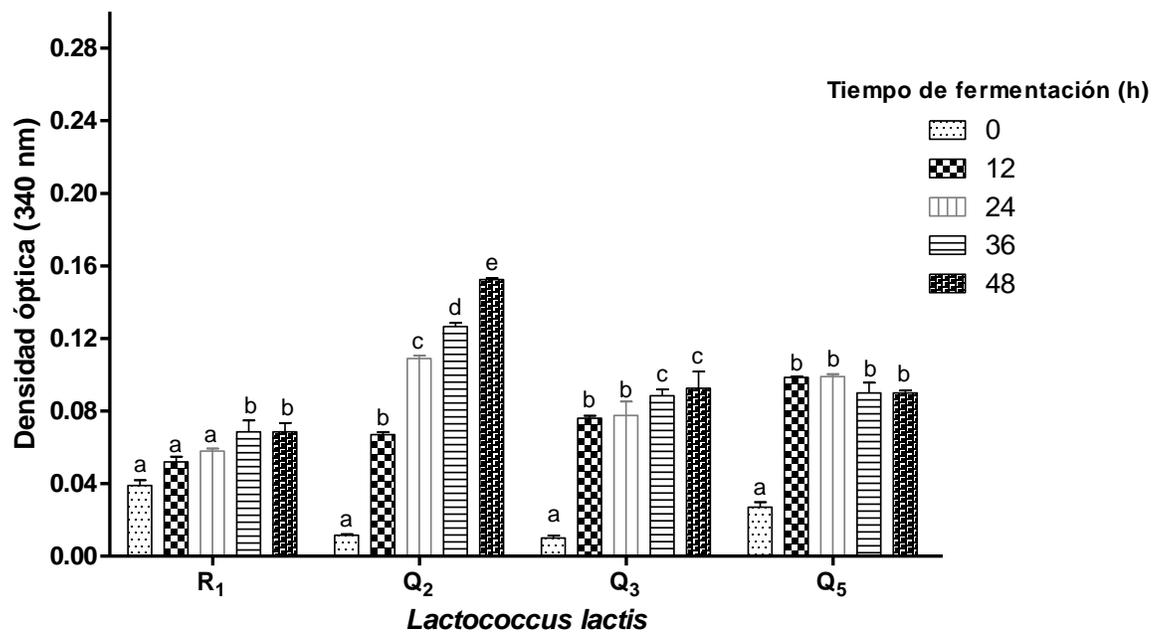


Figura 7. Actividad proteolítica en leches fermentadas con cepas de *Lactococcus lactis* durante 48 h de fermentación. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo.

6.4 Actividad Inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina

La Figura 8 muestra los resultados del porcentaje de inhibición de la ECA (IECA) en los tiempos 24 y 48 h de fermentación con las cuatro cepas de *Lactococcus lactis*. En general, para todas las cepas se observó un aumento significativo

($p < 0.05$) del porcentaje de IECA conforme aumentó el tiempo de fermentación. Los resultados se relacionaron con la actividad proteolítica de las cepas. La cepa Q₂ fue la cepa que presentó mayor actividad proteolítica y mayor porcentaje de inhibición de la ECA a las 48 h. Las diferencias en el porcentaje de inhibición de la ECA podrían estar ligadas con la capacidad de las cepas para degradar las proteínas de la leche y con ello formar péptidos que tengan o no una actividad sobre la ECA.

Al realizar un análisis en el porcentaje de inhibición de la ECA para los tiempos 24 y 48 h de incubación con cada una de las cepas, los resultados mostraron que a las 24 h el % de IECA fue significativamente menor comparado con las 48 h de fermentación de la leche. Estas diferencias podrían ser ocasionadas por una menor actividad proteolítica de las cepas a las 24 h. Además, a las 48 horas de fermentación puede haber lisis celular y con ello una mayor liberación de enzimas que pueden ayudar a la formación de un número mayor de péptidos con actividad inhibidora de la ECA.

No se encontraron diferencias significativas en % de IECA entre las cepas R₁, Q₂ y Q₅, después de 48 h de fermentación. Sin embargo la cepa Q₃ mostró significativamente menor porcentaje de inhibición de la ECA a las 48 h. Los porcentajes para las cepas R₁, Q₂, Q₅ y Q₃ fueron de $91.7 \pm 2.06\%$, $94.4 \pm 0.23\%$, $94.2 \pm 0.49\%$ y $83.3 \pm 2.22\%$, respectivamente.

Estos % de IECA fueron superiores a los reportados por Philanto *et al.*, 2010, quienes presentaron porcentajes de IECA de 57%. Así mismo los resultados obtenidos fueron similares a los presentados por Rodríguez-Figueroa *et al.*, 2010. Los resultados mostraron que la capacidad de inhibir a la ECA fue dependiente de cada cepa, posiblemente relacionada con el grado de proteólisis observado para las diferentes cepas.

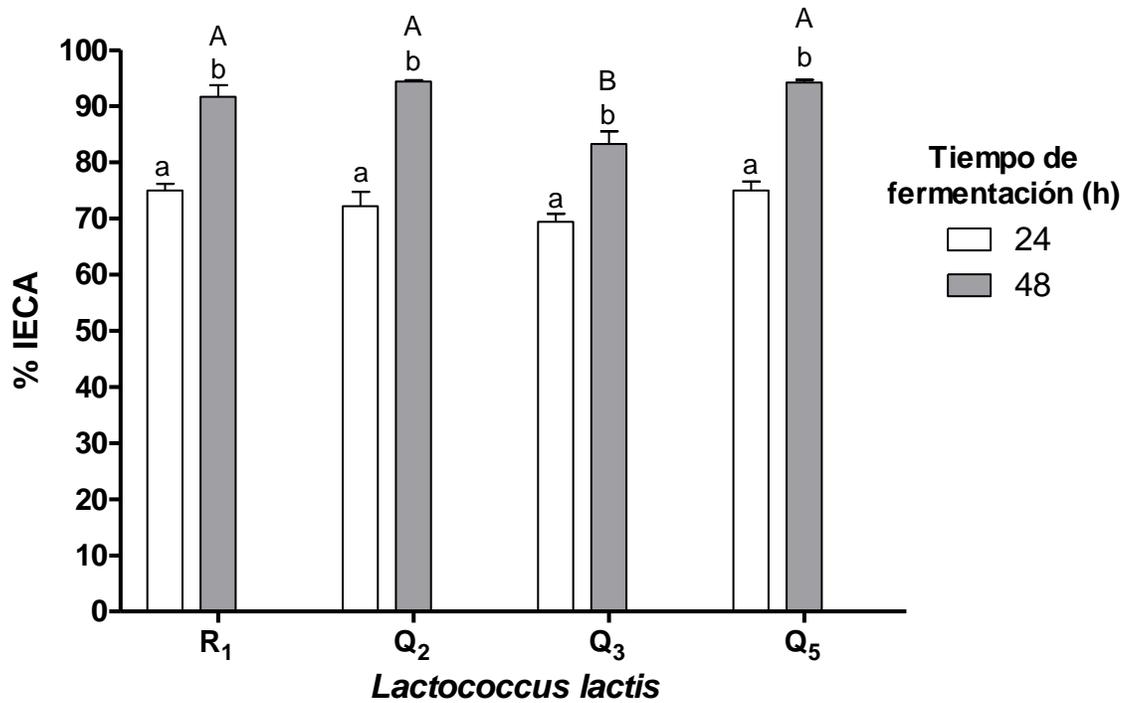


Figura 8. Porcentaje de inhibición de la ECA de la leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis*. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo (48h).

6.5 Contenido Peptídico e IC₅₀

En la Figura 9 se observan los valores de contenido peptídico de los extractos <3 kDa de las leches fermentadas con las cepas de *Lactococcus lactis* en dos tiempos de fermentación (24 y 48 h). Los datos mostraron que conforme transcurrió el tiempo de fermentación, el contenido de nitrógeno peptídico aumento significativamente ($p < 0.05$) para las cuatro cepas, siendo mayor en la cepa Q₂ y Q₅ a 48 h. Este parámetro resulta importante para el IC₅₀, ya que mientras más contenido de proteína haya en el extracto, el IC₅₀ será mayor.

La Figura 10 presenta los resultados de IC₅₀ de los extractos <3 kDa de las leches fermentadas con las cepas de *Lactococcus lactis* en dos tiempos de fermentación (24 y 48 h). Los resultados fueron variables con cada una de las cepas

presentado diferencias significativas ($p < 0.05$) conforme transcurrió el tiempo de fermentación. Los valores más bajos de IC_{50} se obtuvieron a las 48 h y fueron de 8.7, 15.5, 15.6 y 17.3 $\mu\text{g/mL}$ para las cepas R₁, Q₂, Q₃ y Q₅, respectivamente.

La cepa R₁ fue la que presentó el menor valor de IC_{50} a las 48 h de fermentación, con valores de $8.7 \pm 3.1 \mu\text{g/mL}$. Un IC_{50} bajo indica que mientras más pequeño sea el valor, menor contenido de proteína se necesita para que se manifieste el efecto inhibitorio de la ECA. La variación de los resultados del % de inhibición de la ECA y los valores de IC_{50} entre las diferentes muestras se debe a que aunque algunas muestras tienen % de inhibición de la ECA altos, se requirieron diferentes concentraciones peptídicas para lograr el efecto. Por lo anterior, el IC_{50} es más adecuado para fines comparativos.

Pihlanto *et al.* (2010) evaluaron la fermentación de la leche con *Lactococcus lactis* durante 24 h y obtuvieron valores de 57 % de inhibición de la ECA e IC_{50} de 500 $\mu\text{g/mL}$. Dichos valores de inhibición de la ECA fueron menores y los valores de IC_{50} fueron mayores a los reportados en este estudio. Por lo que, las cepas de este estudio presentaron mayor potencial antihipertensivo que las cepas estudiadas por Pihlanto *et al.* (2010). En otro estudio realizado por Rodríguez-Figueroa *et al.* (2010) evaluaron cepas de *Lactococcus lactis* de diferentes orígenes en leche fermentada. Las cepas que provenían de origen lácteo presentaron valores de IC_{50} en un rango de 12 a 50 $\mu\text{g/mL}$ a las 48 horas de fermentación. Dichos valores fueron similares a los datos obtenidos en este trabajo.

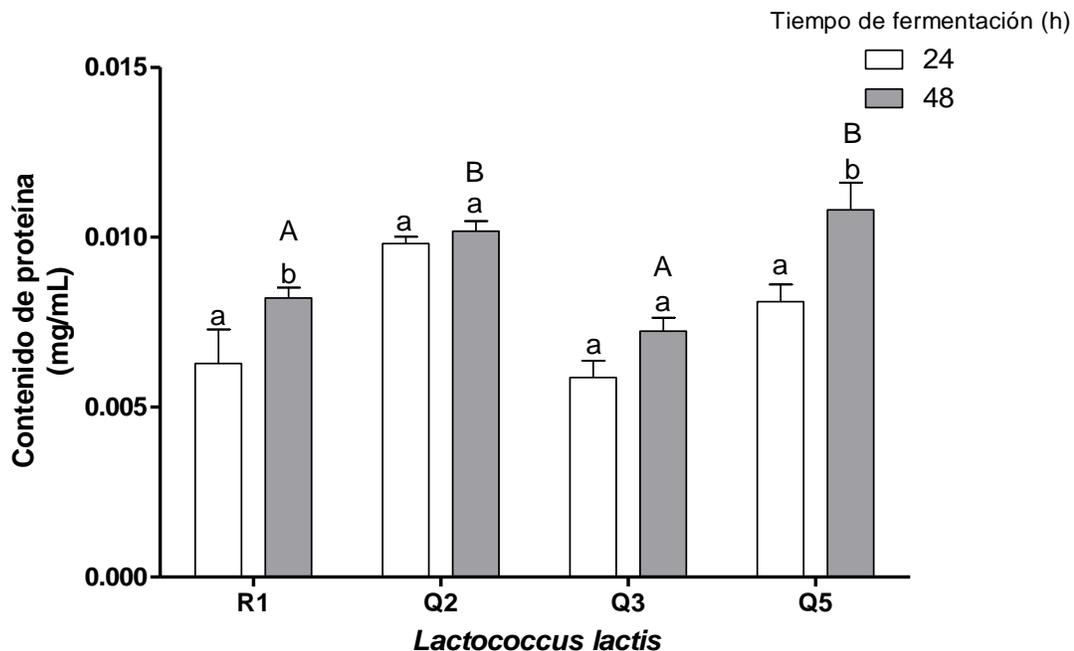


Figura 9. Contenido de nitrógeno peptídico de la leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis*. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo.

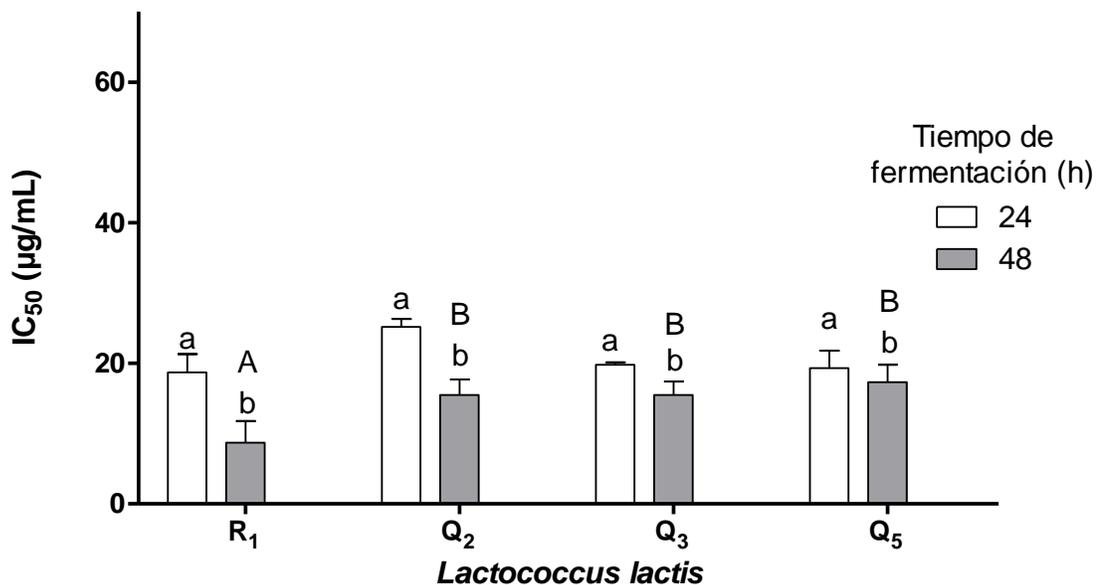


Figura 10. IC₅₀ de la leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis* en dos tiempos de fermentación. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo.

6.6 Simulación Gastrointestinal

La Figura 11 muestra el porcentaje de inhibición de la ECA de las cuatro cepas de *Lactococcus lactis* en los dos tiempos de fermentación (24 y 48 h). Se observó que conforme transcurrió el tiempo de fermentación, el porcentaje de actividad de la ECA aumentó, diferenciándose entre los tiempos de 24 y 48 ($p < 0.05$).

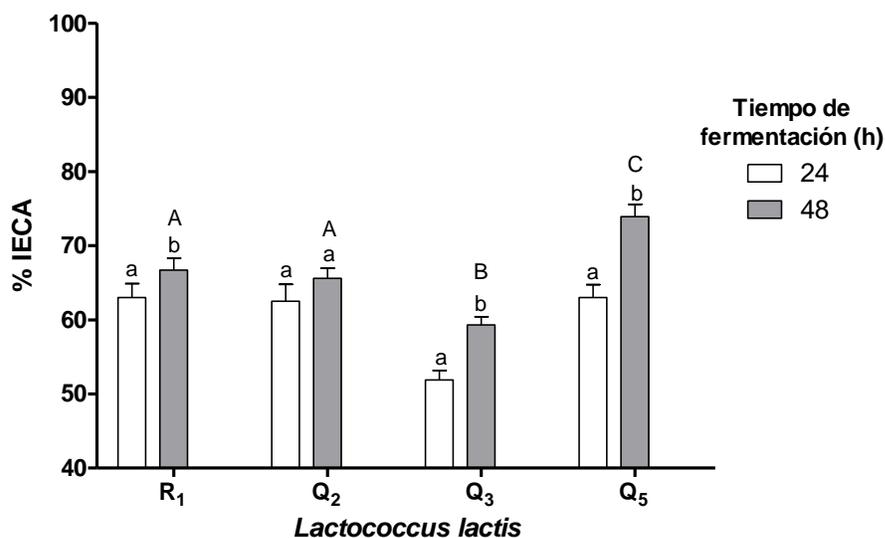


Figura 11. Porcentaje de inhibición de la ECA de la leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis* posterior a la simulación gastrointestinal. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para la misma cepa a través del tiempo, mientras que letras mayúsculas indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre cepas a un mismo tiempo.

Además, se observó que el porcentaje de inhibición de la ECA fue mayor a las 48 horas de fermentación. La cepa con el mayor porcentaje de IECA fue la Q₅, seguida de la R₁, Q₂ y Q₃, con valores de 73.9 ± 1.69 , 66.7 ± 1.61 , 65.6 ± 1.35 y 59.3 ± 1.1 , respectivamente. Sin embargo, al comparar con los porcentajes de inhibición previos a la simulación gastrointestinal (Figura 8), estos fueron significativamente menores ($p < 0.05$).

La Figura 12 muestra los resultados de IC₅₀ obtenidos durante la simulación gastrointestinal de los extractos de leche fermentada a los dos tiempos de fermentación. Se pudo observar que los valores de IC₅₀ aumentaron en la

mayoría de los extractos después de la simulación gastrointestinal, esto pudiera deberse a que los péptidos presentes en los extractos acuosos sufrieron una hidrólisis y con ello se redujo la inhibición de la ECA. Por otro lado, para las cepas Q₂ a las 48h y Q₃ a las 24 h no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) en los IC₅₀ antes y después de la simulación gastrointestinal.

Estos resultados fueron similares a los reportados por Tavares *et al.* (2011), quienes reportaron que fracciones peptídicas de suero de leche fueron degradadas en presencia de enzimas gastrointestinales. En contraste, otras investigaciones han demostrado que durante la digestión gastrointestinal de fracciones peptídicas de caseína de la leche se pudieron formar nuevos péptidos más pequeños con un mayor efecto de bloqueo sobre la ECA. Por lo anterior, pudiera la composición estructural del péptido la que juegue un papel más importante sobre si es estable o no a las condiciones gastrointestinales (Quirós *et al.*, 2009; Hernández-Ledezma *et al.*, 2011).

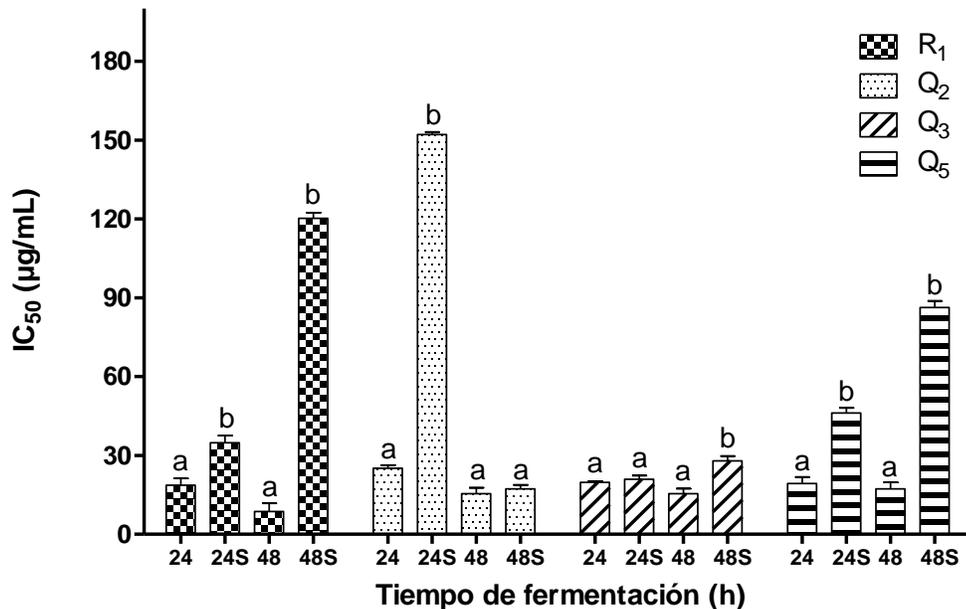


Figura 12. IC₅₀ de los extractos de leche fermentada con cepas de *Lactococcus lactis* en dos tiempos de fermentación (24 y 48 h) antes y después de la simulación gastrointestinal. Literales minúsculas indican diferencia significativa ($p<0.05$) para la misma cepa a un tiempo determinado.

VII. CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos (< 3 kDa) derivados de la fermentación de la leche con las cepas de *Lactococcus lactis* (R₁, Q₂, Q₃ y Q₅) mostraron actividad inhibidora de la ECA. Para todos los casos, a mayor tiempo de fermentación hubo mayor actividad inhibidora de la ECA. De manera similar, los valores de IC₅₀ disminuyeron al transcurrir el tiempo de fermentación, con las cepas R₁ y Q₂ siendo las que presentaron los menores valores de IC₅₀ (8.7 y 15.5 µg/mL, respectivamente).

Por otro lado, cuando los extractos de las leches fermentadas (< 3 kDa) se sometieron al proceso de simulación gastrointestinal, la mayoría de ellos perdieron actividad sobre la inhibición ECA lo cual resultó en un incremento del IC₅₀, con excepción de las cepas Q₂ y Q₃. Los extractos de estas dos cepas mantuvieron sus valores de IC₅₀, aún después de haber sido expuestas a las condiciones gastrointestinales. Dicha estabilidad podría ser atribuida a la composición estructural de los péptidos, sin embargo estudios de espectrometría de masas aún se encuentran en desarrollo. De las cuatro cepas de *Lactococcus lactis* estudiadas, las cepas Q₂ y Q₃ podrían ser utilizadas en el desarrollo de productos lácteos fermentados con potencial efecto antihipertensivo. Por todo lo anterior, las leches fermentadas con las cepas Q₂ y Q₃ podrían presentar actividad inhibidora de la ECA y efecto antihipertensivo en un modelo *in vivo*.

VIII. REFERENCIAS

- Agyei, D. y Danquah, K. 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*. 29(3): 272-277.
- Aleixandre, A., Miguel, M. y Muguerza, B. 2008. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria*. 23(4): 313-318.
- Aleksandrak-Piekarczyk, T., Kok, J., Renault, P. y Bardowski, J. 2005. Alternative Lactose Catabolic Pathway in *Lactococcus lactis* IL1403. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(10): 6060-6069.
- Arihara, K. y Ohata, M. 2010. Functional meat products. In F. Toldrá (Ed.), *Handbook of meat processing* (pp. 423–439). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Armario, P., Oliveras, A., Hernández, R., Ruilope, L.M. y De la Sierra, A. 2009. Prevalence of target organ damage and metabolic abnormalities in resistant hypertension. *Medicina Clínica*. 137(10): 435-439.
- Azadbakht, L., Fard, N.R., Karimi, M., Baghaei, M.H., Surkan, P.J., Rahimi M., Esmailzadeh, A. y Willett, W.C. 2011. Effects of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) eating plan on cardiovascular risks among type 2 diabetic patients: a randomized crossover clinical trial. *Diabetes Care*. 34(1): 55-57.
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A. y Bouza, J.J. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*. 42(3-4): 135-145.
- Beevers, G., Lip, G. y O'Brien, E. 2001. ABC of hypertension. The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal*. 322: 912-916.

- Bhupathiraju, S.N. y Tucker, K.L. 2011. Coronary heart disease prevention: nutrients, foods, and dietary patterns. *Clinica Chimica Acta*. 412(17-18): 1493-514.
- Botey, P. A. 2002. Inhibición y/o bloqueo del sistema renina-angiotensina. *Journal of Hypertension*. 19(2): 55-57.
- Brown, J. N. y Vaughan, E. D. 1998. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Journal of the American Heart Association*. 97: 1411-1420.
- Chen, Z.Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N. y Huang, Y. 2009. Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(11): 4485-4499.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F. y Cushman, D. W. 1980. Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(2): 401-407.
- Chobanian, A., Bakris, G., Black, H., Cushman, W., Green, L. y Izzo, J. 2003. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: The JNC7 Report. *Journal of the American Medical Association*. 289: 2560-2572.
- Church, F.C., Swaiswood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*. 66(6): 1219-1227.
- Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. 2000. Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science*. 83(6): 1187-1195.
- Cooper, O.W., Hernandez, D.S., Arbogast, G.P., Dudley, A.J., Dyer, S., Gideon, S.P., Hall, K. y Ray, A.W. 2006. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *New England Journal of Medicine*. 34(23): 2443-2451.
- Cushman, D.W. y Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 20(7): 1637-1648.

- Dasgupta, C. y Zhang, L. 2011. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today*. 16(1/2): 22-34.
- De la Sierra, A., Gorostidi, M., Marín, R., Redón, J., Banegas, J.R. y Armario, P. 2008. Evaluación y tratamiento de la hipertensión arterial en España. Documento de consenso. *Medicina Clínica*. 131(3): 104-116.
- Domínguez, M.M. 2009. Aislamiento de biopéptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina I a partir de hidrolizados de *Phaseolus lunatus*. Tesis de Doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D. F.
- Erdmann, K., Cheung, B.W. y Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(10): 643-654.
- Erdös, E.G. 1976. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *American Journal of Medicine*. 60(6): 749-759.
- Feletou, M. y Vanhoutte, P.M. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *American Journal of Physiology*. 291: 985-1002.
- Figuroa-Hernández, C.Y. 2007. Utilización del sistema proteolítico de *Lactococcus lactis* para la generación de péptidos potencialmente bioactivos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- FitzGerald, R.J. y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*. 84(1): S33-S37.
- FitzGerald, R.J., Murray, B.A. y Walsh, D.J. 2004. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*. 134(4): S980-S988.
- Fleming, I. 2006. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circulation Research*. 98(7): 887-896.
- Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson, D. y Nyborg, N.C.B. 2003. Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 83: 27-34.

- Fujita, H., Yokoyama, K., Yasumoto, R. y Yoshikawa, M. 1995. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 22(1): 304-305.
- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N.D. y Cocaign-Bousquet, M. 1997. Control of the Shift from Homolactic Acid to Mixed-Acid Fermentation in *Lactococcus lactis*: Predominant Role of the NADH/NAD⁺ Ratio. *Journal of Bacteriology*. 179(17): 5282-5287.
- Gobbetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. y Addeo, F. 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(9): 3898-3904.
- González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M. y Tornadijo, M.E. 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. *Food Microbiology*. 27(5): 592–597.
- González-Córdova, A.F., Torres-Llanez, M.J., Rodríguez-Figueroa, J.C., Espinosa- De los Monteros, J.J., García, H.S. y Vallejo-Cordoba, B. 2011. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in milks fermented by *Lactobacillus* strains. *CyTA–Journal of Food*. 9(2): 146-151.
- Guía Española de Hipertensión Arterial. 2005. Tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial. *Hipertensión*. 22(2): 44-46.
- Gutiérrez-Méndez, N., Vallejo-Córdoba, B., González-Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V. y Rivera-Chavira, B. 2008. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. *Journal of Dairy Science*. 91(1):49-57.
- Hernández, H.H., Díaz, D.E., Meaney, M.E. y Meaney, M.A. 2011. Guía de tratamiento farmacológico y control de la hipertensión arterial sistémica. *Revista Mexicana de Cardiología*. 22(1): 1A-21A.

- Hernández, L.B., Miralles, B., Amigo, L., Ramos, M. y Recio, I. 2005. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(6): 1041-1048.
- Hernández, M., Lezama, M.A., Oseguera, J., Díaz, L.A., Rodríguez, C., Fernández, M., Cárdena, E.G., Verdejo, J., Parra, J.Z., Guerrero, F.J., Barriguete-Meléndez, J.A., Ceballos, C., Necoechea, J.C., Barquera, S., Aguilar, C.A., González, A., González, J., Lara, A., y Hernández, H.R. 2009. Guía de tratamiento farmacológico para el control de la hipertensión arterial 2009. *Revista Mexicana de Cardiología*. 20(2): 55-104.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M.M. y Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165(1): 23-35
- Hwang, J.S. 2010. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. *Food Research International*. 43: 902-906.
- Instituto Nacional de Salud Pública [INSP]. [2012]. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012.
- Izzo, J.L. y Weir, M.R. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Journal of Clinical Hypertension*. 13(9): 667-675.
- Jakubczyk, A., Karas, M., Baraniak, B. y Pietrzak, M. 2013. The impact of fermentation and *in vitro* digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from pea proteins. *Food Chemistry*. 141: 3774-3780.
- Jing, P., Qian, B., He, Y., Zhao, X., Zhang, J., Zhao, D., Lv, Y. y Deng, Y. 2014. Screening milk-derived antihypertensive peptides using quantitative structure activity relationship (QSAR) modelling and *in vitro/in vivo* studies on their bioactivity. *International Dairy Journal*. 35(1): 95-101.
- Johnson, C.I., Naitoh, M. y Burrell L.M. 1997. Rationale and pharmacology of angiotensin II receptor antagonist: Current status and future issues. *Journal of Hypertension*. 15(7): S3-6.

- Kajimoto, O., Aihara, K., Hirata, H., Takahashi, R. y Nakamura, Y. 2001. Hypotensive effects of the tablets containing "Lactotriptides (VPP, IPP)". *Journal of Nutritional Food*. 4(3): 51-61.
- Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y. y Muguruma, M. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asia-Australasian Journal of Animal Sciences*. 16(3): 417-424
- Kim, S.M., Park, S., y Choue, R. 2010. Effects of fermented milk peptides supplement on blood pressure and vascular function in spontaneously hypertensive rats. *Food Science and Biotechnology*. 19(5): 1409-1413.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. 16(9): 945-960.
- Lee, S.H., Qian, Z.J. y Kim, S.K. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 118: 96-102.
- Liu, L., Zhao, Y., Liu, G., Li, W., Zhang, X., y Zanchetti, A. 2005. The Felodipine Event Reduction (FEVER) Study: a randomised longterm placebo-controlled trial in Chinese hypertensive patients. *Journal of Hypertension*. 23(12): 2157-2172.
- Liu, X., Zhang, M., Zhang, C. y Liu, C. 2012. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*. 134: 2134-2140.
- López-Jaramillo, P., Sánchez, R.A, Díaz, M., Cobos, L., Bryce, A., Parra-Carrillo, J.Z., Lizcano, F., Lanas, F., Sinay, I., Sierra, I.D., Peñaherrera, E., Bendersky, M., Schmid, H., Botero, R., Urina, M., Lara, J., Foos, M.C., Márquez, G., Harrap, S., Ramírez, A.J. y Zanchetti, A. 2013. Latin american consensus of hypertension in patients with type 2 diabetes and metabolic síndrome. *Acta Médica Colombiana*. 38(3): 154-172.

- Maicas, B.C., Lázaro, F.E., Álcala, L.J., Hernández, S.P. y Rodríguez, P.L. 2003. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. Sociedad Castellana de Cardiología. 3(5): 141-160.
- Martínez Brú, C. 1992. Dipeptidil carboxipeptidasa: Enzima convertidora de la angiotensina. Química Clínica, 11(1): 8-16.
- Martínez, E. 2000. La actividad física en el control de la hipertensión arterial. IATREIA. 13(4): 230-236.
- Mataix, J. 2002. Nutrición y alimentación humana. Vol. II. Ed. Océano. Barcelona, España. pp. 1145-1150.
- Matsui, T., Yukiyoishi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H. y Matsumoto, K. 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. Journal of Nutritional Biochemistry. 13: 80-86.
- McArdle, W.D., Katch, F.I. y Katch, V.I. 2004. Fundamentos de fisiología del ejercicio (2ª ed.). McGraw-Hill/Interamericana. España. Pp. 272-280.
- McPhee, S., Lingappa, V., Ganong, W. y Lange, J. 2001. Fisiopatología Médica: Una introducción a la medicina clínica. 3ra edición. Manual moderno. México. pp. 312-322 y 583.
- Meisel, H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. Livestock Production Science. 50(1-2): 125-138.
- Mendoza, G.C., Rosas, M., Lomelí, E.C., Lorenzo, J.A., Méndez, A., Martínez, R.J., Martínez, S.C. Pastelín, G., Férez, S.S. y Attie, F. 2008. Prevención y tratamiento de la hipertensión arterial sistémica en pacientes con enfermedad arterial coronaria. Archivos de Cardiología de México. 78(2): 58-73.
- Merí, V.A. 2005. Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte. Médica Panamericana. España. pp. 57-60.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manzo, M., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. y Recio, I. 2006. Antihypertensive activity of milk fermented by

- Enterococcus faecalis strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*. 16(1): 61-69.
- Mulero, C.J., Zafrilla, R.P., Martínez, M.A., Leal, H.M., y Abellán, A.J. 2011. Péptidos bioactivos. *Clínica de Investigación en Arteriosclerosis*. 23(5): 219-27.
- Nielsen, M.S., Martinussen, T., Flambard, B., Sørensen, K.I. y Otte, J. 2009. Peptide profiles and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity of fermented milk products: Effect of bacterial strain, fermentation pH, and storage time. *International Dairy Journal*. 19: 155-165.
- Ondetti, M.A. y Cushman, D.W. 1982. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*. 51: 283-308.
- Ondetti, M.A., Rubin, B. y Cushman, D.W. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensina I-converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science*. 196(4288): 441-444.
- Otte, J., Lenhard, T., Flambard, B. y Sørensen, K.I. 2011. Influence of fermentation temperature and autolysis on ACE-inhibitory activity and peptide profiles of milk fermented by selected strains of *Lactobacillus helveticus* and *Lactococcus lactis*. *International Dairy Journal*. 21(4): 229-238.
- Pan, L. y Gross, W. K. 2005. Transcriptional regulation of renin: An update. *Journal of Hypertension*. 45(1): 3-8.
- Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R.J. y O'Brien, N.M. 2009. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*. 19: 643-654.
- Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 11(9-10): 347-356.
- Pihlanto-Leppälä, A., Rokka, T. y Korhonen, H. 1998. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*. 8(4): 325-331.

- Pihlanto-Leppälä, A., Virtanen, T. y Korhonen, H. 2010. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*. 20(1): 3-10.
- Quirós, A., Dávalos, A., Lasunción, M.A., Ramos, M. y Recio, I. 2008. Bioavailability of the antihypertensive peptide LHLPLP: Transepithelial flux of HLPLP. *International Dairy Journal*. 18: 279-286.
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado M.A., Miguel, M., Aleixandre, A. y Recio, I. 2007. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*. 17: 33-41.
- Rao, S.Q., Ju, T., Sun, J., Su, T.J., Xu, R.R. y Yang, Y.J. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysate of hen egg white lysozyme. *Food Research International*. 46: 127-134.
- Rodríguez-Figueroa, J.C., Gonzalez-Cordova, A.F., Torres-Llanez, M.J., Garcia, H.S. y Vallejo-Cordoba, B. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced in fermented milk by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 95: 5536-5543.
- 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(11): 5032-5038.
- Rodríguez-Figueroa, J.C., González-Córdova, A.F., Astiazaran-García, H. y Vallejo-Córdoba, B. 2013a. Hypotensive and heart rate-lowering effects in rats receiving milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *British Journal of Nutrition*. 109(5): 827-833.
- Rodríguez-Figueroa, J.C., González-Córdova, A.F., Astiazaran-García, H., Hernández-Mendoza, A. y Vallejo-Córdoba, B. 2013b. Antihypertensive and hypolipidemic effect of milk fermented by specific *Lactococcus lactis* strains. *Journal of Dairy Science*. 96(7): 4094-4099.

- Ryhänen, E. L., Pihlanto-Leppälä, A. y Pahkala, E. 2001. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *International Dairy Journal*. 11(4-7): 441-447.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y. y Itoh, T. 2000. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. 83(7): 1434-1440.
- Salehi-Abargouei, A., Maghsoudi, Z., Shirani, S. y Azadbakht, L. 2013. Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or nonfatal cardiovascular diseases incidence: A systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. *Nutrition*. 29(4): 611-618.
- Sarmiento, L.A. 2006. Alimentos funcionales, una alternativa de alimentación. *Revista Orinoquia*. 10(1): 16-23.
- Scow, T. D., Smith, G. E. y Shaughnessy, F. A. 2003. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin-receptor blockers in heart failure. *Clinical Pharmacology*. 68(9): 1795-1798.
- Secretaria de Salud. 2010. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial, para quedar como Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. *Diario Oficial de la Federación [DOF]*.
- Secretaria de Salud. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación [DOF]*.
- Segura, C.M., Chel, G.L. y Betancur, A.D. 2010. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. *Revista Chilena de Nutrición*. 37(3): 386-391.
- Sentandreu, M.A. y Toldrá, F. 2007. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chemistry*. 102: 511-515.

- Sheih, C., Fang, T.J. y Wu, T.K. 2009. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chemistry*. 115: 279-284.
- Shimizu, M. 2004. Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*. 21(1-4): 43.
- Singh, B.P., Vij, S. y Hati, S. 2014. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*. 54: 171-179.
- Sosa, R.J. 2010. Tratamiento no farmacológico de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 71(4): 241-244.
- Suetsuna, K. y Chen, J. R. 2001. Identification of antihypertensive peptides from peptic digests of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Journal of Marine Biotechnology*. 3(4): 305-309.
- Torres-Llenez, M.J., González-Córdova, A.F., Hernández-Mendoza, A., García, H.S. y Vallejo-Córdova, B. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in Mexican Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*. 94: 3794-3800.
- Torres-Llenez, M.J., Vallejo-Córdova, B. y González-Córdova, A.F. 2005. Péptidos bioactivos derivados de las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 55(2): 111-117.
- Udenigwe, C.C. y Aluko, R.E. 2012. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*. 71 (1): 11-24.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J. y Verstraete, W. 2005. Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(3): 399-405.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, A. y Verstraete, W. 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*. 92(3): 357-366.
- Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C.J.M. y Sips, A.J.A.M. 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing

- the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*. 43: 31-40.
- Vioque, J. y Millán, F. 2006. Los péptidos bioactivos en alimentación: Nuevos agentes promotores de salud. *CTC Alimentación*, 26: 103-107.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M. y Millán, F. 2000. Péptidos Bioactivos en Proteínas de Reserva. *Grasas y Aceites*. 51(5): 361-365.
- Wang, W. y González de Mejia, E. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 4(4): 63-78.
- World Health Organization. 2012. *World health statistics 2012*. Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Yamada, Y., Matoba, N., Usui, H., Onishi, K., y Yoshikawa, M. 2002. Design a highly potent anti-hypertensive peptide based on ovokinin(2–7). *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*. 66: 1213-1217.
- Yamaguchi, N., Kawaguchi, K. y Yamamoto, N. 2009. Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *European Journal of Pharmacology*. 620: 71-77.
- Yust, M., Pedroche, J., Girón, C.J., Alaiz, M., Millán, F. y Vioque, J. 2003. Production of ACE inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*. 81(3): 363-369.