

PREMIO U.C.M. DE INVESTIGACIÓN 2008/2009 LÍNEA 3000

# Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias

*Maria Amaya Aleixandre de Artiñano  
Marta Miguel Castro*



Queda rigurosamente prohibida sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo público.

© 2009 by María Amaya Aleixandre de Artiñano y Marta Miguel Castro  
© 2009 by Editorial Complutense, S. A.  
Donoso Cortés, 63 – 4. planta (28015) Madrid  
Tels.: 91 394 64 60/1 Fax: 91 394 64 58  
e-mail: [ecsa@rect.ucm.es](mailto:ecsa@rect.ucm.es)  
[www.editorialcomplutense.com](http://www.editorialcomplutense.com)

Primera edición digital: septiembre 2009

ISBN: 978-84-7491-975-2

**PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS**

**DERIVADOS DE**

**PROTEÍNAS ALIMENTARIAS**

**PREMIO DE INVESTIGACIÓN**

**DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**“LÍNEA 3000”**

**Área: Ciencias de la Salud**

**Categoría: Profesorado universitario**

**Seudónimo: NUTRISALUD**

Que los que disfrutan comiendo descubran nuevos valores en los alimentos; que los que se preocupan por su salud encuentren en ellos una solución a sus problemas; y que unos y otros disfruten leyendo este texto.

*A todos los que han facilitado su publicación*

*A todos los que dediquen algún tiempo a su lectura*

## Resumen

Algunas secuencias peptídicas que pueden liberarse por hidrólisis de las proteínas alimentarias, son capaces de producir un descenso del tono arterial. Es obvio el interés que tiene la investigación sobre estos péptidos antihipertensivos, pues las estrategias no farmacológicas para el control de la presión arterial son siempre muy recomendables. Hay que tener en cuenta que la hipertensión constituye un problema de gran importancia socio-sanitaria, y que esta enfermedad es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. El coste del tratamiento farmacológico antihipertensivo es además muy elevado.

Lo más usual para obtener péptidos antihipertensivos a partir de proteínas alimentarias, es provocar la hidrólisis de estas proteínas exponiéndolas a distintas enzimas. La hidrólisis enzimática de la proteína de origen, proporciona un hidrolizado que debe caracterizarse y estudiarse. Ello permite establecer su posible actividad. Mediante distintas técnicas, se pueden identificar y aislar después las secuencias peptídicas concretas que son responsables del efecto.

El principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario, es la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La unión a esta enzima se favorece por la presencia de

aminoácidos hidrófobos en alguna de las 3 últimas posiciones del extremo carboxi-terminal de las secuencias peptídicas. Los residuos Trp, Tyr, Phe y Pro son los que más favorecen la unión. Las secuencias Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), que tienen el aminoácido Pro en este extremo, se han caracterizado como potentes inhibidoras de la ECA. Estas secuencias son responsables del efecto antihipertensivo de muchos productos lácteos fermentados. De todos modos, la determinación de la actividad inhibidora de la ECA, es sólo un punto de partida en la selección de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario. Otros mecanismos pueden también justificar su efecto. Estos péptidos pueden presentar actividad directa en vasos, y pueden modular la liberación desde el endotelio de sustancias que relajan o contraen el músculo liso vascular. Las propiedades antioxidantes de algunos de estos péptidos pueden también colaborar a su efecto antihipertensivo.

Los hidrolizados y péptidos mencionados anteriormente, pueden utilizarse como ingredientes en alimentos que servirán para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión. Hay no obstante que tener en cuenta que cuando estos péptidos se administran por vía oral, pueden degradarse en el organismo antes de alcanzar sus puntos de acción. Algunos procedimientos permiten evaluar *in vitro* la resistencia de las secuencias peptídicas a las enzimas del tracto digestivo. Los estudios en células Caco-2 permiten asimismo conocer los mecanismos de absorción y transporte de los péptidos en el epitelio intestinal. Para establecer el efecto real sobre la presión arterial son, sin embargo, ineludibles los ensayos

experimentales en los que los péptidos seleccionados se administran a animales hipertensos. Para estos ensayos se utilizan normalmente ratas espontáneamente hipertensas.

Son especialmente importantes los hidrolizados y péptidos antihipertensivos que provienen de proteínas lácteas. Estos péptidos pueden obtenerse mediante la hidrólisis enzimática de estas proteínas, y también pueden obtenerse por fermentación de la leche con distintas bacterias. Destacan los productos antihipertensivos obtenidos por fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus*, pues esta bacteria tiene una elevada actividad proteolítica. Pueden producirse también péptidos antihipertensivos durante el proceso de maduración del queso.

Algunos estudios han abordado la producción de péptidos antihipertensivos a partir de otros materiales biológicos distintos de la leche. En este contexto, son especialmente relevantes los estudios con proteínas de huevo y de pescado. Los primeros péptidos antihipertensivos aislados del huevo derivan de hidrolizados enzimáticos de la ovoalbúmina. Corresponden a las secuencias Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL = ovokinina) y Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe (RADHPF = ovokinina 2-7). Ambas secuencias presentan actividad vasodilatadora endotelio-dependiente. Algunos productos obtenidos por hidrólisis de las proteínas de

pescado, especialmente por hidrólisis de las proteínas de bonito, han mostrado también actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva.

Las proteínas de origen vegetal pueden ser asimismo una fuente para la obtención de péptidos bioactivos. Entre los péptidos aislados de proteínas vegetales destacan los que provienen de proteínas de soja. Recientemente se han aislado muchas fracciones peptídicas con actividad inhibidora de la ECA partiendo de este alimento. Existen, sin embargo, pocos estudios que hayan evaluado la actividad antihipertensiva de los derivados de la soja en modelos animales.

Algunos péptidos de origen alimentario han probado ya su eficacia y seguridad en pacientes hipertensos, y algunos se han comercializado en alimentos funcionales que se utilizan actualmente con esta finalidad. El mercado de estos alimentos ha experimentado un crecimiento espectacular en los últimos años, pues su demanda es cada vez mayor. Hoy día se asume que estos alimentos deben incluirse dentro de una dieta sana y equilibrada, ya que pueden aportar claros beneficios sobre la salud de los consumidores en general, y especialmente sobre la salud de algunos pacientes con patologías frecuentes como la hipertensión arterial.

**Palabras clave:** Alimentos funcionales, Enzima convertidora de la angiotensina, Hipertensión, Huevo, Leche, Péptidos, Pescado, Proteínas, Soja.

## ÍNDICE

<b>1. Introducción: Hipertensión y péptidos antihipertensivos de origen alimentario</b>	<b>1</b>
<b>2. Mecanismos implicados en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario</b>	<b>6</b>
<i>-Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina</i>	6
<i>-Efecto vascular directo y mediado por liberación de factores endoteliales</i>	21
<i>-Efectos antioxidantes</i>	30
<b>3. Estrategias para la obtención de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias</b>	<b>37</b>
<b>4. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas</b>	<b>50</b>
<b>5. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de huevo</b>	<b>59</b>
<b>6. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de pescado</b>	<b>65</b>
<b>7. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas vegetales</b>	<b>68</b>
<b>8. Tablas</b>	<b>71</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>75</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>76</b>

## **1. Introducción: Hipertensión y péptidos antihipertensivos de origen alimentario**

La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) por encima de los valores normales. Esta patología constituye un problema de gran importancia socio-sanitaria. Su trascendencia está hoy día fuera de toda duda, debido a razones de prevalencia, y debido también a que es uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Es, de hecho, la primera causa de mortalidad en los países desarrollados. Se estima que por cada disminución de la PAD de 5 mm Hg, se reduce aproximadamente un 16% el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Collins et al., 1990; MacMahon et al., 1990). Por todo ello, los expertos sanitarios están intentando conseguir que el tratamiento de la hipertensión sea más eficaz y se instaure antes. Se ha aceptado recientemente que las cifras tope de presión arterial que establecen el rango de normalidad disminuyan. Con los criterios actuales, muchos individuos que antes se consideraban normotensos se consideran hoy día sujetos prehipertensos. Las nuevas guías (Nacional Heart, Lung and Blood Institute, 2003), aportan la siguiente clasificación para distintos rangos de presión arterial:

- Normal: PAS < 120 mm Hg / PAD < 80 mm Hg

- Prehipertensión: PAS 120-139 mm Hg / PAD 80-90 mm Hg

- Hipertensión estadio 1: PAS 140-159 mm Hg/ PAD 90-99 mm Hg
- Hipertensión estadio 2: PAS>160 mm Hg/ PAD>100 mm Hg

La hipertensión primaria, denominada idiopática o esencial, que cursa sin causa orgánica evidente, es la que presenta una mayor prevalencia (90-95% de las personas hipertensas padecen hipertensión primaria). Juegan un papel importante en su desarrollo distintos factores genéticos, ambientales, psicosociales y alimentarios. Aunque la detección y el control de esta enfermedad son relativamente sencillos, la realidad es que muchos pacientes hipertensos no tienen conocimiento de su situación, y otros están diagnosticados pero reciben un tratamiento inadecuado. En España por ejemplo, sólo entre un 5% y un 10% de los pacientes hipertensos reciben el tratamiento adecuado (Wolf-Maier et al., 2004). Pese a ello, el coste anual de los tratamientos antihipertensivos es importante. Teniendo en cuenta los costes directos y los costes indirectos, en nuestro país el gasto total que ocasiona esta enfermedad asciende casi a 3000 millones de euros anuales (Rodizio Díaz, 2000). En Estados Unidos, el coste de los fármacos empleados en el tratamiento de la hipertensión arterial y patologías asociadas, es también considerable. En el año 2004 superó los 15000 millones de dólares (Fischer y Avorn, 2004).

En estos últimos años, la sociedad se ha concienciado de la estrecha

relación que existe entre dieta y salud. Como consecuencia de ello, han irrumpido con fuerza los alimentos funcionales. El Internacional Life Science Institute (ILSI) los define como aquellos alimentos que, con independencia de su valor nutricional, aportan efectos beneficiosos sobre una o más funciones fisiológicas, y pueden mejorar el estado de salud y bienestar, o bien pueden reducir el riesgo de trastornos en el organismo (Diplock et al., 1998). Estos alimentos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Dentro de una dieta sana y equilibrada, los alimentos funcionales deben consumirse en las mismas cantidades en las que habitualmente se consumen el resto de los alimentos.

La investigación sobre alimentos funcionales ha dedicado especial atención a las proteínas de la dieta. Algunos fragmentos de la secuencia de estas proteínas pueden liberarse mediante hidrólisis, y una vez liberados exhiben actividad biológica. Estos fragmentos, o péptidos bioactivos, se generan usualmente *in vivo* por acción de las enzimas gastrointestinales. Pueden también obtenerse *in vitro* con enzimas específicas, o producirse durante la elaboración de determinados alimentos.

Desde su descubrimiento en 1979, se han descrito péptidos bioactivos con diferentes actividades biológicas (Gobbeti et al., 2000). Algunos son capaces de producir un descenso del tono arterial y permiten controlar la hipertensión. Las estrategias no farmacológicas para controlar la presión arterial son muy

recomendables, y dentro de este marco de actuación, es obvio el interés que actualmente tiene la investigación sobre péptidos antihipertensivos de origen alimentario. Los alimentos funcionales que los contienen, pueden representar, de hecho, una nueva estrategia para la prevención y/o el tratamiento de una importante enfermedad en la sociedad actual.

Se han obtenido péptidos antihipertensivos a partir de proteínas de distintos alimentos de origen animal y vegetal. Los principales son péptidos antihipertensivos que provienen de proteínas lácteas. Esto es importante, ya que la leche es un alimento primario. El huevo, un producto fundamental en la alimentación actual, y otros alimentos de consumo frecuente como el pescado, el maíz, la soja y distintos vegetales, pueden ser también una fuente importante de péptidos antihipertensivos.

El presente capítulo relata los hallazgos más importantes de la investigación actual sobre hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias. En él se comentan los posibles mecanismos de acción de estos péptidos, y se describen las estrategias utilizadas para seleccionarlos y evaluarlos. Se analizan, asimismo, las perspectivas de utilización de estos productos.

La Tabla 1 que aparece en el apartado 8 (ver página 72) puede facilitar la

identificación de los distintos péptidos que aparecen en este texto. En ella figura la nomenclatura de los diferentes aminoácidos, establecida con códigos de tres y de una letra

## **2. Mecanismos implicados en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario**

### *Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina*

El principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario, es la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La actividad de esta enzima resulta decisiva para la eficacia de un sistema, el sistema renina-angiotensina, que juega un papel crucial en el mantenimiento de la tensión arterial, y que juega también un papel importante en el daño orgánico secundario a la elevación de esta variable. La modulación del tono arterial por el sistema renina-angiotensina puede ser, en realidad, crítica en algunos pacientes hipertensos. Expondremos a continuación las vías bioquímicas de este sistema, comentando la significación fisiológica de los péptidos que en él se forman. La Figura 1 muestra un esquema de estas vías y estos péptidos. En el presente apartado se expondrán asimismo algunos conceptos sobre el sistema de las quininas, ya que la ECA también juega un papel relevante en este sistema. Se establecerán también los requerimientos estructurales de los compuestos y los péptidos que inhiben la ECA.



La renina es una glucoproteína de 350 aminoácidos, con actividad proteasa, que presenta alta especificidad de sustrato. Se sintetiza y almacena en unas células musculares especializadas, las células yuxtaglomerulares, situadas en la pared de la arteria renal eferente. Su secreción está controlada por distintos factores, entre los cuales resulta prioritaria la disminución de la presión de perfusión renal al bajar la presión arterial sistémica, y también la reducción de la carga renal de sodio. La Figura 2 muestra un esquema de la regulación fisiológica para la secreción de renina en el sistema renina-angiotensina.

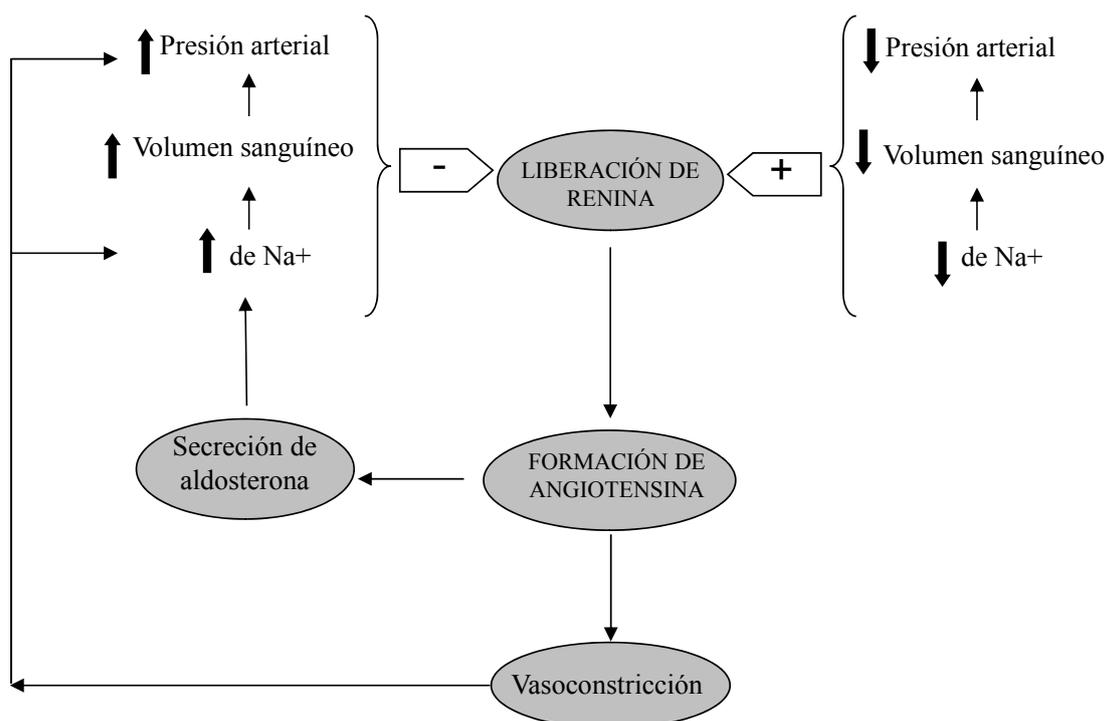


Figura 2: Regulación fisiológica de la secreción de renina en el sistema renina-angiotensina.

Aunque la renina no es una sustancia presora por sí misma, es capaz de iniciar la formación de un péptido activo a partir de un sustrato proteico denominado angiotensinógeno. El angiotensinógeno se sintetiza en el hígado, está presente en la fracción  $\alpha_2$  globulínica del plasma y es, en realidad, el único sustrato para la renina. Está constituido por glucoproteínas que contienen un residuo peptídico de 14 aminoácidos, de los cuales los diez primeros corresponden a la secuencia de la angiotensina. Esta secuencia se libera cuando la renina actúa sobre el angiotensinógeno a nivel de la unión Leu-Leu, pero el decapeptido que así se libera, denominado angiotensina I, carece de actividad. La ECA, una glicoproteína plasmática, cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con potente actividad vasoconstrictora. La ECA es una metaloenzima transmembranal, no específica, que contiene Zn. Se encarga de separar dipéptidos carboxi-terminales de diferentes sustratos proteicos, y se denomina por eso peptidildipeptidasa. Promueve la separación del dipéptido carboxi-terminal de la angiotensina I actuando sobre la unión Phe-His de este compuesto (Figura 1). La ECA humana se presenta en dos formas. Una de ellas, la ECA somática, tiene un peso molecular (Pm) de 150-180 kDa, y contiene dos dominios homólogos que, de acuerdo a su posición en la cadena, se denominan N-terminal, o dominio-N, y C-terminal, o dominio-C. Ambos dominios contienen Zn en el sitio de unión, y tienen un centro activo (Deddish et al., 1996). La otra forma de la ECA tiene bajo Pm (90-100 kDa), se encuentra en el testículo (ECA germinativa o testicular), y contiene solamente el dominio-C (Bree et al., 1992; Williams et al., 1992).

La angiotensina II ejerce sus acciones a través de su unión a receptores específicos. Los mejor conocidos son los receptores AT<sub>1</sub> y los receptores AT<sub>2</sub>. Las acciones características de la angiotensina II están mediadas por los receptores AT<sub>1</sub>, cuya activación promueve, entre otras cosas, un incremento de la concentración intracelular de calcio, y asimismo un aumento de la contracción del músculo cardíaco y del tono arteriovenoso. La activación de estos receptores también estimula la síntesis y liberación de aldosterona en la corteza suprarrenal.

La angiotensina III es el primer metabolito de la angiotensina II. Se forma cuando una aspartil-aminopeptidasa escinde el aminoácido Asp del extremo amino-terminal de la angiotensina II. Se llama por eso también des-Asp-angiotensina II. Este heptapéptido conserva todavía una importante actividad fisiológica, y tiene afinidad también por receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Puede ser responsable de algunos de los efectos observados cuando se administra angiotensina II, pero sus propiedades no se han esclarecido totalmente, y pueden variar en distintos tejidos. Se sabe que la angiotensina III es el principal péptido efector del sistema renina-angiotensina cerebral. Este compuesto podría ejercer un control central tónico sobre la presión arterial. En el tejido cerebral la principal enzima responsable de la formación de angiotensina III es la aminopeptidasa A. Se conoce una vía para la síntesis de angiotensina III que evita formar angiotensina II. En esta vía las enzimas actúan en distinto orden. La angiotensina I

es hidrolizada en primer lugar por una aspartil-aminopeptidasa, formándose el nonapéptido des-Asp-angiotensina I. A continuación, sobre la des-Asp-angiotensina I actúa la ECA, y forma angiotensina III (Figura 1) (Gaynes et al., 1978; Sexton et al., 1979; García del Río et al., 1981).

El ataque de la angiotensina III por la aminopeptidasa N produce otro metabolito activo de 6 aminoácidos, la angiotensina IV. La angiotensina IV puede interactuar con los clásicos receptores de la angiotensina II, los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>, pero se han identificado sitios específicos de unión para angiotensina IV, los receptores AT<sub>4</sub> (Swanson et al., 1992). Estos receptores aparecen en distintos tejidos (cerebro, membranas cardíacas, riñón y células de los conductos colectores humanos). También se expresan en algunos cultivos celulares. Están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, donde su activación por la angiotensina IV parece estar vinculada a procesos de memoria, aprendizaje y desarrollo neuronal. También se atribuye a la angiotensina IV un papel funcional en la regulación del flujo sanguíneo en diferentes tejidos. El péptido actuaría en el pulmón como un relajante vascular, pues en las células endoteliales de este órgano, el receptor de angiotensina IV media la activación de la sintasa de óxido nítrico (NO) (Patel et al., 1998). En otros lechos vasculares se ha observado que la angiotensina IV actúa como vasoconstrictora, vía receptores AT<sub>1</sub> (Gardiner et al., 1993; Garrison et al., 1995; Loufrani et al., 1999). El subsiguiente ataque de las angiotensinas III y IV por amino- y carboxi-peptidasas, da lugar a péptidos inactivos (Song y Healy 1999; Turner y Hooper, 2002).

Las quininas son péptidos que se forman a partir de sustratos denominados quinínógenos, presentes en el plasma, la linfa y el fluido intersticial de los mamíferos. Se forman cuando sobre estos sustratos actúan un grupo de proteasas séricas, que son similares a otras enzimas conocidas, tales como tripsina, trombina o plasmina. Las dos principales quininas conocidas son la calidina, también denominada Lys-bradiquinina, con 10 aminoácidos, y la bradiquinina, un potente vasodilatador que tiene 9 aminoácidos. Aparentemente existe otra quinina con 11 aminoácidos, la Met-Lys-bradiquinina. Estas quininas se inactivan por distintas enzimas plasmáticas y tisulares; es decir, por enzimas que se encuentran en la sangre o en las membranas celulares. El ataque de las quininas en el extremo amino-terminal no puede considerarse propiamente una inactivación, ya que las aminopeptidasas que actúan en este extremo liberan los aminoácidos Met y Lys, y permiten la formación de calidina a partir de la Met-Lys-bradiquinina, y de bradiquinina a partir de calidina. Esas aminopeptidasas son semejantes a la tripsina. Sobre el enlace Arg-Pro de la bradiquinina podrían actuar prolidasas e imidopeptidasas, pero estas enzimas se duda que participen fisiológicamente en la inactivación de la bradiquinina. Las enzimas proteolíticas que actúan a nivel del grupo C-terminal de las quininas son, en realidad, las que tienen a su cargo la inactivación de estos péptidos. Se conocen dos enzimas que actúan sobre este grupo, la quininasa I y la quininasa II. Ambas son metaloproteínas. La quininasa I produce metabolitos activos, y la quininasa II, que es la que proporciona metabolitos biológicamente inactivos, se cree que es idéntica a la ECA. La ECA se

encarga también, por lo tanto, de la hidrólisis e inactivación de la bradiquinina, y de la hidrólisis de otros potentes péptidos vasodilatadores (Figura 1). La bradiquinina ejerce su acción vasodilatadora a través de receptores B<sub>2</sub> endoteliales, que median la síntesis y liberación de prostaglandinas, NO y factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Bernier et al., 2000; Tom et al., 2002; Landmesser y Drexler, 2006).

La inhibición de la ECA supone la inhibición de la formación de distintos compuestos vasoconstrictores (entre ellos, la angiotensina II, que es la sustancia presora más potente que se conoce) y la inhibición de la degradación de distintas sustancias vasodilatadoras (entre ellas, la bradiquinina, que es el más potente de los vasodilatadores conocidos). Sin embargo, cuando se inhibe la ECA, no se bloquea completamente la producción de angiotensina II. Esto se debe, en parte, a la conversión de angiotensina I en angiotensina II por acción de distintas quimasas. Tiene especial importancia la quimasa que hidroliza la angiotensina I, aislada en los mastocitos y en las células endoteliales del corazón humano (Husain, 1993). En el ventrículo izquierdo del corazón humano, la formación de angiotensina II por acción de esta quimasa parece más importante que la formación de este compuesto por acción de la ECA (Urata et al., 1996; Song y Healy 1999; Turner y Hooper, 2002). Hay también que tener en cuenta que además de la vía clásica, existen otras vías enzimáticas de síntesis de angiotensina II. Se ha postulado una vía puente de formación de angiotensina II sorteando la ECA, en la que se forma previamente angiotensina 1-9 (Figura 1).

Esta vía tiene mayor importancia en tejidos como el corazón, los vasos sanguíneos y el sistema nervioso. Así, en el corazón humano, la catepsina A y la ECA<sub>2</sub> son responsables de procesar angiotensina I en angiotensina 1-9 (Donoghue et al., 2000). Otras metalopeptidasas (prolil-endopeptidasas) producen a partir de angiotensina I, angiotensina 1-7, péptido que también puede generarse a partir de angiotensina II. La angiotensina 1-7 puede considerarse una hormona paracrina que contrabalancea negativamente las acciones de la angiotensina II en el sistema cardiovascular, en el riñón y en el sistema nervioso central. Posee efectos antiproliferativos y vasodilatadores, que están mediados por la liberación de NO y prostaglandinas (Almeida et al., 2000). La ECA tiene también la propiedad de procesar la angiotensina 1-7 a angiotensina 1-5, y lo hace con una rapidez 100 veces mayor por el dominio-N que por el dominio-C (Deddish et al., 1998), lo que evidencia que los dos dominios de la ECA pueden tener diferentes funciones. La concentración de angiotensina 1-7 aumenta significativamente durante la administración de inhibidores de la ECA, y se sospecha que el aumento de este péptido está relacionado con el efecto beneficioso de estos compuestos. La angiotensina 1-5 no aparece prácticamente en el plasma. No participa en la modulación de la presión arterial y su función sería únicamente central.

Clásicamente se ha considerado al sistema renina-angiotensina un sistema circulante de acción endocrina, pero hoy día se sabe que la mayoría de sus componentes se expresan en grado variable en diferentes tejidos. Este sistema cumple funciones diversas en ellos. Se sabe, concretamente, que los vasos

sanguíneos pueden sintetizar y secretar angiotensina II. Este péptido ejerce efectos locales paracrinos/autocrinos/intracrinis sobre las funciones vasculares. El ácido ribonucleico mensajero de la renina está, sin embargo, pobremente expresado en el tejido vascular, y no parece que la síntesis local de angiotensina II contribuya demasiado a la generación de este péptido en los vasos. Se ha aludido a una internalización de la renina plasmática en la pared vascular. Se piensa que la renina y la angiotensina II de origen sistémico controlarían sobre todo las funciones vasculares agudas, tales como el tono vascular y la presión sanguínea. El sistema renina-angiotensina local sería, sin embargo, responsable del mantenimiento y la reparación de los tejidos.

Los inhibidores de la ECA se descubrieron en los venenos de algunas víboras como péptidos inhibidores de la quininasa II, que potenciaban a la bradiquinina (Cushman et al., 1973; Ondetti et al., 1977). Estos péptidos, que tenían entre 5 y 13 aminoácidos, se aislaron primero y se sintetizaron después. Eran potentes y específicos, pero no resultaban los compuestos ideales para inhibir la ECA, ya que su molécula era relativamente grande para la interacción enzimática, y no eran activos por vía oral. El más activo fue un péptido denominado teprótido, con 9 aminoácidos. En la figura 3 se representa su interacción con la ECA, al igual que la interacción de la angiotensina I con esta enzima. Más tarde se sintetizó el captopril, un octapéptido inhibidor específico de la enzima, que tenía una estructura más adecuada y resultaba activo por vía oral. Este compuesto encabeza un grupo farmacológico, conocido propiamente como

los inhibidores de la ECA, que es en la actualidad prioritario para el tratamiento de la hipertensión. Los fármacos que lo componen ejercen su acción interaccionando con el grupo Zn que contiene la ECA en su centro activo. Este es también el lugar de unión de la enzima a la angiotensina I. En la Figura 3 se puede ver la interacción del captopril y de la angiotensina I con la ECA. Los inhibidores de la enzima impiden la transformación de angiotensina I en angiotensina II, y bloquean la cascada del sistema renina-angiotensina-aldosterona, pero no impiden las acciones de la angiotensina II. Algunos de los componentes del grupo contienen un grupo sulfhidrilo, y están estructuralmente relacionados con el captopril. Otros presentan una estructura distinta, y muchos son profármacos inactivos que tienen una biodisponibilidad mejor, pero que necesitan que actúe sobre ellos una esterasa *in vivo* para generar el compuesto activo. Recientemente se ha constatado que los inhibidores de la ECA son también capaces de estimular la síntesis de NO, y lo hacen a través de una activación directa de los receptores B<sub>1</sub>, que se expresan sobre todo en situaciones patológicas (Marceau et al., 1995; 1997; Ni et al., 1998).

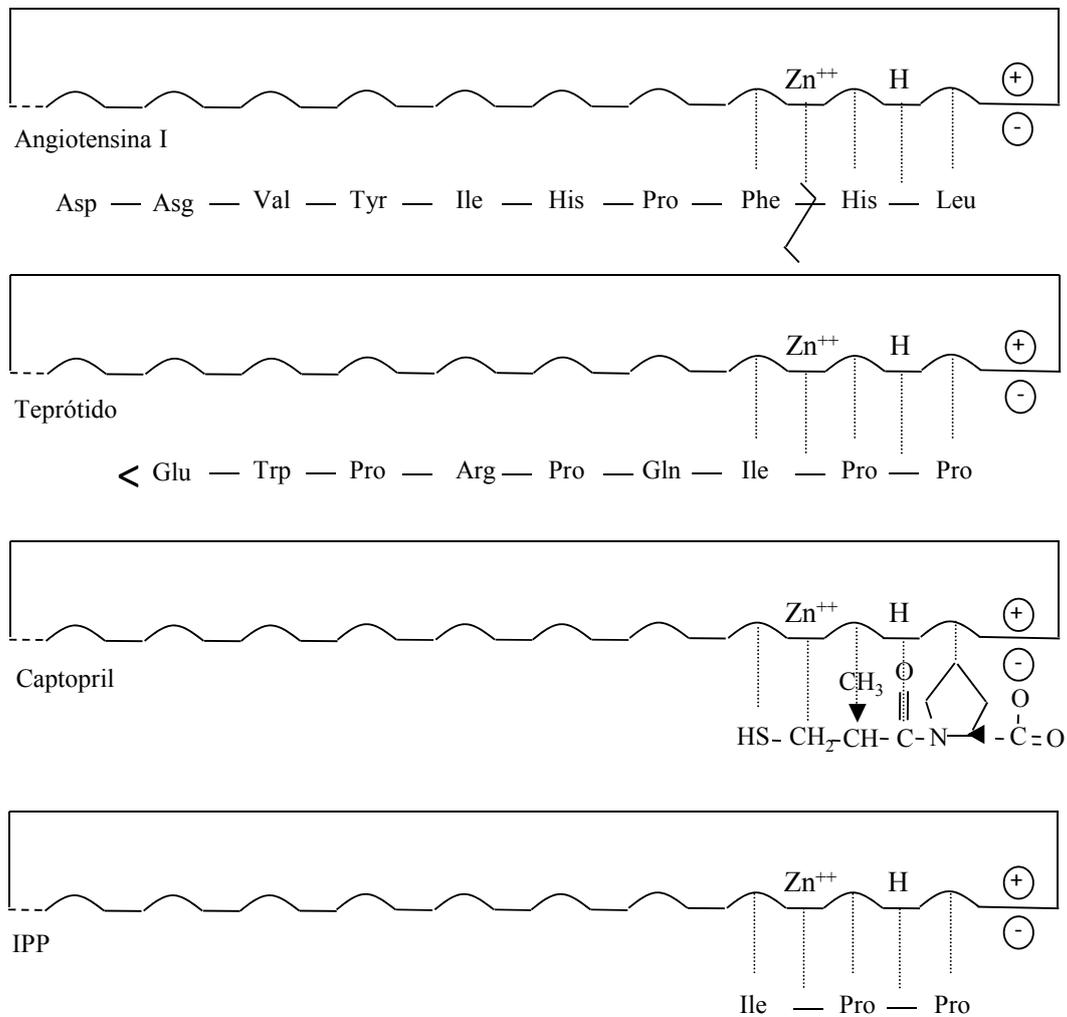


Figura 3: Interacción de la angiotensina I, teprótido, captopril y el péptido IPP, derivado de proteínas lácteas, con la enzima convertidora de angiotensina.

No se conocen con exactitud los requerimientos estructurales de los péptidos de origen alimentario que inhiben la ECA. La inhibición de la enzima parece implicar la interacción de estos péptidos con alguna zona aniónica distinta del sitio catalítico de la enzima, o con subsitios de la enzima normalmente no ocupados por otros substratos (Meisel, 1997). Estos péptidos son usualmente secuencias de 2 a 12 aminoácidos, aunque algunos contienen hasta 27 aminoácidos. La relación estructura-actividad parece más clara para los que tienen menos de 7 aminoácidos. La unión enzimática está especialmente condicionada por la secuencia tripeptídica carboxi-terminal de los péptidos, que puede interaccionar con tres regiones del centro activo de la ECA. La unión se favorece por la presencia de aminoácidos hidrófobos en alguna de estas 3 últimas posiciones. Los residuos Trp, Tyr, Phe y Pro son los que en principio más favorecen la unión (Ondetti y Cushman, 1982). Lo más importante y decisivo para la unión, es que el aminoácido Pro ocupe justo el extremo carboxílico (Rohrbach et al., 1981). Hay que tener en cuenta, que la estructura rígida del anillo de la Pro, permite que la orientación del grupo carboxilo sea muy adecuada para interaccionar con la enzima (Cushman et al., 1977). La presencia del residuo Pro en la penúltima posición del extremo carboxílico, no parece, sin embargo, que favorezca la unión (Cheung et al., 1980). La secuencia carboxi-terminal Phe-Ala-Pro (FAP), análoga a la que presentaba el inhibidor de la ECA inicialmente encontrado en los extractos de veneno de serpiente, es una de las más favorables para la unión al sitio catalítico de esta enzima. Los péptidos pueden adoptar distintas configuraciones, y esto es también importante. El cambio en la posición carboxi-terminal de la forma trans a la forma cis del aminoácido Pro, puede

ocasionar modificaciones importantes de la actividad (Gómez Ruiz et al., 2004a). Se ha sugerido también que la actividad inhibidora de la ECA, aumenta por la presencia del aminoácido Leu en el extremo carboxi-terminal (Kim et al., 2001; Gómez-Ruiz et al., 2004b). Aumenta asimismo por la presencia en este extremo de aminoácidos que presentan carga positiva, tales como Lys con el grupo  $\epsilon$ -amino, y Arg con el grupo guanidino. La presencia de un aminoácido aromático en la antepenúltima posición también favorece la unión a la ECA (Cheung et al., 1980). La ECA presenta, por el contrario, poca afinidad por sustratos que presentan en su extremo carboxilo aminoácidos dicarboxílicos (Erdös, 1976; Cushman et al., 1977; Cheung et al., 1980). El extremo amino-terminal del péptido también podría influir en la actividad inhibidora de la ECA. La presencia de Val, o de Ile, en esta posición, la incrementa (Cheung et al., 1980). La conformación D o L es además muy importante para la actividad inhibidora de la ECA. Algunos enantiómeros L presentan hasta 100 veces menos actividad que los correspondientes enantiómeros D (Cushman et al., 1977).

La inhibición de la formación de angiotensina II *in vitro*, que refleja la interacción en estas condiciones de un compuesto con la ECA, es un “test” frecuente para evaluar fármacos antihipertensivos. La potencia para inhibir la ECA se expresa usualmente como la concentración, o dosis de un compuesto, necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima ( $IC_{50}$ ). El captopril, fármaco considerado prototipo para inhibir la ECA, presenta un valor de  $IC_{50}$  próximo a 0.02  $\mu$ M (Suetsuna, 1998; Fujita y Yoshikawa, 1999; Matsui et al.,

1999). Se han utilizado técnicas espectrofotométricas, fluorimétricas, cromatográficas y de electroforesis capilar, para medir *in vitro* la capacidad inhibidora de la ECA de los hidrolizados y péptidos procedentes de proteínas alimentarias. Su  $IC_{50}$ , así establecido, representa también una aproximación del posible efecto antihipertensivo de estos compuestos (Li et al., 2005). Uno de los métodos más utilizados para obtener el valor de  $IC_{50}$  de estos péptidos, es el de Cushman y Cheung (1971) (Cushman y Cheung, 1971), posteriormente modificado por Nakamura et al. en 1995 (Nakamura et al., 1995a). Este método utiliza el compuesto hipuril histidil leucina, en vez de angiotensina I, como sustrato para reaccionar con la ECA. Cuando la ECA reacciona con la angiotensina I, se libera el dipéptido His-Leu (HL) y angiotensina II. Cuando esta enzima actúa sobre este otro sustrato, libera el mismo dipéptido y ácido hipúrico. Después de haber extraído el ácido con etil acetato, se cuantifica la cantidad de ácido hipúrico liberada, que refleja la actividad de la ECA. Se ha utilizado también otro método espectrofotométrico, basado en la liberación del dipéptido Gly-Gly (GG) cuando la ECA reacciona con el derivado furanociloil del tripéptido Phe-Gly-Gly (FGG), para establecer la inhibición de esta enzima que produce un compuesto (Vermeirssen et al., 2002a). Este método también se ha intentado mejorar introduciendo algunas modificaciones (Murray et al., 2004). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que ninguno de los procedimientos utilizados es exacto, y que los resultados que proporcionan unos y otros métodos no son homogéneos, pues la sensibilidad de cada uno es distinta.

*Efecto vascular directo y mediado por liberación de factores endoteliales.*

La pared de las arterias está constituida por tres capas perfectamente determinadas morfológicamente: íntima (o endotelio), media y adventicia. El endotelio y la capa media están separadas por una lámina elástica (elástica interna), y a su vez, la capa media y la adventicia están separadas por la lámina elástica externa (Rhodin, 1978) (Figura 4).

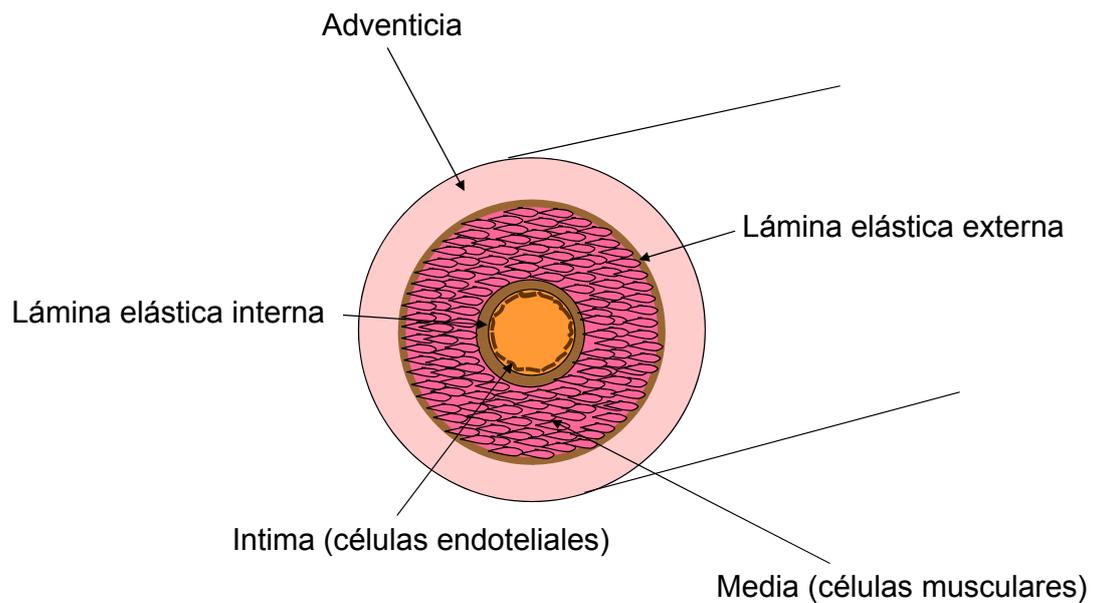


Figura 4: Representación esquemática de la estructura de la pared arterial y sus componentes.

Durante muchos años, se pensó que sólo era relevante la capa media de la pared vascular. Esta capa está formada principalmente por músculo liso, y funciona como el sistema efector donde se produce la contracción y la relajación vascular. Las investigaciones de Furchgott cambiaron, sin embargo, muchas de las ideas sobre la funcionalidad vascular vigentes hasta entonces. En 1980, Furchgott y Zawadki (Furchgott y Zawadki, 1980) demostraron que la relajación vascular inducida por acetilcolina era dependiente de la presencia de endotelio. Esta relajación se debía a la liberación de un factor lábil, que se denominó inicialmente factor relajante derivado de endotelio, y que se identificó posteriormente como NO (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1988). Estos hallazgos permitieron establecer que el endotelio no era una simple barrera física entre la sangre y la musculatura lisa vascular. Se llegó a la conclusión de que el tono vascular estaba regulado por factores vasodilatadores y vasoconstrictores, liberados mayoritariamente por el endotelio vascular. En realidad, hoy día, se sabe que el endotelio actúa como una extensa glándula endocrina y paracrina.

El endotelio es un tejido activo y dinámico distribuido en todo el organismo. Este tejido está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis vascular en situaciones fisiológicas, y puede perder su funcionalidad en diversos estados patológicos. Las células endoteliales cumplen funciones de soporte en los vasos sanguíneos, y regulan el transporte de macromoléculas y sustancias entre el plasma y el intersticio. También producen moléculas o factores biológicamente activos que pueden liberarse como respuesta a estímulos mecánicos y a

determinadas condiciones metabólicas (Simón et al., 2001). Se han identificado distintos factores endoteliales vasoconstrictores. Entre ellos, figuran los aniones superóxido, endoperóxidos, tromboxano A<sub>2</sub> y la endotelina. Los principales factores endoteliales vasodilatadores que se conocen son la prostaciclina, el NO y un factor de naturaleza todavía desconocida denominado factor hiperpolarizante derivado de endotelio.

La disfunción endotelial puede definirse como un desbalance entre la síntesis, la liberación o el efecto, de los factores endoteliales vasoconstrictores y los factores endoteliales vasodilatadores. De forma simplificada, podríamos definirla también como la pérdida de la capacidad vasodilatadora del endotelio, producida por una disminución en la cantidad de NO (Pepine, 1998; Granger y Alexander, 2000). La disfunción endotelial se reconoce como un fenómeno de aparición temprana en diversas enfermedades y patologías cardiovasculares, tales como hipercolesterolemia, hipertensión y diabetes mellitus.

La funcionalidad del endotelio puede estudiarse con preparaciones de arterias aisladas. Se induce en ellas la relajación con agentes que liberan en el endotelio factores vasodilatadores. Lo más usual, es utilizar anillos de alguna arteria, que se montan en baños de órganos tradicionales, en condiciones fisiológicas de temperatura y pH. Para montarlos, se introducen dos alambres de acero a través del lumen del anillo; uno de estos alambres se fija a la pared del

baño, y el otro se acopla a un transductor de fuerza isométrica que a su vez está acoplado a un amplificador. Este amplificador envía la señal a un ordenador, y mediante un programa informático, se pueden registrar los cambios de tensión o de actividad mecánica del tejido; es decir, se puede registrar la contracción o relajación del anillo arterial (Figura 5).

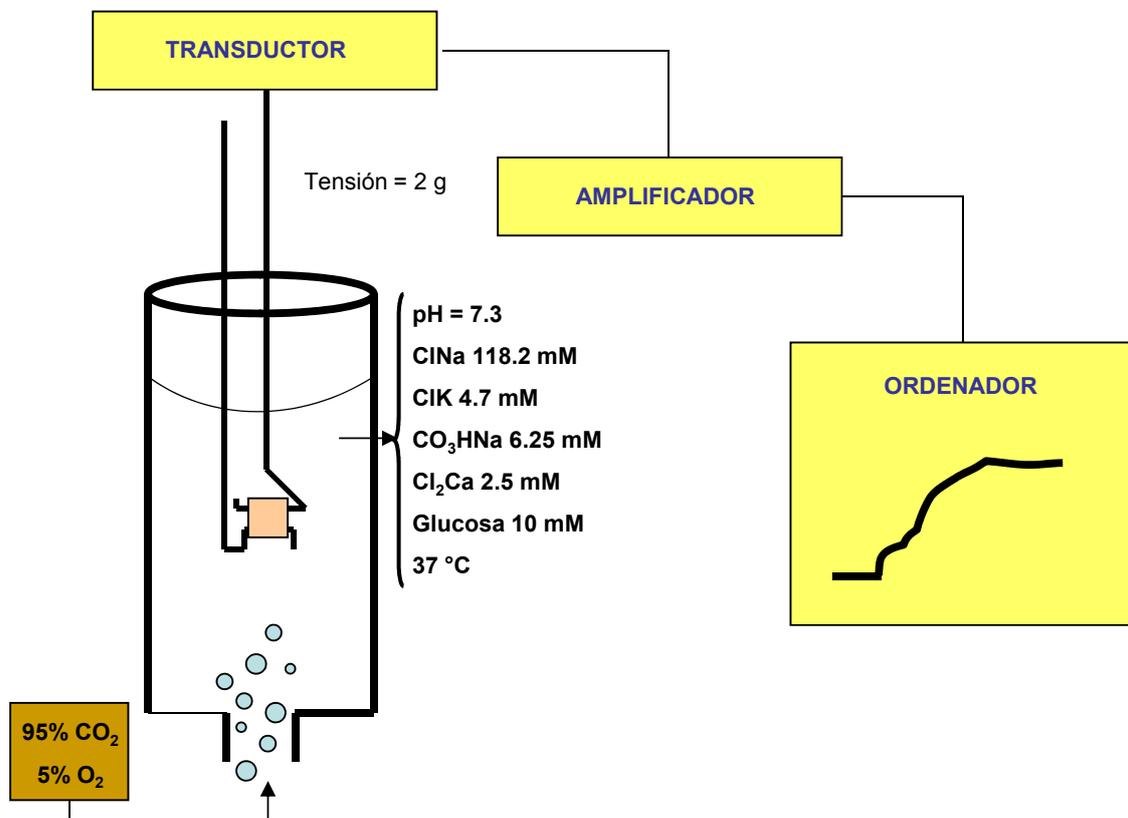


Figura 5: Baño de órganos utilizado para los estudios de reactividad vascular.

El efecto antihipertensivo de algunos péptidos derivados de proteínas alimentarias, es superior al efecto previsto por la potencia que dichos péptidos presentan *in vitro* para inhibir la ECA. El efecto antihipertensivo de estos péptidos puede justificarse en ocasiones por su efecto relajante directo del músculo liso vascular. Los péptidos derivados de proteínas alimentarias producen además en otras ocasiones un efecto vasodilatador endotelio dependiente.

Merece la pena citar el caso del péptido Leu-Lys-Pro-Asn-Met (LKPNM), obtenido por digestión con termolisina de “Katsuo-bushi”, una comida tradicional japonesa elaborada a partir de bonito desecado. Este péptido presenta un efecto antihipertensivo mayor al previsto por su capacidad para inhibir la ECA *in vitro*. En este contexto también podemos citar el caso del péptido Leu-Lys-Pro (LKP), que se produce cuando la ECA hidroliza la secuencia LKPNM. Los valores de  $IC_{50}$  de estos péptidos, y sus efectos antihipertensivos en ratas hipertensas, se compararon con los de captopril (Fujita y Yoshikawa, 1999). El captopril tuvo un valor de  $IC_{50} = 0.022 \mu M$ , y su dosis eficaz mínima fueron 1.25 mg/kg. El péptido LKPNM, con un valor de  $IC_{50} = 2.4 \mu M$ , bastante más alto que el de captopril, se consideró un inhibidor de la ECA semejante a los profármacos que inhiben la enzima. Su dosis eficaz mínima fueron 8 mg/kg, y su efecto máximo, al igual que el de captopril, se observó 4 horas después de su administración oral. El péptido LKP, con un valor de  $IC_{50} = 0.32 \mu M$ , también mayor que el de captopril, mostró su efecto máximo 2 horas después de su administración oral, y presentó una dosis

eficaz mínima de 2.25 mg/kg. En base a todas las determinaciones realizadas, pudo establecerse que ambos péptidos, LKPNM y LKP, mostraban efectos antihipertensivos claramente superiores a los esperados por su potencia inhibidora de la ECA *in vitro*. Este hecho se relacionó inicialmente con la afinidad tisular de estos péptidos y con su lenta eliminación. Se sugirió posteriormente que otros mecanismos adicionales, distintos de la inhibición de la ECA, podrían colaborar al efecto antihipertensivo de estos, y de otros, péptidos de origen alimentario.

Hoy día se sabe en realidad, que algunos de los péptidos derivados de proteínas alimentarias, entre ellos los derivados del bonito desecado, presentan efectos directos en el músculo liso vascular (Kuono et al., 2005). En otros muchos casos, el efecto antihipertensivo que se observa al administrar los péptidos de origen alimentario, puede justificarse porque estos compuestos son capaces de modular la liberación desde el endotelio de factores que relajan, o contraen, el músculo liso vascular. Los péptidos producen, por ello, un efecto vascular endotelio dependiente. En un hidrolizado de bonito se encontraron, por ejemplo, péptidos inhibidores de la enzima convertidora de endotelina (Okitsu et al., 1995). Esta enzima es necesaria para la síntesis de endotelina, un potente vasoconstrictor endotelial (Yanagisawa et al., 1988). Asimismo, la lactokinina, un péptido que corresponde a la secuencia Ala-Leu-Met-Pro-His-Ile-Arg (ALMPHIR), inhibe la liberación de endotelina en el endotelio (Maes et al., 2004). Para interpretar el efecto de la lactokinina, hay que tener en cuenta que cuando este péptido se administra por vía oral, las proteinasas pueden degradarlo, y que al

actuar estas enzimas se generan también productos con actividad inhibidora de la ECA (Murakami et al., 2004; Walsh et al., 2004). Lo más usual es, sin embargo, que los péptidos que no pueden justificar su efecto antihipertensivo por su potencia inhibidora de la ECA, faciliten la liberación endotelial de factores que relajan el músculo liso vascular, tales como prostaciclina o NO, y lo pueden hacer activando distintos receptores endoteliales. Se sabe, por ejemplo, que el efecto vasodilatador de la ovokinina, un péptido antihipertensivo derivado de proteínas de huevo que describiremos con más detalle en otro apartado de este capítulo, puede estar relacionado con la activación de receptores B<sub>1</sub> endoteliales que estimulan la liberación de prostaciclina en este tejido (Fujita et al., 1995a). Asimismo, un derivado de la ovokinina, la ovokinina (2-7), presenta efectos relajantes vasculares y antihipertensivos, y estos efectos se han relacionado con la activación de receptores B<sub>2</sub> en el endotelio y con la liberación de NO en este tejido (Matoba et al., 1999, 2001; Scruggs et al., 2004). También se sabe que la  $\alpha$ -lactorfina, fragmento f(50-53) de la  $\alpha$ -Lactoglobulina, que corresponde a la secuencia Tyr-Gly-Leu-Phe (YGLF), produce relajación endotelio dependiente en las arterias mesentéricas de ratas hipertensas. Esta relajación se inhibe con un inhibidor de la sintasa de NO, y cabe por ello pensar que el efecto antihipertensivo de este péptido pueda relacionarse con la liberación endotelial de NO (Sipola et al., 2002). La naloxona antagoniza el efecto de la  $\alpha$ -lactorfina cuando este péptido se administra por vía subcutánea, pero las dosis antihipertensivas de  $\alpha$ -lactorfina no ocasionan antinocicepción ni sedación, y tampoco ocasionan otros efectos mediados por receptores opioides del sistema nervioso central (Ijäs et al., 2004). Es desde luego improbable que los péptidos antihipertensivos derivados de

proteínas alimentarias, puedan ejercer efectos sobre la presión arterial por acción central. Se ha señalado que el efecto antihipertensivo de la  $\alpha$ -lactorfina, y la liberación de NO provocada por este péptido, podrían estar mediados por el estímulo de receptores opioides periféricos (Nurmeinin et al., 2000; Sipola et al., 2002). En distintos tejidos periféricos como el endotelio vascular (Saeed et al., 2000), algunos nervios simpáticos (Hughes et al., 1977) y las glándulas adrenales (Viveros et al., 1979), existen, de hecho, receptores opioides relacionados con la regulación de la presión arterial. Algunos péptidos opioides endógenos podrían modular esta variable actuando en dichos receptores (Sirén y Feuerstein, 1992).

Merece la pena comentar un poco más la posibilidad de que los péptidos de origen alimentario activen receptores opioides. Se ha discutido ampliamente la relación entre esta activación y la regulación de la presión arterial. Desde hace tiempo se sabe concretamente, que los péptidos lácteos pueden comportarse como agonistas de estos receptores, y se sabe también que pueden ejercer un control de la presión arterial. El estudio de la actividad opioide en un hidrolizado de proteínas lácteas, dio incluso lugar al nacimiento del término "exorfina". Este término se aplicaría a un péptido opiáceo de origen dietético, en contraposición al término "endorfina", utilizado para péptidos opioides endógenos (Fazel, 1998). Se han estudiado las características estructurales que determinan que los péptidos alimentarios activen los receptores opioides. Excepto en el caso de los péptidos derivados de la  $\alpha$ -caseína, podemos decir que la característica estructural común entre los agonistas opioides peptídicos exógenos y endógenos, es la presencia de

Tyr en el extremo amino-terminal. La carga negativa localizada en el grupo fenólico de la Tyr parece esencial para la actividad opioide. La eliminación de este aminoácido provoca la pérdida de la actividad del péptido (Chang et al., 1981). La presencia de otro aminoácido aromático, Phe o Tyr, en la tercera o cuarta posición del extremo amínico, favorece también la fijación del péptido al receptor opioide (Meisel, 1998). Asimismo, la presencia de Pro en la segunda posición es crucial para la actividad biológica, ya que este aminoácido mantiene la orientación de las cadenas de Tyr y Phe (Mierke et al., 1990). Se han descrito también péptidos de origen alimentario que se comportan como antagonistas de los receptores opioides. Estos péptidos suprimen la actividad agonista de las encefalinas, y producen el mismo efecto que la naloxona (Fiat et al., 1993). En este grupo de péptidos antagonistas de los receptores opioides se incluyen las caseínas procedentes de la  $\kappa$ -caseína y de la  $\alpha_1$ -caseína de la leche (Chiba et al., 1989; Yoshikawa y Chiba, 1990). Se incluyen también algunos ligandos de los receptores  $\mu$  con baja actividad antagonista y las lactoferroxinas. Estas últimas son péptidos derivados de la lactoferrina, que actúan como ligandos de los receptores  $\mu$  con moderada actividad antagonista (Yoshikawa et al., 1988).

## *Efectos antioxidantes*

El estrés oxidativo se define como un estado en el cual existe un desequilibrio entre las especies con alto poder oxidante y los sistemas de defensa antioxidantes (Halliwell, 1996). El metabolismo normal en el hombre lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno, que se generan en la mitocondria como parte del metabolismo celular. Entre ellas, el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) y el radical peróxido ( $\text{ROO}^\cdot$ ). Otros metabolitos reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), no son propiamente radicales, pero todas estas especies oxidantes pueden ser el origen del daño celular. Se producen específicamente por fagocitos y otras células como respuesta frente a agentes externos. Reaccionan químicamente con los componentes de las células, modificando o suprimiendo su función biológica. Así, por ejemplo, el daño oxidativo en el ácido desoxirribonucleico juega un papel crucial en la iniciación, promoción y propagación de ciertos tipos de cáncer. La peroxidación lipídica contribuye asimismo significativamente al desarrollo de la arteriosclerosis, y el daño oxidativo en las proteínas se asocia a afecciones crónicas ligadas al envejecimiento, tales como enfermedades inflamatorias, cataratas, etc. (Ames et al., 1993). Algunos estudios sugieren que las dietas ricas en componentes antioxidantes pueden disminuir la incidencia de estos problemas de salud. La relación entre actividad antioxidante y actividad antihipertensiva de muchos compuestos parece hoy día evidente. La deficiencia en antioxidantes se sabe que está claramente implicada en el desarrollo de hipertensión. Estudios clínicos han

demostrado que los pacientes hipertensos presentan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Mehta et al., 1994; Lacy et al., 1998) y una disminución en la actividad antioxidante (Sagar et al., 1992).

El sistema renina angiotensina se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo. Uno de los principales efectos deletéreos de la angiotensina II es el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno, pues este compuesto activa una potente oxidasa de membrana (NADH/NADPH), y produce anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Rajagopalan et al., 1996; Laursen et al., 1997; Dzau, 2001). La reacción química entre las especies reactivas de oxígeno y el NO producido en el lecho vascular, da lugar a la formación de peroxinitritos ( $\text{OONO}\cdot$ ) con potente actividad oxidante. Estos compuestos pueden oxidar el ácido araquidónico, y pueden liberar por este mecanismo un potente agente vasoconstrictor, el isoprostano (Figura 6).

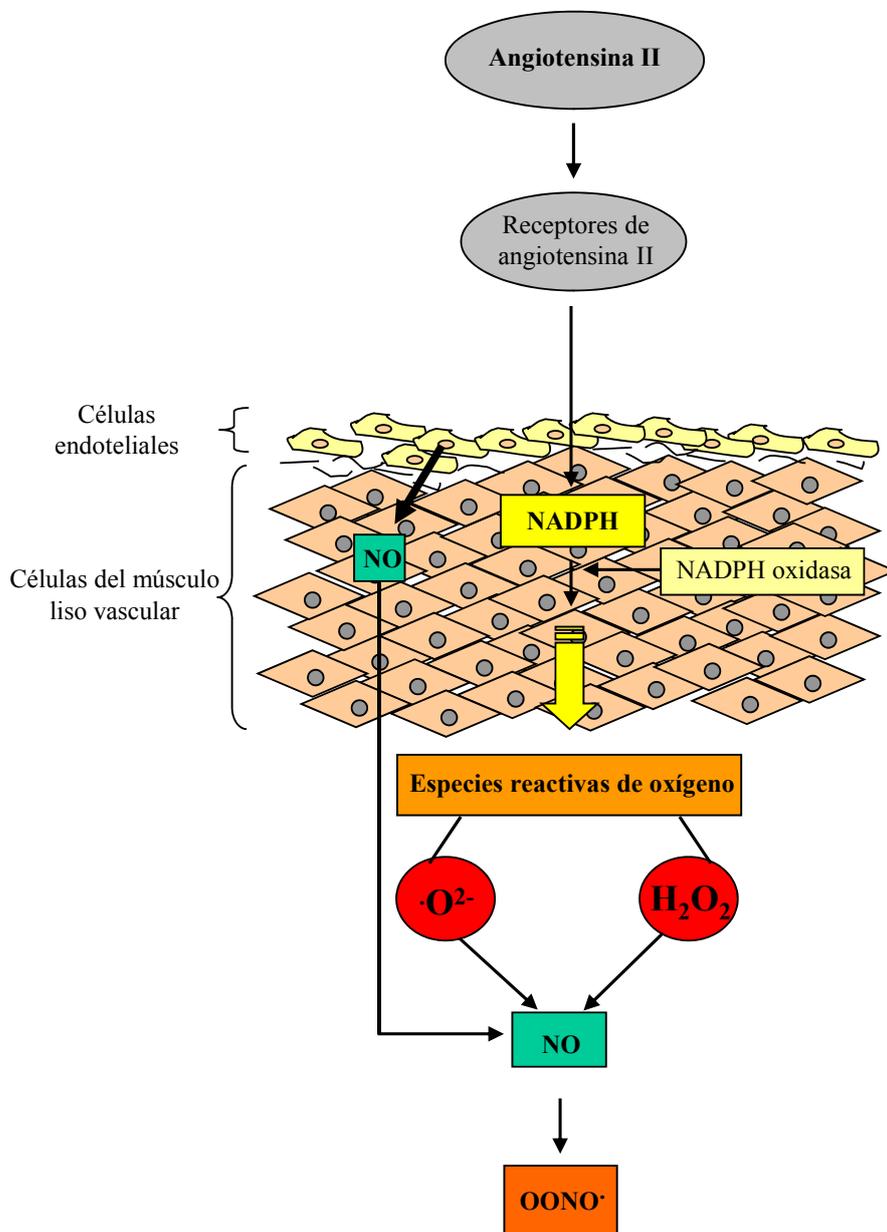


Figura 6: Efectos de la angiotensina II en el lecho vascular.

La angiotensina II también puede estimular la síntesis de endotelina, y este péptido puede aumentar además por el estrés oxidativo (Fukunaga et al., 1995). Por lo tanto, la angiotensina II induciría una reducción de NO, un incremento de isoprostanos y un incremento de endotelina. Todo ello puede explicar como se mantiene la hipertensión en situaciones patológicas que cursan con aumento de angiotensina II.

Los inhibidores de la ECA inhiben la formación de angiotensina II e incrementan los niveles de bradiquinina. Estos fármacos mejoran por tanto el estrés oxidativo. Al iniciar el tratamiento con inhibidores de la ECA se observa que mejora la hipertensión, y que disminuyen los niveles de anión superóxido. El captopril, prototipo de fármaco inhibidor de la ECA, posee propiedades antioxidantes (Gurer et al., 1999; Baykal et al., 2003). Distintos compuestos que presentan actividad antioxidante poseen asimismo capacidad para inhibir *in vitro* la ECA. Estos compuestos podrían reducir la presión arterial mediante una combinación de sus acciones vasodilatadoras y antioxidantes (Baykal et al., 2003).

Existen pocos estudios sobre la actividad antioxidante de los compuestos de naturaleza proteica, pero se ha comprobado que la actividad antioxidante de las proteínas aumenta tras su hidrólisis con diferentes enzimas (Yee y Shipe, 1981), o al menos se mantiene (Rival et al., 2001a). Varios péptidos derivados de caseínas (Suetsuna et al., 2000; Rival et al., 2001b), y algunos péptidos

procedentes de otras fuentes (Srinivas et al., 1992; Kudoh et al., 2003; Sun et al., 2004) tienen propiedades antioxidantes. La actividad antioxidante que se obtiene para estos péptidos varía en función del método que se utiliza para determinarla, lo que dificulta poder establecer una relación estructura-actividad. Nuestro grupo ha valorado la actividad antioxidante de un hidrolizado de ovoalbúmina con pepsina. Valoramos también la actividad antioxidante de los péptidos que se aislaron en dicho hidrolizado, y también la de algunos de sus aminoácidos. Obtuvimos concretamente el valor ORAC-FL (“oxygen radical absorbance capacity-fluoresceine”) de estos productos. Este parámetro permite medir la actividad neutralizadora de radicales (Dávalos et al., 2004a). Para el ensayo de valoración, se emplean radicales peróxido, los más abundantes en los sistemas biológicos. Los péptidos Tyr-Ala-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu (YAEERYPIL) y Ser-Ala-Leu-Ala-Met (SALAM) mostraron actividad antioxidante alta, y los péptidos Tyr-Gln-Ile-Gly-Leu (YQIGL) y Tyr-Arg-Gly-Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe (YRGGLEPINF) mostraron actividad antioxidante intermedia. Los restantes péptidos mostraron una actividad antioxidante escasa o nula. El valor ORAC-FL del péptido YAEERYPIL fue casi 6 veces más elevado que el del  $\alpha$ -tocoferol, pero fue aproximadamente 2 veces más bajo que el del ácido cafeico, y fue 3 veces más bajo que el del flavonoide quercetina (Appel et al., 1997; Dávalos et al., 2004b). Cabe resaltar que también se comprobó que el péptido YAEERYPIL era un inhibidor muy potente de la ECA, que tenía un valor de  $IC_{50} = 4.7 \mu M$ . De todos los aminoácidos estudiados, la Tyr mostró el valor ORAC-FL más alto. La actividad antioxidante de los péptidos YAEERYPIL, YQIGL e YRGGLEPINF podría deberse a la presencia de este aminoácido, que ocupa la posición amino-terminal en ellos.

Algunas hormonas peptídicas pierden de hecho su actividad antioxidante cuando se les retira el residuo Tyr (Moossman y Belh, 2002). Al igual que los compuestos fenólicos, el aminoácido Tyr puede transferir el átomo de hidrógeno de su grupo hidroxilo, rompiendo así la cadena de transferencia de electrones. Es probable que el radical oxígeno atrape el átomo de hidrógeno de la Tyr, lo que conllevaría la formación de un radical más estable. La actividad neutralizadora de radicales de los hidrolizados de proteínas de carne se atribuye a la presencia en ellos de Tyr, His y Met (Saiga et al., 2003). La Met podría ser el principal responsable de la actividad secuestradora de radicales libres del péptido SALAM. La actividad antioxidante de este aminoácido se explica porque su grupo sulfhidrilo resulta fácilmente oxidable a sulfóxido (Stadman et al., 1993; Vogt, 1995). Para la actividad antioxidante, no sólo es importante la presencia de determinados aminoácidos en un péptido; la disposición de esos aminoácidos en la cadena peptídica puede ser también decisiva (Tsuge et al., 1991). Chen et al., en 1996, confirmaron esta idea estudiando la actividad antioxidante de 28 péptidos derivados del péptido Leu-Leu-Pro-His-His (LLPHH). Este péptido se había aislado de una proteína de soja digerida con diferentes enzimas, y se comprobó que la actividad antioxidante del péptido Pro-His-His (PHH) era mucho mayor que la del péptido His-Pro-His (HPH), o la del péptido His-His-Pro (HHP) (Chen et al., 1996).

La oxidación de los lípidos favorece el desarrollo de arteriosclerosis, una patología que acompaña y favorece en muchos casos el estado hipertensivo. Más concretamente, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)

contribuye claramente al desarrollo de las placas de ateroma. Por estos motivos, también se han establecido métodos de laboratorio que detectan y cuantifican el efecto de los péptidos sobre la oxidación lipídica. Estos métodos permiten prever si los péptidos de origen alimentario van a poder paliar la oxidación de las LDL *in vivo*. En el laboratorio puede, por ejemplo, determinarse la capacidad de los péptidos para inhibir la oxidación de las LDL inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ . El péptido YAEERYPIL, que tiene una potente actividad inhibidora de la ECA, y que también exhibe una elevada actividad neutralizadora de radicales libres (3.8 veces superior a la del Trolox, un análogo de la vitamina E), retrasa además la oxidación de las LDL inducida por  $\text{Cu}^{2+}$  (Dávalos et al., 2004b).

Cabe finalmente señalar en este apartado, que algunos ensayos han demostrado que las caseínas de la leche son capaces de quelar el hierro *in vitro*, e inhibir la peroxidación lipídica (Cervato et al., 1999). Algunos estudios recientes han descrito la actividad antioxidante de la leche humana (VanderJagt et al., 2001) y de las proteínas del suero (Tong et al., 2000), pero son, en realidad, necesarios más estudios que corroboren la acción antioxidante de las proteínas lácteas en animales de experimentación y en humanos.

### **3. Estrategias para la obtención de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias**

Para obtener péptidos antihipertensivos a partir de las proteínas alimentarias, es usual provocar la hidrólisis de estas proteínas exponiéndolas a distintas enzimas. La hidrólisis proteica enzimática tiene varias ventajas. Entre ellas, la rapidez del proceso, la alta especificidad, el coste moderado, y la posibilidad de obtener productos de alta calidad que pueden comercializarse a gran escala (Clemente et al., 2000).

Se asume que en la mayoría de los casos los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias serán inhibidores de la ECA. La hidrólisis enzimática de la proteína de origen proporciona un hidrolizado que debe por eso caracterizarse como inhibidor de esta enzima. Este hidrolizado debe además caracterizarse por su posible efecto antihipertensivo, pues como comentaremos en breve, los compuestos que muestran actividad inhibidora de la ECA *in vitro* no siempre presentan efectos sobre la presión arterial cuando se administran. Este hidrolizado se somete después a una ultrafiltración a través de membranas, y esto permite obtener una fracción (o “permeado”) del hidrolizado, que usualmente tiene un valor inferior de  $IC_{50}$  que el propio hidrolizado (Visser et al., 1989; Turgeon y Gauthier, 1990; Vreeman et al., 1994; D’Alvise et al., 2000). Esto se puede explicar fácilmente, ya que esta fracción está enriquecida en péptidos pequeños,

que son los que presentan una potencia inhibidora de la ECA mayor (Mullally et al., 1997a; Fujita et al., 2001; Miguel et al., 2004). La mayoría de los péptidos que inhiben la ECA corresponden, en realidad, a secuencias cortas que tiene entre 3 y 7 aminoácidos (Pihlanto-Leppälä et al., 1998). El “permeado”, rico en secuencias peptídicas que inhiben la ECA, se fracciona mediante distintas técnicas cromatográficas en subfracciones, y se determina de nuevo la actividad inhibidora de la ECA de estas subfracciones. Las subfracciones peptídicas ricas en aminoácidos con carácter hidrofóbico eluyen usualmente al final de la columna, y son estas subfracciones las que con frecuencia presentan valores de  $IC_{50}$  más bajos. Esto no es extraño, ya que el carácter hidrofóbico de los aminoácidos del extremo carboxi-terminal es determinante para la unión de los péptidos al centro activo de la ECA (Cheung et al., 1980). El paso siguiente es el análisis de las subfracciones que presentan bajos valores de  $IC_{50}$ . Distintas técnicas, entre las que figuran la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS) y la espectrometría de masas en tandem (ESI-MS/MS), permiten conocer la masa molecular aproximada de los péptidos presentes en esas subfracciones. La identificación final de los péptidos se consigue contrastando distintas secuencias que corresponden a esa masa molecular en una base de datos de proteínas. Se deberá establecer luego la potencia inhibidora de la ECA de los péptidos identificados, y se deberá estudiar asimismo el efecto *in vivo* de aquellos que presenten bajos valores de  $IC_{50}$ . El objetivo es, por lo tanto, obtener concentrados peptídicos con actividad inhibidora de la ECA y actividad antihipertensiva, en los que cada vez hay un menor número de péptidos. Se intenta esto hasta conseguir secuencias concretas que presenten

estas actividades. Así se identifican los péptidos responsables del efecto. Debe sin embargo tenerse en cuenta, que la purificación de los péptidos identificados y su obtención en cantidades adecuadas a partir del hidrolizado, es un proceso complejo y costoso. Por eso, para llevar a cabo estudios en los que se valora la actividad biológica de estos péptidos, es usual sintetizar químicamente las secuencias de interés.

Son deseables más estudios sobre los requerimientos estructurales de los péptidos derivados de proteínas alimentarias que interactúan con la ECA, pero hay siempre que tener en cuenta que la determinación de la actividad inhibidora de esta enzima es sólo un punto de partida en la selección de estos péptidos. Muchos de ellos presentan actividad inhibidora de la ECA *in vitro*, pero no muestran en realidad esta actividad *in vivo*, ni ejercen efectos antihipertensivos. Los siguientes razonamientos permiten comprender porque esto es así. Los péptidos y los hidrolizados de proteínas alimentarias que presentan actividad inhibidora de la ECA, encuentran mayor dificultad para alcanzar intactos sus puntos de acción en el organismo y para producir el efecto fisiológico, que los fármacos que se utilizan en clínica con esta finalidad. La vía de administración deseada para todos estos compuestos es la vía oral, y, por lo tanto, los péptidos deben ser resistentes a los procesos de digestión. Para producir el efecto, los péptidos deben además atravesar el epitelio intestinal, y deben distribuirse intactos hasta alcanzar los órganos diana. La hidrólisis de los péptidos por la pepsina del estómago y por algunas enzimas pancreáticas, tales como tripsina y quimotripsina, genera

usualmente péptidos menores que presentan una actividad inhibidora de la ECA distinta de la del péptido administrado. Puede suceder que la actividad inhibidora de la ECA de los productos de hidrólisis sea nula o menor que la del péptido administrado, pero puede también suceder que se administren péptidos con escasa actividad inhibidora de la ECA y que estos péptidos se hidrolizen y generen otros productos con más actividad inhibidora de la enzima. En este último caso podría observarse efecto antihipertensivo en contra de lo previsto. Así por ejemplo, el péptido Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu (YKVPQL), que figura entre las secuencias identificadas en un hidrolizado de caseínas, presentó una elevada actividad inhibidora de la ECA *in vitro* ( $IC_{50} = 22 \mu M$ ), pero no mostró efecto antihipertensivo. En el mismo hidrolizado se identificó otra secuencia peptídica, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln (KVLVPQ), que presentaba actividad antihipertensiva pese a su baja actividad inhibidora de la ECA *in vitro*. Se comprobó que tras la digestión pancreática de esta secuencia, se liberaba el extremo C-terminal y se formaba el péptido Lys-Val-Leu-Pro-Val (KVLVP). Este péptido mostraba una potente actividad inhibidora de la ECA *in vitro* ( $IC_{50} = 5 \mu M$ ), y era probablemente responsable de la actividad antihipertensiva observada con el péptido de mayor tamaño (Maeno et al., 1996). En realidad, son siempre necesarios los estudios que simulan la digestión gastrointestinal de los péptidos identificados en los hidrolizados proteicos, y estos estudios deben llevarse a cabo especialmente con las secuencias que muestran actividad inhibidora de la ECA. Actualmente existen diversos procedimientos que simulan *in vitro* las condiciones enzimáticas propias de la digestión en el cuerpo humano (Astwood et al., 1996; Alting et al., 1997; Zárate et al., 2000; Vermeirssen et al., 2003). Estos métodos

proporcionan una idea bastante aproximada de los péptidos que se generan *in vivo*, y que son resistentes a las enzimas digestivas. Nuestro grupo de investigación utiliza concretamente un método que permite saber con bastante precisión las secuencias que resisten estos procesos digestivos (Figura 7) (Miguel et al., 2006a). Si queremos llegar a saber cuáles son las secuencias concretas que son responsables del efecto antihipertensivo, será necesaria también la evaluación subsiguiente de la actividad inhibidora de la ECA de estos productos de hidrólisis.

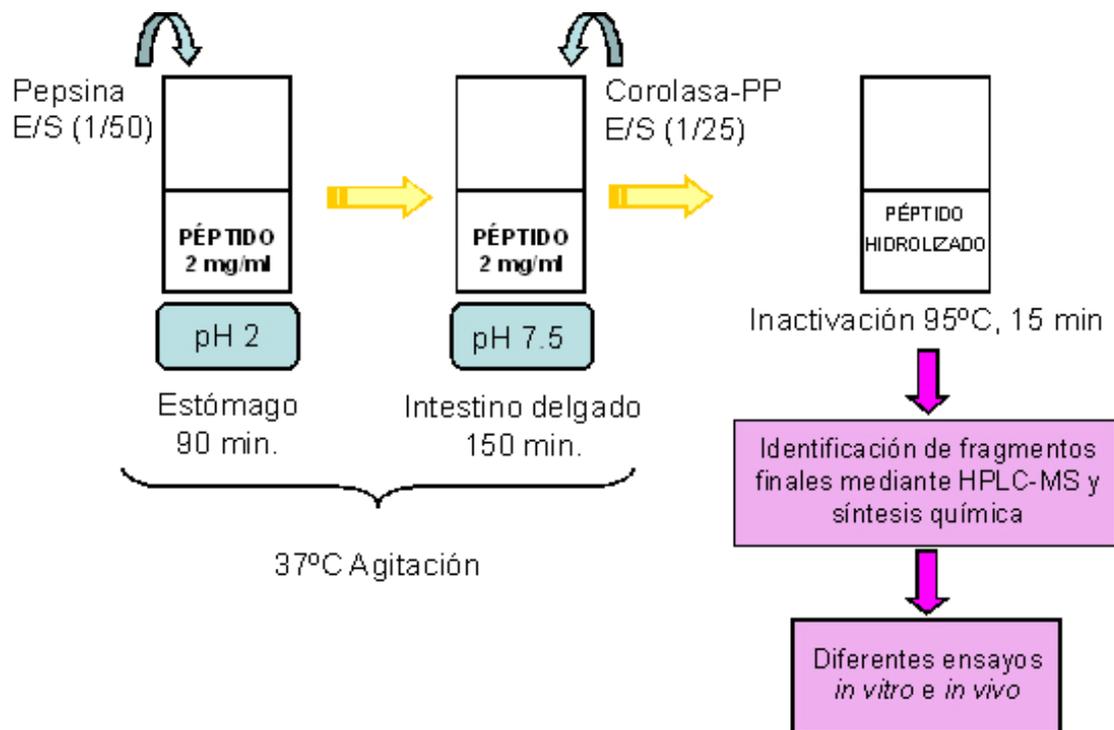


Figura 7: Proceso para simular la digestión gastrointestinal *in vitro*. Los péptidos sintéticos se someten a la acción de la pepsina y la corolasa-PP para simular el efecto que producirían las diferentes enzimas encargadas de la digestión gastrointestinal tras su administración oral. La corolasa-PP es un preparado enzimático comercial en polvo, que además de tripsina y quimotripsina contiene diferentes actividades carboxipeptidasas.

Los resultados de diferentes estudios indican que los péptidos precisan usualmente mecanismos de transporte y transportadores específicos para atravesar el epitelio intestinal. Los péptidos se transportan activamente a través de

la membrana apical de los enterocitos (Ganapathy y Leibach, 1985, Leibach y Ganapathy, 1986), pero en principio los sistemas de transporte sólo serían válidos para di y tripéptidos, pues los péptidos con más de cuatro aminoácidos serían difícilmente reconocidos (Daniel et al., 1992). Algunos trabajos han demostrado, sin embargo, que es posible la absorción de péptidos mayores (Gardner, 1994). Después de su ingesta, se han llegado a detectar en el plasma péptidos de gran tamaño, que en ocasiones tienen hasta 20 aminoácidos (Chabance et al., 1998). Estos péptidos es posible que se absorban vía transcitolítica y que utilicen otros sistemas de transporte de macromoléculas (Heyman y Desjeux, 1992). También se ha sugerido un transporte pasivo para estos péptidos, ya que podrían absorberse principalmente vía paracelular atravesando las uniones intercelulares (Burton et al., 1992; Conradi et al., 1992, 1993; Kim et al., 1993 Adson et al., 1994; Pappenheimer et al., 1994; Goodwin et al., 1999). La mayoría de los estudios que han determinado los mecanismos por los que los péptidos atraviesan el epitelio intestinal, son estudios *in vitro* que utilizan células Caco-2. Estas células son células epiteliales, originalmente aisladas de carcinoma de colon humano, que en cultivo forman monocapas, y que presentan características morfológicas y bioquímicas similares a las de los enterocitos diferenciados. Estas células expresan muchos de los sistemas de transporte para los péptidos (Hidalgo et al., 1989; Hilgers et al., 1990). Los resultados de los estudios en estas células, presentan una buena correlación con los resultados de los estudios de absorción *in vivo*. Por eso, la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) aceptó oficialmente este modelo celular para determinar la permeabilidad de un fármaco (FDA 1999). El modelo aparece en la guía para solicitar excepción de los

estudios de bioequivalencia (CDER/FDA 2000). Las células Caco-2 expresan además muchas enzimas intestinales, y permiten estudiar los procesos de hidrólisis de los péptidos por las peptidasas localizadas en las células del borde en cepillo del epitelio intestinal (Satake et al., 2002). Los péptidos pueden hidrolizarse cuando actúan estas peptidasas, y la velocidad de transporte intestinal de las secuencias largas fundamentalmente depende de su susceptibilidad a ellas (Shimizu et al., 1997; Vermeirssen et al., 2002b, 2004).

Los péptidos que se absorben oralmente pueden degradarse también cuando alcanzan la circulación sistémica, pues sobre ellos actúan las peptidasas plasmáticas. Las posibles modificaciones metabólicas de los péptidos que se administran por vía oral son, por lo tanto, múltiples. Por eso, hoy día se imponen los ensayos en animales de experimentación que comentaremos más adelante. En ellos, se evalúa el efecto antihipertensivo de los productos que se sabe que presentan actividad inhibidora de la ECA *in vitro*. Estos estudios intentan establecer las secuencias concretas que son capaces de inhibir la ECA *in vivo*, o que pueden controlar la presión arterial a través de algún otro mecanismo cuando se administran. Sin embargo, no debemos ignorar que toda esta estrategia es sólo una aproximación a lo que puede suceder cuando estos productos se utilicen en el hombre. Los procesos metabólicos y fisiológicos humanos difieren en muchos casos sustancialmente de los procesos metabólicos y fisiológicos en los animales, y hay que tener en cuenta además, que los mecanismos por los que disminuyen el tono arterial los productos ensayados, pueden tener una relevancia diferente en

las distintas especies. Por ello, es obvio que antes de utilizar de forma rutinaria los productos y péptidos derivados de proteínas alimentarias en personas prehipertensas o hipertensas, serán siempre necesarios los estudios que garanticen su seguridad y eficacia en estos pacientes.

Hemos señalado que dentro de la estrategia de actuación necesaria para obtener productos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias, son siempre ineludibles los ensayos que establecen su efecto en animales de experimentación. Para estos ensayos, se utilizan normalmente ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Este modelo animal se desarrolló a partir de las ratas Wistar que se criaban en la Universidad de Kyoto (Okamoto y Aoki, 1963). Constituye el modelo experimental de hipertensión más extendido en el momento actual. Distintos investigadores coinciden en señalar que los principios básicos asociados al desarrollo de hipertensión en estos animales, y en los humanos, son sorprendentemente muy similares (Trippodo y Frohlich, 1981; Zicha y Kunes, 1999). Las ratas Wistar Kyoto (WKY) se consideran hoy día el control normotenso de las ratas SHR. Estos animales se utilizan en los ensayos que se llevan a cabo con hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias, para establecer cómo actúan estos productos cuando el tono arterial no está alterado. En todos estos ensayos, la presión arterial de las ratas se mide usualmente mediante una modificación de la técnica del manguito en la cola ("tail cuff"), originalmente descrita por Buñag (Buñag, 1973; Buñag y Butterfield, 1982). La técnica original permitía obtener únicamente medidas de PAS. Algunos de los

estudios realizados con péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias, siguen aportando sólo información sobre la modificación de la PAS. Hay que señalar, no obstante, que hoy día existen algunos equipos que permiten diferenciar la PAS de la PAD de los animales, y con estos equipos se pueden obtener medidas fiables de estas dos variables. Es recomendable aportar datos sobre la modificación de ambas. Antes de colocar el manguito y el transductor, las ratas se exponen a una temperatura próxima a los 30° C para facilitar la dilatación de la arteria caudal. Los animales deben acostumbrarse al procedimiento, pues hay que tener en cuenta que las ratas SHR son especialmente nerviosas. Es recomendable, además, que se tomen al menos tres medidas consecutivas de la PAS y de la PAD, y que se utilice la media de estas medidas para establecer el valor definitivo de estas variables. La Figura 8 muestra como se lleva a cabo la medida de la presión arterial en una rata con la técnica del manguito en la cola.

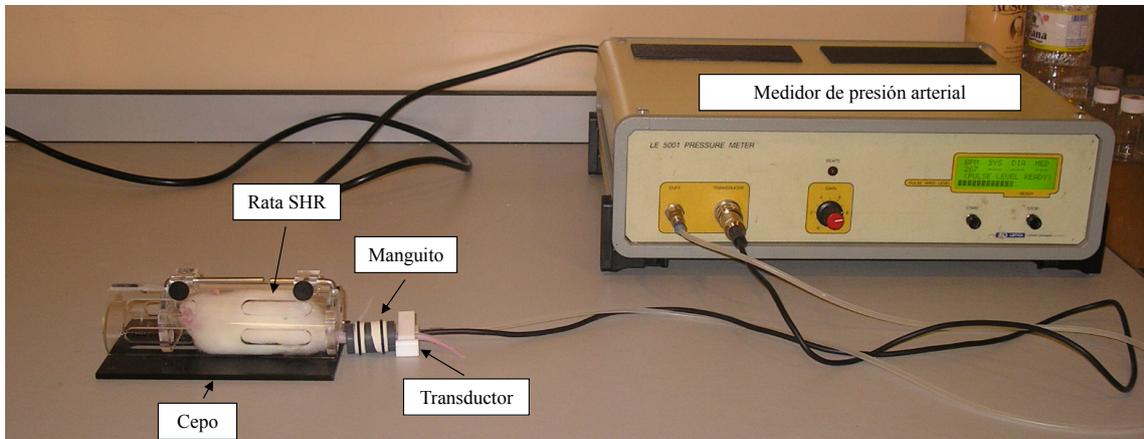


Figura 8: Medida de la presión arterial en una rata usando el método del manguito en la cola.

Lo más frecuente son los estudios en los que se evalúa el efecto agudo de un hidrolizado o péptido, después de administrar a las ratas una dosis única de este producto con una sonda intragástrica. Debe medirse la presión arterial de las ratas antes de esta administración, y se medirá después de ella en distintos momentos. Normalmente se llevan a cabo 4-5 medidas después de la administración, estableciendo intervalos de 1 hora y 30 minutos o de 2 horas entre estas medidas. Se vuelve a medir también la presión arterial 24 horas después de la administración. Para estos ensayos de administración aguda, se deben utilizar ratas que tengan valores de presión arterial estables. La fase de estabilización de

la presión arterial en las ratas SHR comienza cuando estos animales tienen 11-12 semanas de vida, pero la presión arterial no es totalmente estable hasta que los animales alcanzan las 20 semanas de vida. Se recomienda, por eso, utilizar ratas que tengan aproximadamente esa edad.

En los estudios experimentales de administración crónica de péptidos o hidrolizados de proteínas alimentarias, las medidas de la presión arterial en las ratas se realizarán siempre a la misma hora del día (usualmente por la mañana), y lo normal es facilitar medidas semanales de la PAS y de la PAD. En estos estudios, los productos se administran habitualmente con el agua de bebida, y el tratamiento muchas veces se inicia en el momento del destete. Se estudia así el desarrollo de hipertensión en los animales, y se estudia también así la incidencia que tienen los productos administrados en este desarrollo. El tratamiento se mantiene durante un período de tiempo suficientemente prolongado; normalmente hasta que las ratas tienen 20 semanas de vida. Después de este período, puede retirarse el tratamiento de los animales, y así se evalúa la posible reversión del efecto.

La Figura 9 muestra un esquema de los pasos necesarios para la obtención de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias.

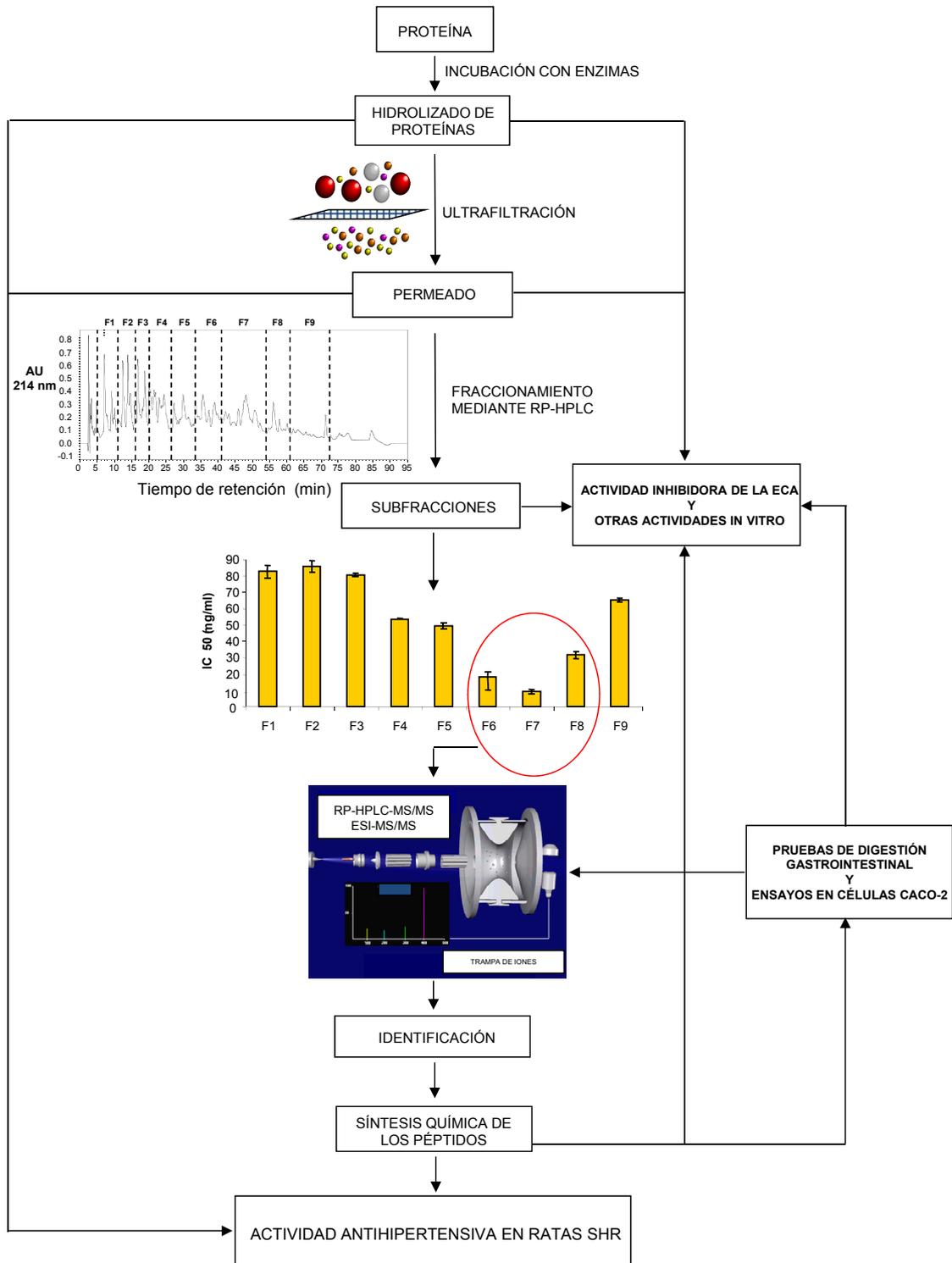


Figura 9: Diagrama de los pasos experimentales necesarios para obtener péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias.

#### **4. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas**

Las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos antihipertensivos son las proteínas lácteas. Los péptidos antihipertensivos de origen lácteo pueden obtenerse provocando la hidrólisis de las proteínas lácteas con diferentes enzimas. Pueden también obtenerse por fermentación de la leche con distintas bacterias. Estos métodos han proporcionado resultados excelentes para la obtención de productos antihipertensivos. También pueden producirse péptidos antihipertensivos como consecuencia del proceso proteolítico que tiene lugar durante la maduración del queso.

Desde hace tiempo se sabe que las caseínas bovinas (Maruyama y Suzuki, 1982; Maruyama et al., 1987a, b) y humanas (Kohmura et al., 1989) se comportan como inhibidoras de la ECA. A finales del siglo XX ya se intentó comercializar algún producto derivado de proteínas de leche con efecto antihipertensivo. El estudio de Sekiya et al., en 1992, facilitó la comercialización de un hidrolizado de caseína, que se obtenía por tratamiento de esta proteína con tripsina. El consumo durante 4 semanas de 20 g/día de este hidrolizado, producía una disminución de la PAS y de la PAD en pacientes hipertensos (Sekiya et al., 1992). El producto se comercializó en Japón con el nombre de "Casein DP" (Sugai, 1998). Posteriormente, se comercializó en Holanda otro hidrolizado de caseína, obtenido también por tratamiento de esta proteína con tripsina, que disminuía la presión

arterial en animales y en pacientes hipertensos (Karaki et al., 1990; Townsend et al., 2004; Cadee et al., 2007). Este nuevo hidrolizado se comercializó con el nombre de “C12 Peptide”.

A finales del siglo XX y comienzos del siglo actual, se comenzaron a estudiar también las proteínas del suero lácteo como fuente de péptidos antihipertensivos con actividad inhibidora de la ECA (Mullally et al., 1997a, b; Pihlanto-Leppälä et al., 2000). En este contexto, destacan los estudios de Pins y Keenan (Pins y Keenan, 2002, 2003, 2006). Estos investigadores han demostrado que el consumo de 20 g/día de un hidrolizado de proteínas de suero lácteo, durante 6 semanas, reduce significativamente la PAS y la PAD en pacientes prehipertensos que no reciben medicación. Cinco semanas después de finalizar la ingesta del hidrolizado, pudo apreciarse todavía su efecto. Los pacientes del estudio presentaban hipercolesterolemia, y el hidrolizado disminuyó además los niveles de LDL colesterol. Este producto se comercializa actualmente en Estados Unidos de América con el nombre de “Biozate”. También se ha evaluado el efecto de una leche fermentada con *Lactobacillus casei* TMC0409 y *Streptococcus thermophilus* TMC 1543, suplementada además con proteínas de suero. Se ha demostrado que tras la administración de este producto, se produce una disminución en los niveles de colesterol total en animales de experimentación y en humanos (Kawase et al., 2000).

Se han aislado y caracterizado también varios péptidos con actividad inhibidora de la ECA y con actividad antihipertensiva, a partir de algunos hidrolizados que se obtienen al tratar la  $\alpha$ -Lactoglobulina y la  $\beta$ -Lactoglobulina con enzimas digestivas (Mullaly et al., 1996; Pihlanto-Leppälä et al., 2000; Nurmeinin et al., 2000; Chobert et al., 2005). Recientemente se han identificado dos péptidos con potente actividad inhibidora de la ECA derivados de la  $\beta$ -Lactoglobulina de la leche de cabra (Hernández-Ledesma et al., 2002). Estos péptidos, que corresponden a las secuencias Leu-Gln-Lys-Trp (LQKW) y Leu-Leu-Phe (LLF), se liberan tras la incubación de suero lácteo con termolisina, a 37°C, durante 24 horas. Ambas secuencias mostraron efectos antihipertensivos en ratas SHR, cuando se administraron en dosis única, por vía oral (Hernández-Ledesma et al., 2007).

Ha sido muy importante también la producción de péptidos antihipertensivos por fermentación láctea. La fermentación natural o controlada se ha explotado desde hace miles de años para preservar distintos alimentos. La fermentación se ha utilizado, en realidad, para mantener o alterar las propiedades nutritivas y/o sensoriales de los alimentos. Los lactobacilos y las bifidobacterias son los microorganismos probióticos más empleados en la elaboración de distintos productos lácteos fermentados, tales como el yogur y el queso. Estas bacterias poseen muchas enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar las proteínas lácteas. Liberan así péptidos y aminoácidos, que les sirven como fuente de nitrógeno esencial para su crecimiento. Estos péptidos liberados durante el proceso de

fermentación, pueden ejercer distintas actividades biológicas que probablemente contribuyen a las propiedades beneficiosas de los productos lácteos fermentados y de las propias bacterias lácticas (Sanders, 1993; Lee y Salminen, 1995). Algunos de estos péptidos pueden comportarse como inhibidores de la ECA, y algunos de estos productos fermentados podrían por ello emplearse en la prevención y/o tratamiento de la hipertensión. Las cepas de *Lactobacillus helveticus* poseen mayor actividad proteolítica sobre las proteínas lácteas que otras cepas de bacterias lácticas, y el contenido peptídico cuando la leche se fermenta con esta bacteria es mayor (Yamamoto et al., 1994). Se han obtenido, en realidad, bastantes productos ricos en péptidos antihipertensivos fermentando la leche con esta bacteria. También se han aislado péptidos inhibidores de la ECA fermentando la leche con otras bacterias lácticas, tales como *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (*Lactobacillus* GC) (Rokka et al., 1997), o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Gobbetti et al., 2000). Se están utilizando también actualmente algunas cepas de levaduras, que son capaces de hidrolizar las proteínas lácteas, en los procesos de aislamiento y caracterización de péptidos inhibidores de la ECA y en los procesos de producción de productos antihipertensivos. La combinación de *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* ha proporcionado buenos resultados. Como ejemplo, podemos citar un producto lácteo comercializado en Japón por Calpis (Calpis Co. Ltd., Japan), que se prepara por fermentación de leche desnatada con *Lactobacillus helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Nakamura et al., en 1995, comprobaron que la administración oral aguda de la leche Calpis, tenía efecto antihipertensivo en ratas SHR (Nakamura et al., 1995b). El grupo japonés

demonstró que los péptidos Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP), eran los principales responsables de la actividad antihipertensiva de esta leche (Nakamura et al., 1995a, b; Nakamura et al., 1996; Masuda et al., 1996). Estos péptidos también ejercieron efecto antihipertensivo en humanos (Hata et al., 1996; Mizushima et al., 2004; Aihara et al., 2005; Mizuno et al., 2005). Un estudio doble ciego, realizado por el mismo grupo, demostró poco después que la ingesta de 95 ml/día de leche Calpis, durante 8 semanas, reducía significativamente la PAS y la PAD de pacientes hipertensos que mantenían su medicación (Hata et al., 1996). Recientemente se ha demostrado también el efecto de esta leche en sujetos hipertensos que no reciben medicación antihipertensiva. En el ensayo, los pacientes ingerían 160 g/día de leche durante 4 semanas (Mizushima et al., 2004). El producto, denominado comercialmente “Ameal Peptide”® por Calpis, se ha añadido a una nueva bebida láctea lanzada por Unilever, que se ha comercializado en España con el nombre de “Flora Proactive”®.

Sabemos que la inhibición de la ECA justifica en la mayoría de los casos el efecto de los productos funcionales con actividad antihipertensiva. Las secuencias VPP e IPP, responsables del efecto antihipertensivo de la leche Calpis, se caracterizaron como potentes inhibidoras de la ECA. No es extraño que estas secuencias inhiban la enzima. Ambas tienen el aminoácido Pro en posición carboxi-terminal, y tienen respectivamente en el extremo amino-terminal los aminoácidos Val e Ile, que también favorecen la inhibición enzimática. Estas secuencias aparecen en varios productos lácteos antihipertensivos, además de

aparecer en la leche Calpis, y son responsables de su efecto. En algunos otros casos, estos tripéptidos se liberan *in vivo* cuando se administran productos lácteos antihipertensivos con secuencias más largas. Los estudios de Sipola et al. pusieron también de manifiesto el efecto antihipertensivo de los péptidos VPP e IPP en ratas SHR (Sipola et al., 2001), y demostraron el efecto antihipertensivo de una leche fermentada con *Lactobacillus helveticus* LBK-16H que contenía ambos tripéptidos (Sipola et al., 2002). La ingesta de 150 ml/día de esta leche, durante varias semanas, ocasionó una moderada, pero incuestionable, disminución de la presión arterial en pacientes hipertensos que no recibían medicación (Seppo et al., 2002, 2003; Tuomilehto et al., 2004; Jauhianien et al., 2005). La empresa Valio Ltd. comercializó en Finlandia este producto lácteo con el nombre de “Evolus”. Recientemente, la empresa Mjòlkursam Salan también lo ha comercializado en Islandia como “LH”. Mas aún, actualmente la empresa Kaiku-Iparlat lo ha introducido en España con el nombre “Kaiku Vitabrand”, y la empresa Emmi lo ha introducido en Suiza, Portugal, Malta e Italia como “Emmi-Evolus”. Robert et al., del grupo Nestlé, han identificado también recientemente algunos péptidos inhibidores de la ECA en un producto lácteo obtenido por fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus* NCC 2765, pero faltan aún ensayos *in vivo* que confirmen su posible efecto antihipertensivo (Robert et al., 2004).

Nuestro grupo de investigación, en colaboración con el Grupo Leche Pascual, ha demostrado que algunas cepas seleccionadas de *Enterococcus faecalis* son capaces de producir otros péptidos inhibidores de la ECA distintos de

los péptidos VPP e IPP. La leche fermentada por estas bacterias mostró actividad antihipertensiva en ratas SHR cuando se administró de forma aguda, por vía oral (Muguerza et al., 2006). La leche atenuó además el desarrollo de hipertensión en estos animales cuando se administró de forma continuada, por vía oral, desde el momento del destete. Las propiedades antihipertensivas mejoraron cuando el producto fermentado se enriqueció en calcio (Miguel et al., 2005a). Los péptidos inhibidores de la ECA identificados en la leche, entre los que destaca la secuencia Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro (LHLPLP), que corresponde al fragmento f(133-138) de la  $\beta$ -caseína (Quirós et al., 2007), disminuyeron también la presión arterial de las ratas SHR cuando se administraron por vía oral. Estos péptidos no modificaron, por el contrario, la presión arterial de las ratas normotensas WKY (Miguel et al., 2006b).

Durante el proceso de elaboración del queso se pueden liberar también péptidos con actividad biológica. Como consecuencia del proceso proteolítico que tiene lugar cuando el queso madura, se forman concretamente péptidos con actividad inhibidora de la ECA (Abubakar et al., 1998; Gómez-Ruiz et al., 2003). La leche de partida, el cultivo iniciador y las condiciones del proceso de maduración, pueden influir en la actividad inhibidora del producto final. Así, Okamoto et al., en 1995, comprobaron que en los quesos maduros tipo Camembert existía actividad inhibidora de la ECA. Comprobaron asimismo que también existía esta actividad en los quesos azules y en el queso Cheddar rojo (Okamoto et al., 1995). Estos investigadores vieron que, por el contrario, los quesos frescos con bajo nivel de

proteólisis, como el queso Cottage, no tenían esta actividad. Estos hechos fueron corroborados por Meisel et al., cuando estudiaba la inhibición enzimática producida por extractos de distintos quesos (Meisel et al., 1997, 1998; Meisel et al., 2001). Los porcentajes de inhibición obtenidos por estos investigadores para los quesos maduros estuvieron próximos al 70%, pero los porcentajes de inhibición obtenidos para el queso fresco y para el queso Quarg fueron, respectivamente, inferiores al 13% y al 27%.

Es también cierto que cuando se prolonga el tiempo de maduración del queso, llega un momento en el que disminuye la actividad inhibidora de la ECA que se había alcanzado. Esto puede explicarse fácilmente, ya que los péptidos que se liberan durante la maduración del queso por actuación de las enzimas proteolíticas de las bacterias lácticas, se degradan posteriormente, y se generan fragmentos inactivos. Así, por ejemplo, en el queso parmesano con 6 meses de maduración se aislaron péptidos inhibidores de la ECA derivados de la  $\alpha_1$ -caseína, pero estos péptidos no pudieron detectarse en el mismo queso después de 15 meses de maduración (Addeo et al., 1994). Del mismo modo, la actividad inhibidora de la ECA del queso Gouda madurado 8 meses, fue de un 70%, pero la actividad inhibidora de este queso después de un proceso de maduración de 24 meses, fue sólo de un 34.6% (Meisel et al., 1998; Meisel et al., 2001). De manera análoga, más recientemente se ha comprobado que la actividad inhibidora de la ECA de un queso semimaduro, elaborado con fermentos convencionales y cepas

de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, disminuye durante su almacenamiento prolongado (Ryhänen et al., 2001).

Se han aislado también fragmentos peptídicos con actividad inhibidora de la ECA en otros quesos. Entre ellos, podemos citar el fragmento f(58-72) de la  $\beta$ -caseína, aislado en el queso Crescenza (Smacchi y Gobbetti, 1998) y en el queso Cheddar (Stepaniak et al., 1995), y también el fragmento f(43-52) de la  $\beta$ -caseína, aislado en este último queso (Jiang et al., 1998). Se ha extraído asimismo una fracción que tiene fragmentos peptídicos derivados de las caseínas y precursores de péptidos antihipertensivos, en un queso modificado enzimáticamente que se produce con *Lactobacillus casei* y distintas enzimas comerciales (Haileselassie et al., 1999). Saito et al., en 2000, han aislado también varios fragmentos peptídicos con alta actividad inhibidora de la ECA en el queso Gouda de 8 meses de maduración. Estos fragmentos se liberan de la  $\alpha_1$ -caseína y de la  $\beta$ -caseína (Saito et al., 2000). El fragmento f(60-68) de la  $\beta$ -caseína, aislado en el queso Feta por estos mismos investigadores, también presentó actividad inhibidora de la ECA (Saito et al., 2000).

## 5. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de huevo

A mediados del siglo XX comenzaron a realizarse algunos estudios sobre el posible efecto fisiológico de las proteínas del huevo (Mine et al., 1995), pero hasta este momento se han descrito muy pocos péptidos bioactivos procedentes de estas proteínas (Miguel et al., 2006c). Los primeros fueron dos péptidos antihipertensivos que tenían actividad directa en vasos. Inicialmente se aisló un octapéptido antihipertensivo y relajante vascular, que tenía la secuencia aminoacídica Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (FRADHPFL) (Fujita et al., 1995a). Esta secuencia corresponde al fragmento 358-365 de la ovoalbúmina, que es la proteína mayoritaria de la clara de huevo. El péptido en cuestión, mostró actividad vasodilatadora, parcialmente dependiente de endotelio, en arterias mesentéricas caninas. Se denominó ovokinina. Su efecto estaba mediado en parte por receptores B<sub>1</sub>, que estimulan la liberación de prostaciclina. La ovokinina mostró efectos antihipertensivos cuando se administró a ratas SHR en dosis altas. El efecto antihipertensivo de la ovokinina por vía oral, se potenciaba cuando el péptido se administraba emulsionado en yema de huevo. Se postuló que los fosfolípidos de la yema de huevo podían mejorar la disponibilidad oral de la ovokinina porque mejoraban su absorción intestinal, y también porque podían proteger al péptido de la digestión por las peptidasas intestinales (Fujita et al., 1995b).

El segundo péptido bioactivo aislado de las proteínas del huevo, fue un hexapéptido con actividad relajante vascular, que se caracterizó como el fragmento 2-7 de la ovokinina. Se denominó por eso ovokinina (2-7). Su secuencia es la siguiente: Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe (RADHPF) (Matoba et al., 1999). Esta secuencia se purificó a partir de un hidrolizado de ovoalbúmina con quimotripsina, y se vio que correspondía a los residuos 359-364 de esta proteína. El péptido causaba relajación endotelio dependiente en las arterias mesentéricas de las ratas SHR. Esta relajación estaba principalmente mediada por NO. El péptido no producía, por el contrario, relajación en las arterias de las ratas normotensas WKY. La presión arterial de las ratas SHR disminuía cuando se administraban por vía oral dosis de ovokinina (2-7) diez veces inferiores a las dosis eficaces de ovokinina, pero la presión de las ratas WKY no se modificaba cuando se administraban por esta vía las mismas dosis de dicho péptido. Se comprobó que la administración intravenosa de ovokinina (2-7), en las dosis mencionadas, no causaba cambios significativos en la presión arterial de las ratas SHR. La administración por esta vía de concentraciones muy elevadas del péptido, sólo ocasionaba, paradójicamente, una leve disminución de esta variable (Matoba et al., 2001). Los estudios de reactividad vascular en arterias aisladas de ratas realizados en 2004 por Scruggs et al., han demostrado que la ovokinina (2-7) produce sus efectos por activación de receptores vasculares B<sub>2</sub> de bradiquinina (Scruggs et al., 2004).

Se ha intentado mejorar la actividad oral de los péptidos antihipertensivos

derivados de proteínas de huevo mediante modificaciones estructurales. Se han sintetizado, por ejemplo, algunos derivados de la ovokinina (2-7) que, administrados por vía oral, presentan una actividad antihipertensiva superior a la de este péptido. Entre ellos, destacan los péptidos Arg-Pro-Phe-His-Pro-Phe (RPFHPF) y Arg-Pro-Leu-Lys-Pro-Trp (RPLKPW). Estas secuencias han mostrado, respectivamente, diez y cien veces más actividad que la ovokinina (2-7), tras su administración oral a ratas SHR. Las sustituciones de aminoácidos realizadas, conferirían probablemente a estos péptidos mayor resistencia a las proteasas del tracto digestivo (Matoba et al., 2001; Yamada et al., 2002).

Hemos destacado anteriormente que la inhibición de la ECA es el principal mecanismo implicado en el efecto de los péptidos antihipertensivos de origen alimentario. En este contexto, cabe resaltar que Fujita et al, en 2000, comprobaron que los hidrolizados de ovoalbúmina obtenidos por tratamiento con pepsina y termolisina, presentaban actividad inhibidora de esta enzima. Los valores de  $IC_{50}$  de los hidrolizados eran, respectivamente, 45  $\mu\text{g/ml}$  y 83  $\mu\text{g/ml}$ . Se aislaron seis péptidos con actividad inhibidora de la ECA a partir del hidrolizado de ovoalbúmina obtenido por tratamiento con pepsina. Estos péptidos tenían valores de  $IC_{50}$  comprendidos entre 0.4  $\mu\text{M}$  y 15  $\mu\text{M}$ , pero de ellos sólo el dipéptido Leu-Trp (LW) mostró actividad antihipertensiva en ratas SHR. Fujita et al. no consiguieron hidrolizados activos al tratar la ovoalbúmina con tripsina o quimotripsina. Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos por estos investigadores para estos hidrolizados eran mayores de 1000  $\mu\text{g/ml}$  (Fujita et al., 2000).

Algunos estudios de nuestro grupo de investigación, han demostrado también que la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo con diferentes enzimas de origen digestivo, proporciona hidrolizados con elevada actividad inhibidora de la ECA. Los hidrolizados más potentes se obtuvieron cuando se hidrolizó la clara de huevo con pepsina. El tiempo de hidrólisis, en este caso, era importante para la potencia del hidrolizado. Cuando el tiempo de incubación con pepsina era superior a 30 minutos, se consiguieron hidrolizados activos que tenían valores de  $IC_{50}$  relativamente bajos. La hidrólisis de la clara de huevo con pepsina durante tres horas, proporcionó un hidrolizado con potente actividad inhibidora de la ECA, que tenía un valor de  $IC_{50}$  de 55  $\mu\text{g/ml}$ . La ultrafiltración de este hidrolizado permitió obtener una fracción con masa molecular menor de 3000 Da, que presentó mucha más actividad inhibidora de la ECA que el propio hidrolizado. Esta fracción tenía un valor de  $IC_{50}$  de 34  $\mu\text{g/ml}$ . En ella se identificaron varios péptidos con actividad inhibidora de la ECA. Los péptidos más potentes correspondían a las secuencias Tyr-Arg-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu (YAEERYPIL), Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu (RADHPFL) e Ile-Val-Phe (IVF). Estas secuencias presentaron, respectivamente, valores de  $IC_{50}$  iguales a 4.7, 6.2 y 33.11  $\mu\text{M}$ . En contraste con los resultados aportados por otros investigadores, en nuestro laboratorio pudimos conseguir también hidrolizados activos cuando la hidrólisis de las proteínas de la clara de huevo se producía con tripsina o quimotripsina, pero en este caso se requería como mínimo un tiempo de incubación de 24 horas (Miguel et al., 2004).

El hidrolizado obtenido en nuestro laboratorio cuando se trataba la clara de huevo con pepsina durante 3 horas, su fracción menor de 3000 Da, y las secuencias peptídicas YAEERYPIL, RADHPFL e IVF, mostraron claros efectos antihipertensivos. Estos productos ocasionaron una disminución significativa de la PAS y de la PAD en las ratas SHR, cuando se administraban en dosis única, por vía oral. Estas mismas administraciones no modificaron la presión arterial de las ratas normotensas WKY (Miguel et al., 2005b). Se comprobó, sin embargo, que el hidrolizado atenuaba también el desarrollo de hipertensión arterial en las ratas SHR, cuando se administraba por vía oral a estos animales desde el destete (Miguel et al., 2006c). Estudios paralelos simulando la digestión gastrointestinal, han indicado que las secuencias YAEERYPIL y RADHPFL se hidrolizan cuando se administran por vía oral (Miguel et al., 2006a). Es muy probable, por lo tanto, que los productos resultantes de esta hidrólisis sean los responsables del efecto que se observa al administrar estas secuencias. Probablemente estos productos de hidrólisis sean también responsables, al menos en parte, del efecto antihipertensivo que se observa al administrar el hidrolizado (Miguel et al., 2006a).

Se han obtenido también algunos péptidos con actividad antihipertensiva, provocando la hidrólisis enzimática de las proteínas de la yema de huevo. Cuando se hidrolizan con diferentes enzimas estas proteínas, se pueden producir oligopéptidos inhibidores de la ECA. La administración oral de distintas dosis de

estos oligopéptidos, causó disminuciones significativas de la PAS y de la PAD en ratas SHR (Yoshii et al., 2001). Cabe por último mencionar, que también se han descrito recientemente péptidos derivados de la ovotransferrina, que tienen actividad inhibidora de la ECA y efecto antihipertensivo (Lee et al., 2006 a, b).

## 6. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de pescado

Se han obtenido péptidos bioactivos a partir de otros materiales biológicos distintos de la leche y el huevo. Se han estudiado mucho, especialmente, algunas proteínas de pescado, y la actividad biológica de estas proteínas se ha relacionado también con secuencias concretas que pueden liberarse por hidrólisis enzimática. Suetsuna y Osajima, en 1986, fueron los primeros que obtuvieron productos peptídicos con actividad inhibidora de la ECA procedentes de pescado. Estos investigadores consiguieron hidrolizados proteicos de sardina, mediante tratamiento de las proteínas de este pescado con una proteasa proveniente de *Aspergillus oryzae*, que mostraban actividad inhibidora de la ECA (Suetsuna y Osajima, 1986). Estos hidrolizados también tenían actividad vasodilatadora y antihipertensiva (Suetsuna y Osajima, 1989). Algo después, Kohama et al., purificaron un octapéptido derivado de un hidrolizado de atún, que presentaba elevada actividad inhibidora de la ECA (Kohama et al., 1988; Kohama et al., 1989). Se aislaron asimismo cuatro péptidos inhibidores de la ECA en el intestino de bonito (Matsumura et al., 1993). La administración oral de estos péptidos, ocasionó una disminución de la presión arterial en las ratas SHR (Karakaki et al., 1993). Se obtuvo además un hidrolizado de las proteínas de este pescado, mediante tratamiento con termolisina, que mostraba potente actividad inhibidora de la ECA (Yokoyama et al., 1992). Este hidrolizado mostraba también actividad antihipertensiva en ratas SHR (Fujita et al., 1995c) y en pacientes hipertensos

(Fujita et al., 1997 a, b). Una de las secuencias identificadas en este hidrolizado, la secuencia Leu-Lys-Pro-Asn-Met (LKPNM), y el producto final obtenido después de la proteólisis de esta secuencia, el péptido Leu-Lys-Pro (LKP), mostraron también actividad antihipertensiva en las ratas SHR, cuando se administraron por vía intravenosa. La administración oral de ambos péptidos, LKPNM y LKP, ocasionó también una disminución de la presión arterial en estos animales. La disminución era máxima 6 horas después de administrar la secuencia LKPNM, y 4 horas después de administrar la secuencia LKP. El hidrolizado mostró actividad antihipertensiva en pacientes hipertensos y también en personas prehipertensas (Fujita y Yoshikawa, 1999). Este producto se aprobó oficialmente en Japón como “alimento de uso específico para la salud”, Nippon Supplement, Inc. lo comercializó en este país como una sopa peptídica. Metagenics también lo ha comercializado en los Estados Unidos de América en forma de tabletas denominadas Vasotensin™. La hidrólisis de las proteínas de bonito, cuando este alimento desecado se trataba con alcalasa procedente de *Bacillus licheniformis*, proporcionó también un producto que presentaba una considerable actividad inhibidora de la ECA *in vitro*. Se obtuvo una fracción proteica de este hidrolizado, que después de ser tratada con enzimas gastrointestinales, mantuvo una elevada actividad inhibidora de la enzima (Matsui et al., 1993). De los péptidos identificados en esta fracción proteica, destaca la secuencia Val-Tyr (VY), que disminuyó la presión arterial de las ratas SHR cuando se administró por vía oral (Matsufuji et al., 1995). Este dipéptido también inhibió la ECA (Matsufuji et al., 1994) y mostró efectos antihipertensivos en pacientes hipertensos (Kawasaki et al., 2000, 2002). Recientemente, se ha sugerido que los péptidos antihipertensivos

procedentes del bonito desecado, pueden disminuir la presión arterial por otros mecanismos distintos de la inhibición de la ECA. Se ha sugerido que estos péptidos, además de inhibir esta enzima, podrían presentar concretamente acción directa en el músculo liso vascular (Kouno et al., 2005).

La digestión proteolítica de los extractos de la gelatina que se obtiene de la piel de “Alaska pollack”, un subproducto de desecho industrial en el procesado del pescado, también ha proporcionado varios péptidos con potente actividad inhibidora de la ECA (Byun y Kim, 2001). Cuando estas proteínas se hidrolizaban con pepsina, se obtenían cinco fracciones. En la que exhibía mayor actividad inhibidora de la enzima se encontró un octapéptido con un valor de  $IC_{50} = 14.7 \mu M$  (Je et al., 2004). También se han realizado estudios con algunos hidrolizados de proteínas de salmón. Estos hidrolizados se comportaron como potentes inhibidores de la ECA, y administrados por vía oral, tuvieron efecto antihipertensivo en las ratas SHR (Ono et al., 2003, 2006). Muy recientemente se han encontrado péptidos derivados de proteínas de camarón, que presentan elevada actividad inhibidora de la ECA, y que posiblemente tengan también efecto antihipertensivo (He et al., 2006; Hai-Lun et al., 2006).

## **7. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas vegetales**

Entre los péptidos antihipertensivos que se han aislado de proteínas de origen vegetal, destacan los que provienen de proteínas de soja. Antes de exponer los estudios que se han realizado para obtener estos péptidos, haremos unos breves comentarios sobre la soja como producto alimenticio y funcional. La soja y sus derivados forman parte de las principales dietas de los países orientales. Por su valor nutricional, y por su influencia beneficiosa sobre la salud, actualmente el consumo de soja ha aumentado también en los países occidentales. La soja tiene, en realidad, un papel importante como producto funcional. Se le atribuyen diversas propiedades, entre las que cabe destacar su actividad anticancerígena, su capacidad para disminuir el colesterol, y su efecto preventivo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Messina, 1995, 1999; Anderson et al., 1999). Las proteínas de la soja tienen, además, propiedades físico-químicas muy aprovechables. Así, podemos citar su poder gelificante, emulsionante, y espumante, y también su elasticidad, viscosidad, solubilidad, cohesión-adhesión, y capacidad de absorción de agua y de grasa. Estas propiedades pueden modificarse por las condiciones de preparación de los distintos productos. El contenido de aminoácidos esenciales de la soja es distinto del de la leche de vaca. La soja contiene menos cantidad de Met y Phe, pero se considera también una sustancia con un valor proteico completo. Las proteínas de reserva de la soja son albúminas y globulinas, siendo mayoritarias las globulinas. Las dos globulinas

importantes de la soja, glicina y  $\beta$ -conglucina, tienen estructuras diferentes, y tienen también algunas propiedades distintas, pero es muy importante que ambas proteínas tienen la capacidad de formar geles, pues ello permite la elaboración a partir de la soja de uno de los productos más tradicionales en las dietas orientales, el “tofu” (concentrado de proteína de soja).

Se han obtenido péptidos bioactivos a partir de “tofu”, y también a partir de semillas de soja (*Glycine max*), de los subproductos derivados de la soja (suero de soja, o de los productos que se obtienen cuando se elabora una bebida de soja (leche de soja). Los estudios sobre péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de soja son, a pesar de todo, relativamente recientes. Los primeros estudios con péptidos derivados de proteínas de soja datan del año 1995. En esos trabajos, se obtuvieron hidrolizados de proteínas de soja con actividad inhibidora de la ECA (Shin et al., 1995) y con efecto antihipertensivo (Yu et al., 1996). Wu y Ding, en el año 2001, obtuvieron también péptidos con actividad inhibidora de la ECA mediante el tratamiento de las proteínas de soja con alcalasa. Estos péptidos mostraron además actividad antihipertensiva en ratas SHR cuando se administraron por vía oral (Wu y Ding, 2001). Se han obtenido después algunos derivados de la soja por digestión secuencial de estas proteínas con pepsina y pancreatina. Por este procedimiento se obtuvieron muchas fracciones peptídicas con actividad inhibidora de la ECA (Lo y Li-Chan, 2005). Cha y Park han obtenido también hidrolizados de proteínas de soja con elevada actividad inhibidora de la ECA, tratando estas proteínas con proteasas procedentes de *alkalophilic Bacillus*

*sp* (Cha y Park, 2005). Recientemente, se ha comprobado que diferentes hidrolizados enzimáticos de glicinina - las proteínas de almacén más importantes de las semillas de soja - presentan propiedades inhibitoras de la ECA (Mallikarjun Gouda et al., 2006). Existen, sin embargo, pocos estudios que hayan evaluado la actividad antihipertensiva de los derivados de la soja en modelos animales (Chen et al., 2004; Yang et al., 2004a; Koderá et al., 2006).

También otras proteínas de origen vegetal, distintas de las proteínas de soja, son una fuente potencial de péptidos con actividad antihipertensiva. Entre ellas destacan las proteínas de maíz (Maruyama et al., 1989; Miyoshi et al., 1991; Suh y Whang, 1999), las proteínas de trigo (Matsui et al., 1999; Li et al., 2002; Motoi y Kodama, 2003), las de arroz (He et al., 2005; Li et al., 2007), las de “wakame” (Suetsuna y Nakano, 2000; Sato et al., 2002 a, b; Suetsuna et al., 2004), las de las espinacas (Yang et al., 2003, 2004b), las de los girasoles (Megias et al., 2004), las de las judías (Li et al., 2006), las del sésamo (Nakano et al., 2006), las de brócoli (Lee et al., 2006c) y las de los champiñones (Hyoung Lee et al., 2004).

## 8. Tablas

La tabla 1 muestra la nomenclatura de los diferentes aminoácidos, establecida mediante códigos de una y de tres letras. En la tabla 2 aparecen los principales péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias obtenidos hasta este momento. Se señala su origen, el tratamiento enzimático que ha permitido su obtención y la actividad que han demostrado. La tabla 3 resume los productos funcionales con péptidos antihipertensivos comercializados hasta este momento. En ella se indica el nombre comercial de cada producto y las secuencias peptídicas que son responsables del efecto.

**Tabla 1.** Nomenclatura de los diferentes aminoácidos

<b>Aminoácidos</b>	<b>Código de tres letras</b>	<b>Código de una letra</b>
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

**Tabla 2.** Principales péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias.

Secuencia	Origen	Enzima	Actividad demostrada	Referencias
VPP, IPP	$\beta$ -Caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	IECA/Antihipertensiva	Nakamura et al., 1995 a,b; Nakamura et al., 1996; Sipola et al., 2001
VYP, VYPPFG	$\beta$ -Caseína	Proteinasa K	Antihipertensiva	Abubakar et al., 1998
KVLPVP, KVLPVPQ	$\beta$ -Caseína	Proteinasa de <i>Lactobacillus helveticus</i>	Antihipertensiva	Maeno et al., 1996
LHLPLP	$\beta$ -Caseína	Proteinasa de <i>Enterococcus faecalis</i>	IECA/Antihipertensiva	Muguerza et al., 2006; Quirós et al., 2007
FFVAPFPEVFGK	$\alpha_1$ -Caseína	Tripsina	IECA/Antihipertensiva	Karaki et al., 1990; Townsend et al., 2002
ALPMPHIR	$\beta$ -Lactoglobulina	Tripsina	IECA/Antihipertensiva	Mullaly et al., 1997 a y b
LLF, LKQW	$\beta$ -Lactoglobulina	Termolisina	IECA/Antihipertensiva	Hernández-Ledesma et al., 2002; en prensa
IPA	$\beta$ -Lactoglobulina	Varias enzimas	IECA/Antihipertensiva	Abubakar et al., 1998
YGLF	$\alpha$ -Lactoglobulina	Varias enzimas	Antihipertensiva	Mullaly et al., 1996; Nurmeinin et al., 2000
FRADHPFL	Ovoalbúmina	Pepsina	Relajante vascular/Antihipertensiva	Fujita et al., 1995 a, b
RADHPF	Ovoalbúmina	Quimotripsina	Relajante vascular /Antihipertensiva	Matoba et al., 1999; Scruggs et al., 2004
KVREGTTY	Ovotransferrina	No mencionada	IECA/ Antihipertensiva	Lee et al., 2006 a y b
YAEERYPIL RADHPFL IVF LW	Proteínas de la clara de huevo Ovoalbúmina	Pepsina Pepsina	IECA/Antihipertensiva IECA/Antihipertensiva	Miguel et al., 2004; 2005b Fujita et al., 2000
RADHP	Proteínas de la clara de huevo	Pepsina/Corolasa PP	IECA /Antihipertensiva	Miguel et al., 2006a
Oligopéptidos	Proteínas de la yema de huevo	Varias enzimas	IECA/Antihipertensiva	Yoshii et al., 2001
LKPNM, LKP	Proteínas de bonito	Termolisina	IECA/Antihipertensiva	Yokohama et al., 1992; Fujita et al., 1993; Fujita y Yoshikawa, 1999; Karaki et al., 1993
YRPY, GHF, VRP, ILP, IRP, LRP, THILTGD	Proteínas de bonito Proteínas de atún	No mencionada No mencionada	IECA/Antihipertensiva IECA / inhibe producción de endotelina	Matsumura et al., 1996; Fujita et al., 1993. Kohama et al., 1989; 1994
VY	Proteínas de sardina	Proteinasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	IECA/Antihipertensiva	Matsui et al., 1993; Matsufuji et al., 1994 ;1995

IECA: Inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina

**Tabla 3.** Alimentos funcionales con actividad antihipertensiva.

Producto	Nombre comercial	Componente activo	Empresa / País	Estudios en humanos
Leche fermentada	"Ámeal Peptide" <sup>a</sup> "Flora Proactive" <sup>b</sup>	IPP, VPP	Calpis Co. / Japón <sup>a</sup> Unilever / España <sup>b</sup>	Hata et al., 1996; Mizushima et al., 2004; Aihara et al., 2005; Mizuno et al., 2005
Leche fermentada	"Evolus" <sup>a</sup> "LH" <sup>b</sup> "KaikuVita" <sup>c</sup> "Emmi-Evolus" <sup>d</sup>	IPP, VPP	Valio Ltd. / Finlandia <sup>a</sup> Mjòlkursamsalan / Islandia <sup>b</sup> Kaiku-Iparlat / España <sup>c</sup> Emmi / Suiza, Portugal, Malta e Italia <sup>d</sup>	Seppo et al., 2002; 2003; Tuomilehto et al., 2004; Jauhiainen et al., 2005.
Hidrolizado de caseínas	Casein DP peptio drink	FFVAPFEVFGK	Kanebo, Ltd / Japón	Sugai, 1998; Sekiya et al., 1992
Hidrolizado de caseínas	C12 Peption	FFVAPFEVFGK	DMV International / Holanda	Townsend et al., 2004 ; Cadee et al., 2007
Hidrolizado de proteínas de suero	Biozate	Péptidos de suero	Davisco / Estados Unidos de América	Pins and Keenan, 2002; 2003; 2006
Hidrolizado. de proteínas de bonito	Peptide soup	LKPNM	NIPPON / Japón	Fujita et al., 1997 a y b; Fujita et al., 2001
Hidrolizado de proteínas de sardina	-	VY	Aprobado por el Gobierno Japonés como FOSHU	Kawasaki et al., 2000; 2002

FOSHU: Alimento de uso específico para la salud

## 9. Conclusiones

Los resultados de las investigaciones recopiladas en este texto, sugieren la posibilidad de utilizar los hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias para mejorar la salud de los consumidores. Resulta muy atractiva la idea de incluir estos productos como ingredientes de alimentos que podrían ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión. Su utilidad puede ser, sobre todo, manifiesta en sujetos prehipertensos que no precisan medicación antihipertensiva porque son capaces de controlar su presión arterial con la dieta. Estos productos es probable que resulten también útiles en pacientes hipertensos mal controlados con los medios farmacológicos habituales. Algunos de ellos, en realidad, han probado ya su eficacia y seguridad en pacientes hipertensos, y se han comercializado como alimentos funcionales que se utilizan actualmente con esta finalidad.

## 10. Referencias

Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* 1998; 81:3131-3138.

Addeo F, Chianese L, Sacchi R, Musso SS, Ferranti P, Malorni A. Characterization of the oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese soluble in 120 g trichloroacetic acid/l. *J Dairy Res* 1994; 61:365-374.

Adson A, Raub TJ, Burton PS, Barsuhn CL, Hilgers AR, Audus KL, Ho NFH. Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers. *J Pharm Sci* 1994; 83:1529-1536.

Aihara K, Kajimoto O, Hirata H, Takahashi R, Nakamura Y. Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J Am Coll Nutr* 2005; 24:257-265.

Almeida AP, Frabregas BC, Madureira MM, Santos RJ, Campagnole-Santos MJ, Santos RA. Angiotensin-(1-7) potentiates the coronary vasodilatory effect of bradykinin in the isolated rat heart. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:709-713.

Alting AC, Meijer RJGM, Van Beresteijn ECH. Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal conditions of infants. *Diabetes Care* 1997; 20:875-880.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90:7915-7922.

Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:464S-474S.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Wollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *New Engl J Med* 1997; 336:1117-1124.

Astwood LD, Leach JN, Fuschs RL. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotechnol* 1996; 14:1269-1273.

Baykal Y, Yilmaz MI, Celik T, Gok F, Rehber H, Akay C, Kocar IH. Effects of antihypertensive agents, alpha receptor blockers, beta blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blockers and calcium channel blockers, on oxidative stress. *J Hypertens* 2003; 21:1207-1211.

Bernier SG, Haldar S, Michel T. Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2000; 275:30707-30715.

Bree F, Hamon G, Tillement JP. Evidence for two binding sites on membrane-bound angiotensin-converting enzymes (ACE) for exogenous inhibitors except in testis. *Life Sci* 1992; 51:787-794.

Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 1973; 34:279-282.

Buñag RD, Butterfield J. Tail-cuff blood-pressure measurement without external preheating in awake rats. *Hypertension* 1982; 4:898-903.

Burton PS, Conradi RA, Hilgers AR, Ho NFH, Maggiora LL. The relationship between peptide structure and transport across epithelial cell monolayers. *J Control Release* 1992; 19:87-98.

Byun H, Kim S. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem* 2001; 36:1155-1162.

Cadee JA, Chang CY, Chen CW, Huang CN, Chen SL, Wang CK. Bovine casein hydrolysate (c12 Peptide) reduces blood pressure in prehypertensive subjects. *Am J Hypertens* 2007; 20:1-5.

CDER/FDA. Guidance for industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage form based on a biopharmaceutical classification system. (August 2000).

Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J Food Sci Nutr* 1999; 50:291-296.

Chabance B, Marterua P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollés P, Fiat AM. Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* 1998; 80:155-165.

Cha M, Park JR. Production and characterization of a soy protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate. *J Med Food* 2005; 8:305-310.

Chang KJ, Lillian A, Hazum E, Cuatrecasas P. Morphinetin: a potent and specific agonist for morphine ( $\mu$ ) receptors. *Science* 1981; 212:75-77.

Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. Antioxidant activity of peptides designed based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 1996; 44:2619-2623.

Chen JR, Yang SC, Suetsuna K, Chao JCJ. Soybean protein-derived hydrolysate affects blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Food Biochem* 2004; 28:61-73.

Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. Binding of peptides substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1980; 25:401-407.

Chiba H, Tani F, Yoshikawa M. Opioid antagonist peptides derived from  $\kappa$ -casein. *J Dairy Res* 1989; 56:363-366.

Chobert JM, El-Zahar K, Sitohy M, Dalgalarrrondo M, Metro F, Choiset Y, Haertle T. Angiotensin I-converting-enzyme (ACE)-inhibitory activity of tryptic peptides of ovine beta-lactoglobulin and of milk yoghurts obtained by using different starters. *Lait* 2005; 85:141-152.

Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci* 2000; 11:254-262.

Collins R, Peto R, MacMahon S, Herbert P, Fiebach NH, Eberlein KA, Godwin J, Qizilbash N, Taylor JO, Hennekens CH. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* 1990; 335:827-838.

Conradi RA, Hilgers AR, Ho NFH, Burton PS. The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. II. Peptide bond modification which results in improved permeability. *Pharm Res* 1992; 9:435-439.

Conradi RA, Wilkinson KF, Rush BD, Hilgers AR, Ruwart MJ, Burton PS. In vitro/in vivo models for peptide oral absorption: Comparison of Caco-2 cell permeability with rat intestinal absorption of renin inhibitory peptides. *Pharm Res* 1993; 10:1790-1792.

Cushman DW, HS Cheung. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 1971; 20:1637-1648.

Cushman DW, Pluscec J, Williams NJ, Weaver ER, Sabo EF, Kocy O, Cheung HS, Ondetti MA. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by analogs of peptides from *Bothrops jaraca* venom. *Experientia* 1973; 29:1032-1035.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry* 1977; 16:5484-5491.

D'Alvise N, Lesueur-Lambert C, Ferin B, Dhulster P, Guillochon D. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate. *Enzyme Microb Tech* 2000; 27:286-294.

Daniel H, Morse EL, Adibi SA. Determinants of substrate affinity for the oligopeptide/H<sup>+</sup> symporter in the renal brush border membrane. *J Biol Chem* 1992; 267:9565-9573.

Dávalos A, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem.* 2004 ;52:48-54.

Dávalos A, Miguel M, Bartolomé B, López-Fandiño R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* 2004b; 67:1939-1944.

Deddish PA, Wang LX, Jackman HL, Michel B, Wang J, Skidgel RA, Erdös EG. Single-domain angiotensin I converting enzyme (kininase II): characterization and properties. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279:1582-1589.

Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* 1998; 31:912-917.

Diplock AT, Aeggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. (1998) Scientific concepts of functional food in Europe, consensus document. (FF-27-de 98) Bruselas: ILSI Europa, p. 17.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87: E1-E9.

Dzau VJ. Theodore cooper lecture: tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001; 37:1047-1052.

Erdös EG. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. Am J Med 1976; 60:749-759.

Fazel, A. Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. Functional peptides. Danone World Newsletter 1998.

FDA "Guidance for industry Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies based on Biopharmaceutics Classification system". CDER draft – Enero 1999.

Fiat AM, Migliore-Samour D, Jollès P, Drouet L, Bal dit Sollier C, Caen J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. J Dairy Sci 1993; 76:301-310.

Fischer MA, Avorn J. Economic implications of evidence-based prescribing for hypertension: can better care cost less? JAMA 2004; 291:1850-1856.

Fujita H, Usui H, Kurahashi K, Yoshikawa M. Isolation and characterization of Ovokinin, a bradykinin B1 agonist peptide derived from ovalbumin. *Peptides* 1995a; 16:785-790.

Fujita H, Sasaki R, Yoshikawa M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered Ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidyl-choline. *Biosci Biotech Biochem* 1995b; 59:2344-2345.

Fujita H, Yokoyama K, Yaumoto R, Yoshikawa M. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995c; 22:S304-S305.

Fujita H, Yasumoto R, Hasegawa M, Ohshima K. Human volunteers study on antihypertensive effect of "Katsuobushi Oligopeptide" (I). *Jpn Pharmacol Ther* 1997a; 25:147-151.

Fujita H, Yasumoto R, Hasegawa M, Ohshima K. Human volunteers study on antihypertensive effect of "Katsuobushi Oligopeptide" (II) – A placebo-controlled

study on the effect of “peptide soup” on blood pressure in borderline and hypertensive subjects. *Jpn Pharmacol Ther* 1997b; 25:153-157.

Fujita H, Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacol* 1999; 44:123-127.

Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *J Food Sci* 2000; 65:564-569.

Fujita H, Yamagami T, Ohshima K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr Res* 2001; 21:1149-1158.

Fukunaga M, Yura T, Badr KF. Stimulatory effect of 8-Epi-PGF2 alpha, an F2-isoprostane, on endothelin-1 release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 26:S51-S52.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376.

Ganapathy V, Leibach FH. Is intestinal peptide transport energized by a proton gradient?. *Am J Physiol* 1985; 249:G153-G160.

García Del Río C, Smellie WS, Morton JJ. Des-Asp-angiotensin I: its identification in rat blood and confirmation as a substrate for converting enzyme. *Endocrinology* 1981; 108:406-412.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic effects of angiotensin II (3-8) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1993; 110:159-162.

Gardner MIG. Absorption of intact proteins and peptides. *Physiology of the gastrointestinal tract*, Ed. LR Johnson, Raven Press, 1994, 12, pp. 1795-1820.

Garrison EA, Santiago JA, Osei SY, Kadowitz PJ. Analysis of responses to angiotensin peptides in the hindquarters vascular bed of the cat. *Am J Physiol* 1995; 268:H2418-H2425.

Gaynes RP, Szidon JP, Oparil S. In vivo and in vitro conversion of des-1-Asp angiotensin I to angiotensin III. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 2871-2877.

Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F. Production of angiotensin I-converting peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* FT5. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:3898-3904.

Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J* 2003; 12:697-706.

Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides isolated from Manchego cheeses. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int Dairy J* 2004a; 14:1075-1080.

Gómez-Ruiz JA, Recio I, Belloque J. ACE-Inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [ $\beta$ -CN f(47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *J Agric Food Chem* 2004b; 52:6315-6319.

Goodwin JT, Mao B, Vidmar TJ, Conradi RA, Burton PS. Strategies toward predicting peptide cellular permeability from computed molecular descriptors. *J Pept Res* 1999; 53:355-369.

Granger JP, Alexander BT. Abnormal pressure-natriuresis in hypertension: role of nitric oxide. *Acta Physiol Scand*. 2000; 168:161-8.

Gurer H, Neal R, Yang P, Oztezcan S, Ercal N. Captopril as an antioxidant in lead-exposed Fisher 344 rats. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18:27-32.

Hai-Lun H, Xiu-Lan C, Cai-Yun S, Yu-Zhong Z, Bai-Cheng Z. Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *J Pept Sci* 2006; 12:726-733.

Haileselassie SS, Lee BH, Gibbs BF. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J Dairy Sci* 1999; 82:1612-1617.

Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr* 1996;16:33-49.

Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamura Y, Takano T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:767-771.

He GQ, Xuan GD, Ruan H, Chen QH, Xu Y. Optimization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition by rice dregs hydrolysates using response surface methodology. *J Zhejiang Univ Sci B* 2005; 6:508-513.

He H, Chen X, Sun C, Zhang Y, Gao P. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. *Bioresour Technol* 2006; 97:385-390.

Hernández-Ledesma B, Recio I, Ramos M, Amigo L. Preparation of ovine and caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin. *Int Dairy J* 2002; 12:805-812.

Hernández-Ledesma B, Miguel M, Amigo L, Aleixandre MA, Recio I. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of  $\beta$ -lactoglobulin peptides. *J Dairy Res* 2007; 74:336-339.

Heyman M, Desjeux JF. Significance of intestinal food protein transport. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 15:48-57.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 1989; 96:736-749.

Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1990; 7:902-910.

Hughes J, Kosterlitz HW, Smith TW. The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues. *Br J Pharmacol* 1977; 61:639-647.

Husain A. The chymase-angiotensin system in humans. *J Hypertens* 1993; 11:1155-1159.

Hyoung Lee D, Ho Kim J, Sik Park J, Jun Choi Y, Soo Lee J. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 2004; 25:621-627.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244:181-189.

Ijäs H, Collin M, Finchenberg P, Pihlanto-Leppälä A, Korhonen H, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen ML. Antihypertensive opioid-like milk peptide alpha-lactorphin: Lack of effect on behavioural test in mice. *Int Dairy J* 2004; 14:201-205.

Jauhiainen T, Vapaatalo H, Poussa T, Kyronpalo S, Rasmussen M, Korpela R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive

subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *Am J Hypertens* 2005; 18:1600-1605.

Je JY, Park PJ, Kwon JY, Kim SK. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2004; 52:7842-7845.

Jiang H, Grieve PA, Marschke RJ, Wood AF, Dionysius DA, Alewood PF. Application of tandem mass spectrometry in the characterisation of flavour and bioactive peptides. *Aust J Dairy Technol* 1998; 53:119.

Karaki H, Doi K, Sugano S, Uchiya H, Sugai R, Murakami U, Takemoto S. Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp Biochem Physiol* 1990; 96C:367-371.

Karaki H, Kuwahara M, Sugano S, Doi C, Doi K, Matsumura N, Shimizu T. Oral administration of peptides derived from bonito bowels decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats by inhibiting angiotensin converting enzyme. *Comp Biochem Physiol C* 1993; 104:351-353.

Kawasaki T, Seki E, Osajima K, Yoshida M, Asada K, Matsui T, Osajima Y. Antihypertensive effect of Valyl-tyrosine, a short chain peptide derived of sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J Hum Hypertens* 2000; 14:519-523.

Kawasaki T, Jun CJ, Fukushina Y, Kegai K, Seki E, Osajima K, Itoh K, Matsui T, Matsumoto K. Antihypertensive effect and safety evaluation of vegetable drink with peptides derived from sardine protein hydrolysed on mild hypertensive, high normal, and normal blood pressure subjects. *Fukuoka Igaku Zasshi* 2002; 93:208-218.

Kawase M, Hashimoto H, Hosada M, Morita H, Hosono A. Effect of administration of fermented milk containing whey proteins concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 2000; 83:255-263.

Kim DC, Burton PS, Borchardt RTA. A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (Caco-2) and those using an in situ perfused rat ileum model of the intestinal mucosa. *Pharm Res* 1993; 10:1701-1714.

Kim SK, Byun HG, Park PJ, Shahidi F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2992-2997.

Kodera T, Nio N. Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive rats models. *J Food Sci* 2006; 71:C164-C173.

Kohama Y, Matsumoto S, Oka H, Teramoto T, Okabe M, Mimura Y. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 155:332-337.

Kohama Y, Oka H, Matsumoto S, Nakagawa T, Miyamoto T, Mimura T, Nagase Y, Satake M, Takane T, Fujita T. Biological properties of angiotensin converting enzyme inhibitor derived from tuna muscle. *J Pharmacobio-Dynan* 1989; 12:566:571.

Kohmura M, Nio N, Kubo K, Minishima Y, Munekata E, Ariyoshi Y. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein. *Agric Biol Chem* 1989; 53:2107-2114.

Kudoh K, Matsumoto M, Onodera S, Takeda Y, Ando K, Shiomi N. Antioxidative activity and protective effect against ethanol-induced gastric mucosal damage of a potato protein hydrolysate. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49:451-455.

Kuono K, Hirano S, Kuboki H, Kasai M, Hatae K. Effects of dried bonito (Katsuobushi) and captopril, an angiotensin I-converting enzyme inhibitor, on rat isolated: a possible mechanism of antihypertensive action. *Biosci Biotech Biochem* 2005; 69:911-915.

Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:291-303.

Landmesser U, Drexler H. Effect of angiotensin II type 1 receptor antagonism on endothelial function: role of bradykinin and nitric oxide. *J Hypertens* 2006; 1:S39-S43.

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; 95:588-593.

Lee YK, Salminen S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:241-245.

Lee NY, Cheng JT, Enomoto T, Nakano Y. One peptide derived from hen ovotransferrin as prodrug to inhibit angiotensin converting enzyme. *J Food Drug analysis* 2006a; 14:31-35.

Lee NY, Cheng JT, Enomoto T, Nakano Y. Antihypertensive effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide obtained from hen ovotransferrin. *J Chinese Chem Soc* 2006b; 53:495-501.

Lee JE, Bae IY, Lee HG, Yang CB. Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea Italica*). *Food Chem* 2006c; 99:143-148.

Leibach FH, Ganapathy V. Peptide transporters in the intestine and the kidney. *Annu Rev Nutr* 1986; 16:99-119.

Li CH, Matsui T, Matsumoto K, Yamasaki R, Kawasaki T. Latent production of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from buckwheat protein. *J Pept Sci* 2002; 8:267-274.

Li GH, Liu H, Shi YH, Le GW. Direct spectrophotometric measurement of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal* 2005; 37:219-224.

Li GH, Wan JZ, Le GW, Shi YH. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. *J Pept Sci* 2006; 12:509-514.

Li GH, Qu MR, Wan JZ, You JM. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16:S275-S280.

Lo WM, Li-Chan EC. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from in vitro pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *J Agric Food Chem* 2005; 53:3369-3376.

Loufrani L, Henrion D, Chansel D, Ardaillou R, Levy BI. Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291:583-588.

MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stamler J. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335:765-774.

Maeno M, Yamamoto N, Takano T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* 1996; 79:1316-1321.

Maes W, Van Camp J, Vermeirssen V, Hemeryck M, Ketelslegers JM, Schrezenmeir J, Van Oostveldt P, Huyghebaert A. Influence of the lactokinin Ala-

Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelial cells. *Regul Pept* 2004; 18:105-109.

Mallikarjun Gouda KG, Gowda LR, Rao AG, Prakash V. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). *J Agric Food Chem* 2006; 54:4568-4573.

Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995; 30:1-26.

Marceau F, Larrivee JF, Saint-Jacques E, Bachvarov DR. The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:725-730.

Maruyama S, Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin-I converting enzyme in the tryptic hydrolyzate of casein. *Agric Biol Chem* 1982; 46:1393-1394.

Maruyama S, Mitachi H, Awaya J, Kurono M, Tomizuka N, Suzuki H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha$ s1 casein. *Agric Biol Chem* 1987a; 51:2557-2561.

Maruyama S, Mitachi S, Tanaka H, Tomizuka N, Suzuki H. Studies on the active site antihypertensive activity of angiotensin I-converting inhibitors derived from casein. *Agric Biol Chem* 1987b; 51:1581-1586.

Maruyama S, Miyoshi S, Kaneko T, Tanaka H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agric Biol Chem* 1989; 53:1077-1081.

Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 1996; 126:3063-3068.

Matoba N, Usui H, Fujita H, Yoshikawa M. A novel anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide-mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery. *FEBS Lett* 1999; 452:181-184.

Matoba N, Yamada Y, Usui H, Nakagiri R, Yoshikawa M. Designing potent derivatives of Ovokinin (2-7), an anti-hypertensive peptide derived from ovalbumin *Biosci Biotech Biochem* 2001; 65:636-639.

Matsufuji H, Matsui T, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. Angiotenin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58:2244-2245.

Matsufuji H, Matsui T, Ohshige S, Kawasaki T, Osajima K, Osajima T. Antihypertensive effects of angiotensin fragments in SHR. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 59:1398-1401.

Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57:922-925.

Matsui T, Li CH, Osajima Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J Peptide Sci* 1999; 5:289–297.

Matsumura N, Fujii M, Takeda Y, Sugita K, Shimizu T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate. *Biosci Biotech Biochem* 1993; 57:695-697.

Megias C, del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates. *J Agric Food Chem* 2004; 52:1928-1932.

Mehta JL, Lopez LM, Chen L, Cox OE. Alterations in nitric oxide synthase activity, superoxide anion generation, and platelet aggregation in systemic hypertension, and effects of celiprolol. *Am J Cardiol* 1994; 74:901-905.

Meisel H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Liv Prod Sci* 1997; 50:125-138.

Meisel H. Overview on milk protein-derived peptides. *Int Dairy J* 1998; 8:363-373.

Meisel H. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust J Dairy technol* 2001; 56:83-92.

Messina M. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J Nutr* 1995; 125:567S-569S.

Messina M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nut* 1999; 70:439S-450S.

Mierke DF, Nöbner G, Schiller PW, Goodman M. Morphicetin analogs containing 2-aminocyclopentane carboxylic acid as a peptidomimetic for proline. *Int J Pep Res* 1990; 35:34-45.

Miguel M, Recio I, Gómez-Ruiz JA, Ramos M, López-Fandiño R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J Food Prot* 2004; 67:1914-1920.

Miguel M, Muguerza B, Sánchez E, Delgado MA, Recio I, Ramos M, Aleixandre MA. Changes in arterial blood pressure of milk fermented by *Enterococcus faecalis*

CECT 5728 in spontaneously hypertensive rats. *British J Nutr* 2005a; 93:1-9.

Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre MA. Short-term effect of egg white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *British J Nutr* 2005b; 94:731-737.

Miguel M, Ramos M, Aleixandre MA, López-Fandiño R. Antihypertensive peptides obtained from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 2006a; 54:726-731.

Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA. Effect of ACE-inhibitory peptides obtained from *Enterococcus faecalis* fermented milk in hypertensive rats. *J Dairy Sci* 2006b; 89:3352-3359.

Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, Aleixandre MA. Long-term antihypertensive effect of egg white treated with pepsin in hypertensive rats. *Life Sci* 2006c; 78:2960-2966.

Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive peptides derived from egg proteins. *J Nutr* 2006c; 136(6):1457-1460.

Mine Y. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends Food Sci Technol* 1995; 6:225-232.

Miyoshi S, Ishikawa H, Kaneko T, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric Biol Chem* 1991; 55:1313-1771.

Mizuno S, Matsura K, Gotou T, Nishimura S, Kajimoto O, Yabune M, Kajimoto Y, Yamamoto N. Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo-controlled study in subjects with high-normal blood pressure and mild hypertension. *Br J Nutr* 2005; 94:84-91.

Mizushima S, Ohshige K, Watanabe J, Kimura M, Kadowaki T, Nakamura Y, Tochikubo O, Ueshima H. Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens* 2004; 17:701-706.

Moosmann B, Behl C. Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 2002; 61:260-268.

Motoi H, Kodama T. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung/Food* 2003; 47:354-358.

Muguerza B, Ramos M, Sánchez E, Manso MA, Miguel M, Aleixandre A, Delgado MA, Recio I. Antihypertensive activity of milks fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *Int Dairy J* 2006; 16:61-69.

Mullaly MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol Chem* 1996; 377:259-260.

Mullally MM, Meisel H, Fitzgerald RJ. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digest of whey proteins. *Int Dairy J* 1997a; 7:299-303.

Mullaly MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide  $\beta$ -lactoglobulin, corresponding to a tryptic fragment of bovine. FEBS Lett 1997b; 402:99-101.

Murakami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, Kawai Y, Negishi H, Saito T. Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (beta-lactosin B) isolated from a commercial whey product. J Dairy Sci 2004; 87:1967-1974.

Murray BA, Walsh DJ, FitzGerald RJ. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanyl-glycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. J Biochem Biophys Methods 2004; 59:127-137.

Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T, Okubo A, Yamazaki S. Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme inhibitors from sour milk. J Dairy Sci 1995a; 78:777-783.

Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano TJ. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. J Dairy Sci 1995b; 78:1253-1257.

Nakamura Y, Masuda O, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Biochem* 1996; 60:488-489.

Nakano D, Ogura K, Miyakoshi M, Ishii F, Kawanishi H, Kurumazuka D, Kwak CJ, Ikemura K, Takaoka M, Moriguchi S, Iino T, Kusumoto A, Asami S, Shibata H, Kiso Y, Matsumura Y. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70:1118-1126.

National Heart, Lung and Blood institute. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. 2003, 03-5233. National Institutes of Health, Bethesda, MD.

Ni A, Chao L, Chao J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 1998; 273:2784-2791.

Nurmeinin ML, Sipola M, Kaarto H, Pihlanto-Leppälä A, Piilola K, Korpela R, Tossavainen O, Kohonen H, Vapaatalo H.  $\alpha$ -lactorphin lowers blood pressure

measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. Life Sci 2000; 66:535-543.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. Jn Circ J 1963; 27:282-293.

Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura Y, Koizumi Y, Yanadiga F. Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented milks. Biosci Biotechnol Biochem. 1995; 59:1147-1149.

Okitsu M, Morita A, Kakitani M, Okada M, Yokogoshi H. Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. Biosci Biotechnol Biochem 1995; 59:325-326.

Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science 1977; 196:441-444.

Ondetti MA, Cushman DW. Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann Rev Biochem* 1982; 51:283-308.

Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. Isolation of peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory effect derived from hydrolysate of upstream chum salmon muscle. *J Food Sci* 2003; 68:1611-1614.

Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *Int J Food Sci Tech* 2006; 41:4383–386.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.

Pappenheimer JR, Dahl CE, Karnovsky ML, Maggio JE. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D-aminoacides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1942-1945.

Patel JM, Martens JR, Li YD, Gelband CH, Raizada MK, Block ER. Angiotensin IV receptor-mediated activation of lung endothelial NOS is associated with vasorelaxation. *Am J Physiol* 1998; 275:L1061-L1068.

Pepine C. Endothelial dysfunction and its role in the cycle of cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 1998; 14:5D-7D.

Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J* 1998; 8:325-331.

Pihlanto-Leppälä A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* 2000; 1:53-64.

Pins JJ, Keenan JM. The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (Biozate® 1). *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16:68.

Pins JJ, Keenan JM. The antihypertensive effects of a hydrolysed whey protein isolate supplement (Biozate® 1): A pilot study. *FASEB J* 2003; 17:A1110.

Pins JJ, Keenan JM. Effects of whey peptides on cardiovascular risk factors. *J Clin Hypertens* 2006; 8:775-782.

Quirós A, Ramos M, Muguerza B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A, Recio I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J* 2007; 17:33-41.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

Rival SG, Fornaroli S, CG Boeriu, Wichers HJ. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J Agric Food Chem* 2001a; 49:287-294.

Rival SG, Boeriu CG, Wichers HJ. Casein and casein hydrolysates. 2. Antioxidant properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J Agric Food Chem* 2001b; 49:295-302.

Rhodin JA. Microscopic anatomy of the pulmonary vascular bed in the cat lung. *Microvasc Res* 1978; 15:169-193.

Robert MC, Razaname A, Mutter M, Juillerat MA. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6923-6931.

Rodicio Díaz JL. Comentario sobre el coste/beneficio de la hipertensión arterial. *Gestión y evaluación de costes sanitarios* 2000; 1:6-10.

Rohrbach MS, Williams EB, Rolstad RA. Purification and substrate specificity of bovine angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 1981; 256:225-230.

Rokka T, Syvaaja EL, Tuominen J, Korhonen H. Release of bioactive peptides by enzymatic proteolysis of *Lactobacillus* GC fermented UHT-milk. *Milchwissenschaft* 1997; 52:675-678.

Ryhänen EL, Piilanto-Leppälä A, Pahkala K. A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int Dairy J* 2001; 11:441-447.

Saeed RW, Stefano GB, Murga JD, Short TW, Qi F, Bilfinger TV, Magazine HI. Expression of functional delta opioid receptors in vascular smooth muscle. *Int J Mol Med* 2000; 6:673-677.

Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem.* 1992; 111:103-108.

Saiga AI, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem* 2003; 51:3661-3667.

Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci* 2000; 83:1434-1440.

Sanders M E. Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv Food Nutr Res* 1993; 37:67-130.

Satake M, Enjho M, Nakamura Y, Takano T, Kawamura Y, Arai S. Transepithelial transport of the bioactive tripeptide, Val-Pro-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci Biotech Biochem* 2002; 66:378-384.

Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2002a; 50:6245-6252.

Sato M, Oba T, Yamaguchi T, Nakano T, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T. Antihypertensive effects of hydrolysates of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Ann Nutr Metab* 2002b; 46:259-267.

Scruggs P, Filipeanu CM, Yang J, Kang Chang J, Dun NJ. Interaction of ovokinin (2-7) with vascular bradykinin 2 receptors. *Reg Pep* 2004; 120:85-91.

Sekiya S, Kobayashi Y, Kita E, Imamura Y, Toyama S. Antihypertensive effects of tryptic hydrolysate of casein on normotensive and hypertensive volunteers. *J Nutr Food Sci* 1992; 45:513-517.

Seppo L, Kerojoki O, Suomalainen T, Korpela R. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension: a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 2002; 57:124-127.

Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:326-330.

Sexton JM, Britton SL, Beierwaltes WH, Fiksen-Olsen MJ, Romero JC. Formation of angiotensin III from [des-Asp1] angiotensin I in the mesenteric vasculature. *Am J Physiol* 1979; 237:H218-H223.

Shimizu M, Tsunogai M, Arai S. Transepithelial transport of oligopeptides in the human intestinal cell, Caco-2. *Peptides* 1997; 18:681-687.

Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from soybean paste. Korean J Food Sci Technol 1995; 27: 230-234.

Simón A, Castro A, Kaski JC. Avances en el conocimiento de la disfunción endotelial y su aplicación en la práctica clínica. Rev Esp Cardiol 2001; 54:211-217.

Sipola M, Finckenberg P, Santisteban J, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen M-L. Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. J Phys Pharm 2001; 52:745-754.

Sipola MP, Finckenberg P, Korpela R, Vapaatalo H, Nurminen MA. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. J Dairy Res 2002; 69:103-111.

Sirén AL, Feuerstein G. The opioid system in circulatory control. NIPS 1992; 7:26-30.

Smacchi E, Gobbetti M. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of acid lactic bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb Technol* 1998; 22:687-694.

Song L, Healy DP. Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 1999; 33:746-752.

Srinivas L, Shalini VK, Shylaja M. Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from tumeric (*Curcuma longa*). *Arch Biochem Biophys* 1992; 292:617-623.

Stadman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:797-821.

Stepaniak L, Fox PF, Sorhaug T, Grabska J. Effect of peptides from the sequence 58-72 of  $\beta$ -casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase and x-prolyldipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363. *J Agric Food Chem* 1995; 43:849-853.

Suetsuna K, Osajima K. The inhibitory activities against angiotensin I-converting

enzyme of basic peptides originating from sardine and hair tail meat. Bull Jpn Soc Sci Fish 1986; 5:1981-1984.

Suetsuna K, Osajima K. Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle. Nippon Eiyou, Shokuryou Gakkaishi 1989; 52:47-51.

Suetsuna K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from sardine muscle. J Nutr Biochem 1998; 9:415-419.

Suetsuna K, Nakano T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). J Nutr Biochem 2000; 11:450-454.

Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities of peptides derived from casein. J Nutr Biochem 2000; 11:128-131.

Suetsuna K, Maekawa K, Chen JR. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 2004; 15:267-272.

Sugai, R. ACE inhibitors and functional foods. *Bulletin of the IDF* 1998; 336:17-20.

Suh HJ, Whang JH. A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin-I converting enzyme. *Biotechnol Lett* 1999; 21:1055-1058.

Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6646-6652.

Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller-Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regul Pept* 1992; 40:409-419.

Tom B, Dendorfer A, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol* 2002; 137:276-284.

Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J Agric Food Chem* 2000; 48:1473-1478.

Townsend RR, McFadden CB, Ford V, Cadeé JA. A randomized, doubled-blind, placebo controlled trial of casein protein hydrolysate (C12 peptide) in human essential hypertension. *Am J Hyperten* 2004; 17:1056-1058.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension in man and rat. *Circ Res* 1981; 48: 09-319.

Tsuge N, Eikawa Y, Nomura Y, Yamamoto M, Sugisawa K. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymic hydrolysis of egg-white albumin. *J Agric Chem Soc Japan* 1991; 65:1635-1641.

Tuomilehto J, Lindstrom J, Hyyrynen J, Korpela R, Karhunen ML, Mikkola L, Jauhiainen T, Seppo L, Nissinen A. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *J Hum Hypertens* 2004; 18:705-802.

Turgeon SL, Gauthier SF. Whey peptide fractions obtained with a 2-step ultrafiltration process - production and characterization. *J Food Sci* 1990; 55:106-108.

Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23:177-183.

Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens* 1996; 9:277-284.

VanderJagt DJ, Okolo SN, Costanza A, Blackwell W, Glew RH. Antioxidant content of the milk of Nigerian women and the sera of their exclusively breastfed infants. *Nutr Res* 2001; 21:121-128.

Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods* 2002a; 51:75-87.

Vermeirssen V, Deplancke B, Tappenden KA, Van Camp J, Gaskins HR, Verstraete W. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 cell monolayer. *J Pept Sci* 2002b; 8:95-100.

Vermeirssen V, Van Camp J, Decroos K, Van Wijmelbeke L, Verstraete W. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. *J Dairy Sci* 2003; 86:429-438.

Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr* 2004; 92:357-366.

Visser S, Noorman HJ, Slangen CJ, Rollema HS. Action of plasmin on bovine  $\beta$ -casein in a membrane reactor. *J Dairy Res* 1989; 56:323-333.

Viveros OH, Diliberto EJ, Hazum EL, Chang KJ. Opiate-like material in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* 1979; 16:1101-1108.

Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:93-105.

Vreeman HJ, Both P, Slangen CJ. Rapid procedure for isolating the bitter carboxyl-terminal fragment 193-209 of  $\beta$ -casein on a preparative-scale. *Neth Milk Dairy J* 1994; 48:63-70.

Walsh DJ, Bernard H, Murray BA, MacDonald J, Pentzien AK, Wright GA, Wal JM, Struthers AD, Meisel H, Fitzgerald RJ. In vitro generation and stability of the lactokinin beta-lactoglobulin fragment (142-148). *J Dairy Sci* 2004; 87:3845-3857.

Williams TA, Barnes K, Kenny AJ, Turner AJ, Hooper NM. A comparison of the zinc contents and substrate specificities of the endothelial and testicular forms of porcine angiotensin converting enzyme and the preparation of isoenzyme-specific antisera. *Biochem J* 1992; 288:875-881.

Wolf-Maier K, Cooper RS, Kramer H, Banegas JR, Giampaoli S, Joffres MR, Poulter N, Primatesta P, Stegmayr B, Thamm M. Hypertension treatment and control in five European countries, Canada, and the United States. *Hypertension* 2004; 43:10-17.

Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2001; 49:501-506.

Yamada Y, Matoba N, Usiu H, Onishi K, Yoshikawa M. Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on Ovokinin(2-7). *Biosci Biotech Biochem* 2002; 66:1213-1217.

Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive effects of different kinds of fermented milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994; 58:776-778.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle  $Ca^{2+}$  channels. *J Hypertens* 1988; 6:S188-S191.

Yang Y, Marczak ED, Yokoo M, Usui H, Yoshikawa M. Isolation and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from spinach rubisco. *J Agric Food Chem* 2003; 51:4897-4902.

Yang HY, Yang SC, Chen JR, Tzeng YH, Han BC. Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2004a; 92:507-512.

Yang Y, Marczak ED, Usui H, Kawamura Y, Yoshikawa M. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests. *J Agric Food Chem* 2004b; 52:2223-2225.

Yee JJ, Shipe WF. Using enzymatic proteolysis to reduce copper-protein catalysis of lipid oxidation. *J Food Sci* 1981; 46:966-969.

Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotech. Biochem* 1992; 56:1541-1545.

Yoshii H, Tachi N, Ohba R, Sakamura O, Takemaya H, Itani T. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Com Biochem Physiol Part C* 2001; 128:27-33.

Yoshikawa M, Tani F, Chiba H. Structure-activity relationship of opioid antagonist peptides derived from milk proteins. *En Peptide Chemistry*. Shiba, T. (ed). Osaka: protein research foundation. 1988; pp. 473-476.

Yoshikawa M, Chiba H. Biologically active peptides derived from milk proteins. *Japan J Dairy Food Sci* 1990; 39:A315-A321.

Yu R, Park SA, Chung DK, Nam H, Shin ZI. Effect of soybean hydrolysate on hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1996; 25: 1031-1036.

Zárate G, Chaia AP, González S, Oliver G. Viability and  $\beta$ -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids. *J Food Prot* 2000; 63:1214-1221.

Zicha J, Kunes J. Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiol Rev* 1999; 79:1227-1282.