



Original/Alimentos funcionales

Estudios de inhibición *in vitro* de la enzima convertidora de angiotensina-I, efectos hipotensor y antihipertensivo de fracciones peptídicas de *V. unguiculata*

Trinidad Cú-Cañetas, David Betancur Ancona, Santiago Gallegos Tintoré, Mukthar Sandoval Peraza y Luis Chel Guerrero

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida (Yucatán), México.

Resumen

Se evaluó la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA-I) *in vitro* e *in vivo* por fracciones peptídicas provenientes de la hidrólisis enzimática del concentrado proteico de *Vigna unguiculata*; el cual fue separado en distintos pesos moleculares por ultrafiltración. La hidrólisis se realizó con Flavourzima® y Pepsina-Pancreatina en dos sistemas separados. Las fracciones obtenidas con Flavourzima® con mejor inhibición fueron las de tamaño >1kDa (>1kDa-F) y <1kDa (<1kDa-F), con un IC₅₀ de 1222,84 y 1098,6 µg/ml, respectivamente. Con Pepsina-Pancreatina la fracción <1kDa (<1kDa-P-P) presentó la mejor actividad, con un IC₅₀ de 402,23 µg/ml. El efecto hipotensor se evaluó en un modelo normotenso durante cuatro semanas, 10 mg/kg peso/vía oral en ratas Wistar. <1kDa-F disminuyó la presión sistólica:diastólica un 8,61:14,09%, respectivamente; mientras que <1kDa-P-P disminuyó la presión diastólica un 14,15%. El efecto antihipertensivo se evaluó en un modelo inducido durante tres semanas con L-NAME (25mg/kg/día). Durante las siguientes cuatro semanas se administraron las fracciones peptídicas, en donde >1kDa-F redujo la presión sistólica:diastólica un 10,27:4,92%, respectivamente; mientras que <1kDa-F disminuyó la presión diastólica un 3,56%. <1kDa-P-P disminuyó la presión sistólica:diastólica un 15,98:17,12%, respectivamente.

(Nutr Hosp. 2015;32:2117-2125)

DOI:10.3305/nh.2015.32.5.9624

Palabras clave: Enzima convertidora de angiotensina-I. Hipotensión. Antihipertensión. *Vigna unguiculata*. Biopeptidos.

STUDIES *IN VITRO* INHIBITION OF THE ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME-I, HYPOTENSIVE AND ANTIHYPERTENSIVE EFFECTS OF PEPTIDE FRACTIONS OF *V. UNGUICULATA*

Abstract

Inhibition of angiotensin-converting enzyme I (ACE-I) *in vitro* and *in vivo* from peptide fractions by enzymatic hydrolysis of the *Vigna unguiculata* protein concentrate was evaluated. Hydrolysis was done with Pepsin-Pancreatin and Flavourzima® in two separate systems. The resulting hydrolysates were ultrafiltered to obtain fractions with different molecular weight. The fractions with better inhibition Flavourzima® were size > 1 kDa (> 1 kDa-F) and < 1 kDa (< 1 kDa-F), with an IC₅₀ of 1222.84 and 1098.6 µg/ml respectively. Pepsin-Pancreatin fraction <1 kDa (<1 kDa-PP) showed the best activity with an IC₅₀ of 402.23 µg/ml. Hypotensive effect was evaluated in a normotensive model for 4 weeks, 10 mg/kg (weight)/orally, in Wistar rats. < 1 kDa-F decreased systolic: diastolic in 8.61: 14.09% respectively, while in the case of <1 kDa-PP lowered diastolic pressure in 14.15%. Antihypertensive effect was evaluated in induced model for 3 weeks with L-NAME (25 mg/kg (weight)/day). In the next 4 weeks peptide fractions, were administered, noticing >1 kDa-F decreased systolic pressure and diastolic 10.27: 4.92% respectively, while <1 kDa-F decreased diastolic pressure 3.56%. <1 kDa-PP decreased systolic: diastolic in 15.98: 17.12%, respectively.

(Nutr Hosp. 2015;32:2117-2125)

DOI:10.3305/nh.2015.32.5.9624

Key words: Angiotensin-I Converting Enzyme. Hypotension. Antihypertension. *Vigna unguiculata*. Biopeptides.

Correspondencia: Luis Chel Guerrero.
Facultad de Ingeniería Química.
Universidad Autónoma de Yucatán.
Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615.
Col. Chuburna de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán.
C.P. 97203, México.
E-mail: cguerrer@correo.uady.mx

Recibido: 9-VII-2015.
Aceptado: 14-VIII-2015.

Abreviaturas

HA: Hipertensión arterial.
SRAA: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.
A-1: Angiotensinogeno-1.
ECA-1: Enzima Convertidora de Angiotensina-1.
OPA: Ortoftaldialdehído.
HHL: Hipuril-L-Histidil-L-Leucina.
L-NAME: (N-nitro-L-arginina metil ester).

Introducción

La elevada frecuencia de obesidad, hipoalbuminemia, hipertrigliceridemia y alteraciones de la glucemia hacen sospechar una asociación entre el síndrome metabólico y sus componentes fisiopatogénicos y la hipertensión arterial (HA)¹. La HA está regulada por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el cual actúa en forma de cascada proteolítica en el que la renina separa del angiotensinógeno al decapeptido angiotensina-I (A-1)². Desde el año 1971 Ganten y cols.^{3,4} realizaron la primera comprobación de que el SRAA se podría producir a nivel de tejidos y órganos, además de que podía ser regulado de manera independiente. Aunque la hipertensión puede ser controlada por tratamientos farmacológicos, esto representa un costo muy alto en los servicios de salud a nivel mundial⁵. En la actualidad diversas investigaciones están dirigidas al estudio de las proteínas de los alimentos y sus productos, es decir al rompimiento de los enlaces peptídicos generando moléculas de menor tamaño, la generación de estos péptidos se realiza a través de fermentaciones lácticas, con métodos de hidrólisis química o a través de la hidrólisis enzimática⁶. Los péptidos con efecto antihipertensivo han sido de los más estudiados ya sea que se obtengan de alimentos o de fuentes exógenas, estos péptidos han demostrado tener efecto en prevenir y tratar la hipertensión, principalmente al inhibir a la enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA-1)⁷. La inhibición de la ECA-1 en estos sistemas está relacionada con la dilatación de la pared arterial o vasodilatación

lo que implica la disminución de la presión arterial, sin embargo aún no está completamente definido cuál es el principal mecanismo *in vivo* o si existen otros mecanismos involucrados en el control de este proceso⁸. Dada la relevancia del problema de salud que implica este padecimiento en este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* e *in vivo* sobre la enzima ECA-1, de péptidos provenientes de hidrolizados proteínicos de *Vigna unguiculata*. Se han obtenido aislados proteicos de esta leguminosa con contenidos de proteína similares al de la proteína de soya, (91,4% a 91,8% comparado con 93,0 a 93,5%) y también con un perfil de aminoácidos muy semejante, lo cual hace que presente características interesantes como cultivo⁹, se ha reportado su composición proteica encontrándose que más del 50% de las proteínas que contiene son globulinas, lo que le confiere un buen valor nutricional, además de que se ha reportado como una buena fuente de magnesio, calcio, potasio y fósforo y vitaminas del grupo B¹⁰. Finalmente se ha evaluado la capacidad funcional de sus aislados proteicos encontrándose que incluye solubilidad, capacidad emulsificante y espumante¹¹.

Materiales y métodos

Materiales

Se utilizaron granos de frijol caupí (*Vigna unguiculata*) adquiridos de campos de cultivo del estado de Yucatán, que fueron quebrados y descascarados para después ser molidos en un equipo de impacto, Mikrós (Industrial Machinery, Monterrey, México), hasta harina tamaño de malla 60 (0,24 mm), la harina se pesó en lotes de 1 kg y se almacenó a temperatura ambiente. Las enzimas pepsina[®] de origen porcino (9001-75-6) y pancreatina[®] de origen porcino (8049-47-6), Flavourzima[®] (9014-01-1) de *Aspergillus oryzae* y los reactivos analíticos orotftaldialdehído (OPA) (643-79-8), Hipuril-L-Histidil-L-Leucina (HHL) (207386-83-2), ECA-I de 2U (9015-82-1), y captopril (62571-86-2) provinieron de Sigma-Aldrich. El alimento balancea-

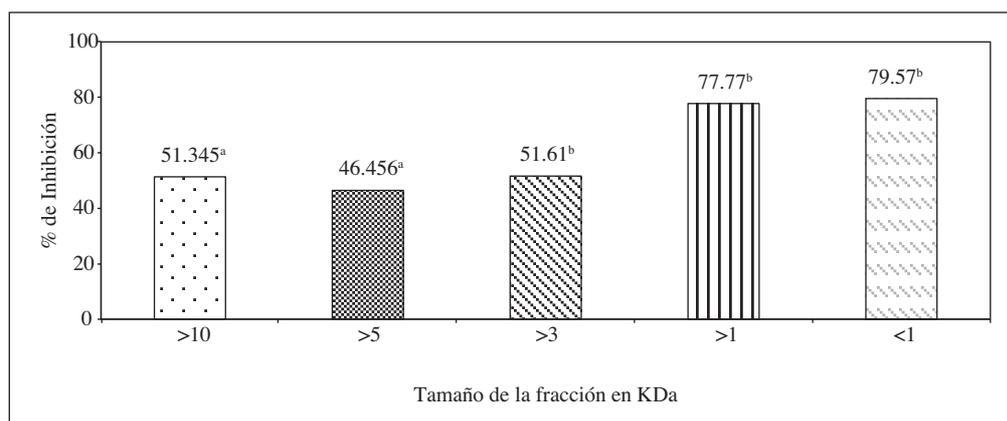


Fig. 1.—Efecto de inhibición sobre la enzima convertidora de angiotensina-I, de fracciones obtenidas por hidrólisis proteínica de *V. unguiculata* usando Flavourzima^{®a-b}. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). Los datos son la media de tres réplicas.

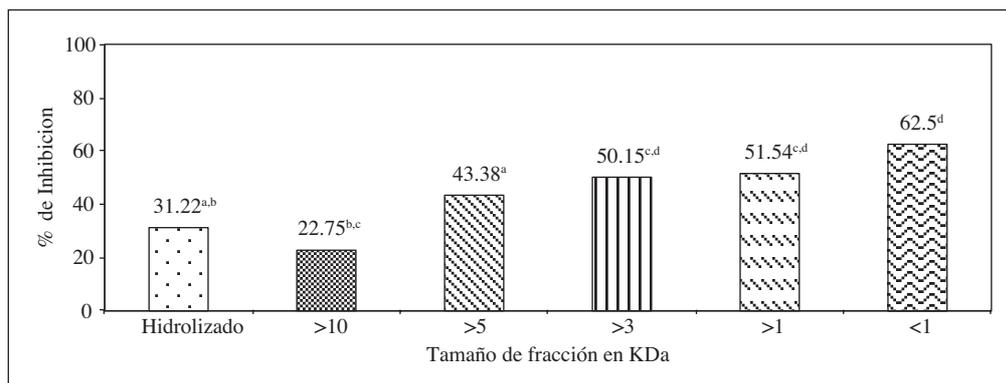


Fig. 2.—Efecto de inhibición sobre la enzima convertidora de angiotensina-I, de fracciones obtenidas por hidrólisis proteínica de *V. unguiculata* usando Pepsina-Pancreatina^{a-d}. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$). Los datos son la media de tres réplicas.

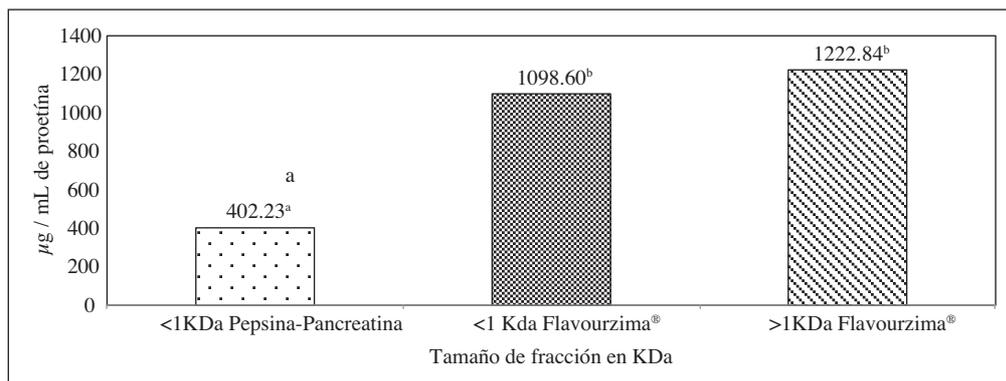


Fig. 3.— IC_{50} de fracciones obtenidas por ultrafiltración de hidrolizados proteínicos de *V. unguiculata*, en sistemas de hidrólisis con Flavourzima® y con Pepsina-Pancreatina^{a-b}. Letras superíndices indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Los datos son la media de tres réplicas.

do para ratas Harlan Teklad Global Diets® se obtuvo de Harlan Laboratories. Se usaron 30 ratas macho de la raza Wistar de 30 días de edad y peso corporal de 325 ± 50 g (Bioterio del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi). Se utilizó un electro esfigmomanómetro para ratas modelo Kent Scientific CODA Standar no-invasivo para presión, adquirido de Científica Senna.

Obtención del concentrado proteico

Se realizó la obtención de un precipitado proteico siguiendo el método reportado por Torruco-Uco¹². Posteriormente la fracción proteica fue centrifugada a $1,317 \times g$ por 12 min para recuperar el precipitado, que fue secado por liofilización y almacenado a $-4^\circ C$ hasta su uso.

Hidrólisis enzimática

Para la obtención del hidrolizado de proteínas se utilizó el método reportado por Li¹³ con modificaciones, aplicando una hidrólisis enzimática por 90 min. Se usaron suspensiones del concentrado de proteínas al 4% en dos procesos diferentes, una hidrólisis se-

cuencial con Pepsina Pancreatina (Sigma Lab.), 45min con pepsina-45min con pancreatina a una temperatura de $37^\circ C$ ajustando el pH a 2 para pepsina (con HCl 0,1N) y a 7,5 (con NaOH 0,1N) para pancreatina. El otro proceso de hidrólisis se realizó con una preparación de Flavourzyme® 500MG, a una temperatura de $50^\circ C$, ajustando el pH a 7 con NaOH 0,1. Ambas hidrólisis fueron detenidas inactivando la proteasa por calentamiento a $85^\circ C$ por 20 min. Los hidrolizados se centrifugaron a $12000 \times g$ durante 45 min a $4^\circ C$ y los sobrenadantes se congelaron para su análisis y separación posterior por ultrafiltración.

Separación de fracciones peptídicas por Ultrafiltración

La obtención de fracciones peptídicas por ultrafiltración (UF) se realizó con el método reportado por Cho *et al.*¹⁴ Las fracciones solubles de los hidrolizados de proteínas se fraccionaron a través de membranas de ultrafiltración de diferentes cortes moleculares: 1 kDa, 3 kDa, 5 kDa y 10 kDa. Se utilizó una unidad de ultrafiltración Model 2000, (Millipore, Inc., Marlborough, MA, USA.). Las fracciones peptídicas se almacenaron en alícuotas de 250 mL en congelación a $-4^\circ C$, para su posterior liofilización.

Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de fracciones peptídicas sobre la ECA.

La evaluación *in vitro* de las fracciones peptídicas, sobre la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) se realizó utilizando el método modificado de Cian¹⁵ basado en la reacción colorimétrica del ácido hipúrico con TT (2, 4,6-tricloro-s-triazina). Se utilizó una solución de ECA-1 (100mU/mL), el sustrato HHL se usó en una concentración de 0,3%(p/v), en buffer de fosfatos 0,1M pH 8,3 y una solución de NaCl 5M, las muestras a analizar se usaron a una concentración de 1mg/mL. Una vez finalizado el tiempo del ensayo, la reacción fue detenida con TT en dioxano 30 mg/mL posteriormente las muestras se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min y se leyó su absorbancia a 382 nm. La actividad de inhibición de la ECA se expresó como % inhibición de la ECA y se calcula como sigue:

$$\text{Inhibición de ECA (\%)} = \\ = 100 - \{(\text{MSE} - \text{ME}) (\text{ES} - \text{S}) \times 100\}$$

Donde MSE es densidad óptica de la ECA con muestra y sustrato, ME es la densidad óptica de ECA con la muestra, ES es la densidad óptica de la ECA con el sustrato y S es la densidad óptica del sustrato sin muestra y sin ECA. La IC₅₀ se determinó para las fracciones peptídicas que presentaron mayor % de inhibición mediante una regresión lineal de la concentración de péptido contra el porcentaje de inhibición.

Evaluación in vivo de la actividad hipotensora y antihipertensiva de fracciones peptídicas

El efecto hipotensor de las fracciones peptídicas seleccionada, se evaluó en ratas Wistar normotensas (n=6 por tratamiento) y el efecto antihipertensivo se evaluó en ratas Wistar (n=6 por tratamiento) con hipertensión inducida mediante la administración oral crónica del inhibidor de la óxido nítrico sintasa (N-nitro-L-arginina metil ester), L-NAME (25 mg/kg/día, vía oral) según el método de Pechanova¹⁶ con modificaciones.

Los animales fueron dispuestos de manera individual en jaulas de plástico con rejillas de acero inoxidable, en condiciones de ciclo luz/oscuridad natural, con temperatura constante a 25 °C y agua *ad libitum* durante todo el experimento.

Los animales se pesaron semanalmente para determinar la dosis correspondiente a la concentración empleada (10 mg/kg peso) tanto de las fracciones peptídicas como del fármaco de control Captopril y como control negativo se usó el vehículo de las disoluciones, agua destilada¹⁷. La dosificación de todos estos tratamientos se realizó diariamente por vía oral con una cánula directa al estómago en un volumen de 500 µL. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL-Facultad de Medicina-Universi-

dad Autónoma de Estado de Morelos) y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), “Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio”¹⁸ así como todas las regulaciones Federales e institucionales. Estos modelos experimentales se mantuvieron con una temperatura de 25 a 26 °C, una humedad relativa de 40 a 50% y un ciclo de luz y oscuridad de 12 h durante todo el período de duración del estudio. Todos los animales de experimentación se acondicionaron previamente al ambiente de laboratorio durante una semana donde recibieron su alimento y agua *ad libitum*. La presión arterial se midió utilizando un equipo CODA no invasivo con la técnica del manguito en la cola, los cambios en la presión sanguínea se calcularon como la diferencia entre la media de las mediciones obtenidas antes y después de la administración del tratamiento. Los resultados se expresaron como la media de los cambios de la presión sanguínea en mmHG de las mediciones de las ratas.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Todos los resultados se procesaron mediante estadística descriptiva utilizando medidas de tendencia central (media) y dispersión (desviación estándar). Los datos obtenidos de bioactividad *in vitro* e *in vivo* se evaluaron mediante ANOVA multifactorial. Se aplicó un diseño de bloques aleatorios en cuanto al tiempo para las evaluaciones del efecto inhibitorio *in vitro* de ECA-I, del efecto hipotensor y del efecto antihipertensivo *in vivo*. Las diferencias estadísticas se compararon a través de la comparación de medias por el método de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD). Estos análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion y de acuerdo a los métodos señalados por Montgomery (2007)¹⁹.

Resultados y discusión

Inhibición de la ECA

Se obtuvieron valores de 79,57% de inhibición para la fracción <1KDa, y de 77,78% para la fracción >1 KDa, obtenidas de la hidrólisis con Flavourzima®, ambas fracciones a una concentración de 1000 µg/mL. El efecto de la inhibición fue estadísticamente dependiente del tamaño de la fracción (P<0,05), ya que conforme disminuyó el tamaño molecular de las fracciones se incrementó el efecto de inhibición de la ECA-I

Para las fracciones obtenidas por hidrólisis secuencial con Pepsina-Pancreatina, se observó un efecto de inhibición en el hidrolizado de un 31,22%, al disminuir el tamaño de la fracción obtenida por ultrafiltración, se incrementó el efecto de la inhibición (P<0,05), pasando de un 22,5% para la fracción >10KDa, hasta un 62,5% para la fracción <1KDa. Este resultado fue

Tabla I ANOVA para efecto hipotensor sobre la presión sistólica					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A:tiempo	5821.81	3	1940.6	5.36	0.0012
B:tratamiento	19522.2	4	4880.54	13.48	0.0000
Residuos	294973.	815	361.929		
Total (corregido)	320434.	822			

Tabla II ANOVA para efecto hipotensor sobre la presión diastólica					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A:tiempo	12511.4	3	4170.45	14.85	0.0000
B:tratamiento	15179.7	4	3794.92	13.51	0.0000
Residuos	228907.	815	280.868		
Total (corregido)	256213.	822			

Tabla III ANOVA para el efecto antihipertensivo sobre la presión sistólica					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A:tiempo	20872.4	3	6957.47	16.05	0.0000
B:tratamiento	18628.2	4	4657.04	10.74	0.0000
Residuos	366330.	845	433.527		
Total (corregido)	406757.	852			

Tabla IV ANOVA para el efecto antihipertensivo sobre la presión diastólica					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A:tiempo	8359.88	3	2786.63	10.85	0.0000
B:tratamiento	14519.9	4	3629.98	14.14	0.0000
Residuos	216968.	845	256.766		
Total (corregido)	238838.	852			

semejante al obtenido con albúminas provenientes de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), donde las fracciones peptídicas con menor tamaño molecular presentaron modestas pero relativamente mayores valores de inhibición que las de mayor tamaño, con un IC_{50} de 0,35 mg/mL²⁰ de manera similar los péptidos obtenidos de *Acetes chinensis* con pesos moleculares entre 611 y 240 Da y que representaron un 63,6% de la

fracción obtenida por ultrafiltración en membrana de 3KDa con un IC_{50} de 0,67 mg/mL²¹.

IC₅₀ de la Enzima Convertidora de Angiotensina

Se determinó el valor de IC_{50} para fracciones seleccionadas de los hidrolizados obtenidos con Flavourzi-

ma® y con Pepsina-Pancreatina, tomando como criterio de selección que estas fracciones presentaron el mayor porcentaje de inhibición de la ECA-1 de cada sistema de hidrólisis. El IC₅₀ para la fracción <1KDa obtenida por hidrólisis con Flavourzima® fue de 1098,60 µg/ml, la fracción <1KDa obtenida por hidrólisis secuencial con Pepsina-Pancreatina tuvo un IC₅₀ de 402,23 µg/ml (P<0,05). Igualmente se determinó un IC₅₀ de 1222,84 µg/ml para la fracción >1 KDa obtenida por hidrólisis con Flavourzima®.

Los valores de IC₅₀ registrados para las fracciones seleccionadas, <1KDa y >1 KDa obtenidas por hidrólisis con Flavourzima® y <1KDa obtenida por hidrólisis con Pepsina-Pancreatina son comparables con lo reportado por Rho et. al²² quienes han encontrado valores en este rango en fracciones obtenidas de extracto fermentado de soya, donde la fracción >3 KDa presentó efecto inhibitor con un IC₅₀ de 1,12 mg/mL. De igual forma en el análisis de una preparación de chícharos *in vitro* el IC₅₀ de los péptidos fue de 0,72mg/mL, usando como un control el fármaco enalapril con un IC₅₀ de 7,46 mg/mL. En otro trabajo Akillioğlu y Karakaya, reportaron valores de IC₅₀ para frijol común de 0,77 mg/mL y de 0,26 mg/mL para lentejas verdes²³.

Con base en estos datos, se puede señalar que los valores de IC₅₀ de los péptidos inhibidores obtenidos de diversas fuentes cubren rangos variables, por ejemplo en otro estudio, realizado con pepino de mar (*Acaudina molpadioidea*) hidrolizado de manera secuencial con Bromelina-Alcalasa y separado por ultrafiltración en fracciones >2KDa y <2KDa, estas fracciones presentaron un IC₅₀ de 1,975 mg/mL y 0,615 mg/mL respectivamente²⁴. En estos y otros estudios de manera similar a los resultados obtenidos con las fracciones analizadas, se observó que la disminución del tamaño de la fracción peptídica estaba directamente relacionada con el incremento de su actividad inhibitoria²⁵.

Evaluación *in vivo* de la actividad hipotensora

Los valores obtenidos con cada tratamiento durante las 4 semanas del experimento señalan que las fracciones peptídicas <1 KDa obtenidas con Flavourzima® disminuyeron la presión sistólica en un 8,61% y la diastólica en un 14,09%, mientras que el fármaco de control Captopril disminuyó la presión sistólica en un 8,84% y la diastólica en un 11,14% (Fig. 4 a, b y d).

La fracción >1KDa obtenida con Flavourzima® no presentó una disminución de la presión arterial significativa (P<0,05), mientras que las fracciones <1KDa obtenidas con Pepsina-Pancreatina disminuyeron la presión diastólica en un 14,15%. Las diferencias en la presión que se observaron al final de las 4 semanas de tratamiento fueron significativas (P<0,05) según los ANOVAs, y como resultado de la prueba de múltiples rangos (LSD P<0,05), se observó que tanto para la presión sistólica como para la presión diastólica, los

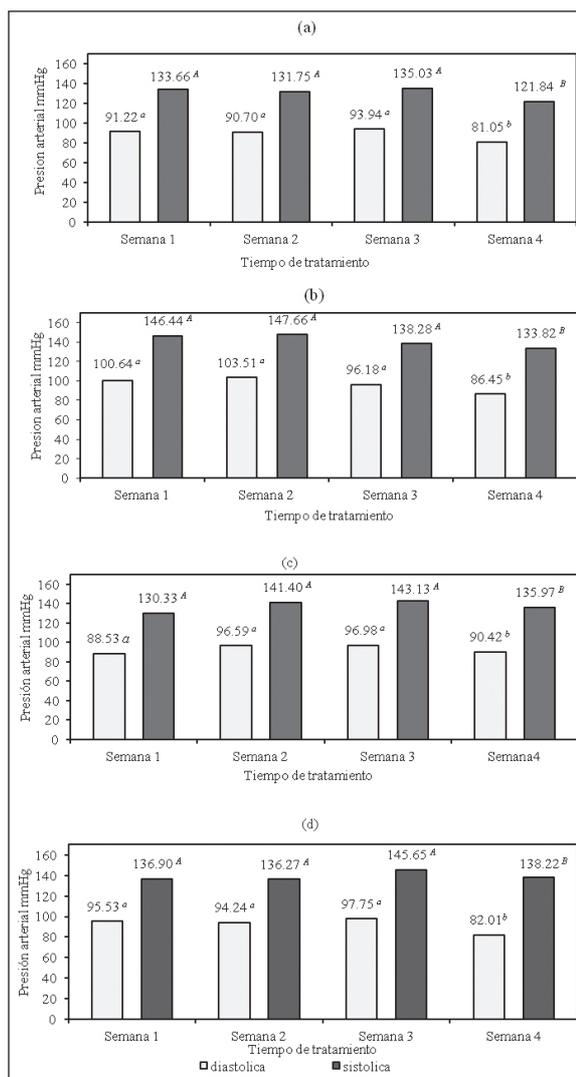


Fig. 4.—Evaluación del efecto hipotensor de distintas fracciones peptídicas, (a) Captopril, (b) Flavourzima® <1KDa, (c) Flavourzima® >1KDa, (d) Pepsina - Pancreatina <1 KDa, en ratas Wistar normotensas. ^{a-b} ó ^{A-B} Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. Los datos son la media de tres réplicas.

valores son estadísticamente diferentes en la 4 semana de tratamiento (Tablas I y II).

El hecho de que no se observó un efecto hipotensor significativo con la dosificación de algunas de estas fracciones *in vivo*, fue similar a los resultados obtenidos con la aplicación de fracciones obtenidas en otros estudios *in vivo*, Li et. al^{26,27,28} han descubierto que los péptidos con efecto inhibitorio *in vitro* no siempre tienen efecto antihipertensivo *in vivo*. Los péptidos con alta actividad inhibitoria no siempre se traducen en un descenso de la presión arterial. Se conoce además que la secuencia de aminoácidos y el largo de la cadena peptídica inhibitoria afectan las propiedades del péptido. El mismo efecto ha sido reportado por Fritz²⁹ en un estudio realizado con hidrolizados obtenidos con

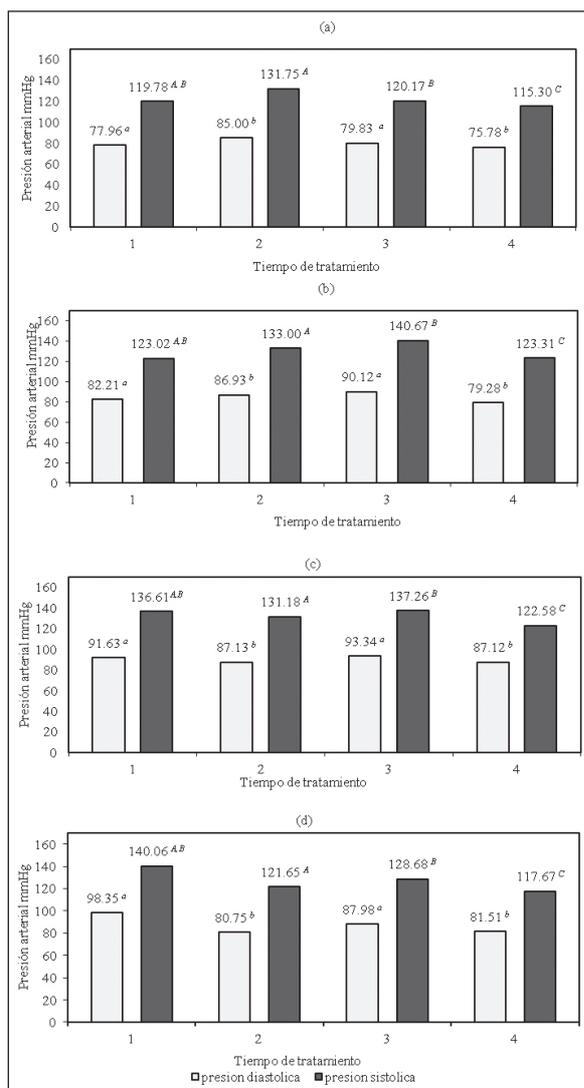


Fig. 6.—Evaluación del efecto antihipertensivo de distintas fracciones peptídicas (a) Captopril (b) Flavourzima® <1 KDa (c) Flavourzima® >1 KDa, (d) Pepsina-Pancreatina en ratas Wistar inducidas a hipertensión con L-NAME. ^{a-b} ó ^{A-B} Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. Los datos son la media de tres réplicas.

Alcalasa y provenientes de *Amaranthus mantegazzianus*, en los que a dosis de 2,4 g/kg de peso, no se observaron efectos hipotensores en ratas normotensas e incluso ningún efecto en ratas espontáneamente hipertensas.

Estos resultados son similares a los que presenta Wu³⁰, en un estudio realizado con péptidos obtenidos a partir de hidrolizados de frijol soya, en el que no se encontró un descenso significativo de la presión arterial en ratas normotensas, aun cuando se les alimento con una dosis de 1 g/kg de peso. Es interesante hacer notar que la ausencia de un efecto hipotensor sugiere que algunos de los péptidos provenientes de *Vigna unguiculata* no presentan un efecto adverso en la presión arterial de ratas normotensas.

Determinación del efecto antihipertensivo

Durante el procedimiento de inducción a la hipertensión que se realizó aplicando L-NAME en las condiciones definidas, se observó una elevación de la presión en todos los grupos experimentales después de 3 semanas de inducción. El porcentaje de elevación de la presión arterial sistólica en promedio fue del 17,64% mientras que la presión diastólica se elevó en un 16,21%.

Cuando se realizó la aplicación de los tratamientos con las fracciones seleccionadas, se observó una reducción de la presión sistólica que fue distinta en cada grupo experimental. Con la fracción >1 KDa obtenida por hidrólisis con Flavourzima®, la reducción de la presión arterial sistólica fue de 10,27% mientras que la de la presión diastólica fue de 4,92%, en ambos casos esta reducción fue superior a la que se obtuvo con Captopril que fue del 3,74% para la presión sistólica y de 2,79% para la presión diastólica. Con las fracción <1 KDa obtenida por hidrólisis con Flavourzima® la disminución de la presión diastólica fue de 3,56%, mayor que la encontrada con Captopril, en tanto que la fracción <1KDa obtenida con Pepsina-Pancreatina, disminuyó la presión sistólica en un 15,98% y la presión diastólica en un 17,12%, siendo este valor el mayor descenso registrado en este experimento (Fig. 6).

El Análisis de varianza indicó que existe efecto de la fracción administrada y del tiempo sobre la presión sistólica y diastólica. También se encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las medias de los tratamientos aplicados. El análisis de múltiples rangos (LSD con $P < 0,05$) señala que hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para la presión sistólica durante el tiempo del tratamiento (Tablas III y IV).

La elevación de la presión arterial por inducción con L-NAME ha sido ampliamente reportada en la literatura científica, por ejemplo, en un experimento realizado por Paulis *et al.*³¹ con ratas inducidas a hipertensión durante 5 semanas con L-NAME, en el que después de un tratamiento de 3 semanas se presentó una reducción del diámetro arterial en la arteria femoral, así como la aparición de hipertensión, una reducción del NO inducido por la acetilcolina así como por la disminución de la actividad de la NO sintetasa y aún más, se observó un incremento en la expresión de la ciclooxigenasa-2 en las aortas de las ratas tratadas con L-NAME, y del EDCF (endotelium-derived constricting factor).

Benter *et al.*³² igualmente realizaron la inducción a la hipertensión vía oral (80mg/l) por 4 semanas en ratas naturalmente hipertensas, la elevación de la presión arterial fue de 269 mmHg contra 196 mmHg de las ratas inducidas contra las ratas naturalmente hipertensas. De manera similar se puede observar que el tratamiento con L-NAME de 3 semanas de inducción empleado en este experimento, dio resultados positivos en cuanto al incremento estable de la presión arterial. Aun cuando la inducción se realizó en menor tiempo se puede considerar que presentó un efecto positivo, como ocurrió

en el trabajo de Biancardi *et al.* (2007)³³ en el que se realizó la inducción a la hipertensión en ratas normotensas, con resultados en períodos de 2 a 7 días.

Los tratamientos aplicados a las ratas inducidas a hipertensión mostraron un efecto antihipertensivo que se observó que está en relación al tiempo del tratamiento y al tamaño de fracción empleada. De manera que las fracciones de menor tamaño respondieron con mayor eficacia para disminuir la presión arterial, esto coincide con los resultados obtenidos por Kodera y Noriki (2007)³⁴ que evaluaron péptidos procedentes de hidrolizados de soya, y encontraron que los de menor peso molecular presentaban mayor efecto inhibitorio de la ECA-1, al igual que Aluko *et al.*³⁵ que al evaluar hidrolizados de chicharos obtuvo péptidos con tamaños moleculares < 1000Da con efecto inhibitorio, resultados similares se han reportados por otros autores (García-Tejedor *et al.*, 2015³⁶; Chen *et al.*, 2013³⁷)

En otro aspecto a considerar la respuesta antihipertensiva se ha visto relacionada con la dosis aplicada en el experimento, así en un trabajo realizado por Sato *et al.*¹⁷ en el que se aislaron 7 clases de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ECA-I) a partir de los hidrolizados de wakame (*Undaria pinnatifida*) y se encontró efecto antihipertensivo en cuatro de estos, usando una dosis de 1mg/kg de peso de las ratas. Aunque no determinaron la relación dosis-respuesta, se observó un efecto antihipertensivo en los grupos cuando se aplicaron dosis que iban desde 0,1 hasta 10 mg/kg de peso en ratas espontáneamente hipertensas. Esta concentración máxima evaluada fue similar a la utilizada en este trabajo, para dosificar las fracciones peptídicas a evaluar, presentó un efecto antihipertensivo mayor que el fármaco de control, el cual fue usado en esta misma concentración.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que las fracciones < 1KDa obtenidas con Flavourzima® y con Pepsina-Pancreatina, durante las evaluaciones *in vitro* presentaron porcentajes de inhibición hasta del 79% y del 62% respectivamente. En las pruebas *in vivo* se observaron efectos hipotensores similares a los que se pueden obtener con Captopril y específicamente en el caso de la presión sistólica en el experimento antihipertensivo, en el que la fracción < 1KDa obtenida con Pepsina-Pancreatina presentó una disminución de la presión arterial sistólica y diastólica mayor que el fármaco de control.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) a través del proyecto de Ciencia Básica 153012 “Actividad Biológica de fracciones peptídi-

cas derivadas de la hidrólisis enzimática de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y caupí (*Vigna unguiculata*)”. Se agradece el apoyo de CONACYT para el desarrollo de este proyecto como Becario No. 72780

Referencias

1. López Correa, Sonia María; Carranza Madrigal J. Artículo de revisión Hipertensión metabólica: una realidad en México. *Med Intena México* 2011;27(4):378-384.
2. Contra HS, Estrada LR, Chávez AG, Hernández H. Artemisa El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol* 2008; 1.
3. Lima, Marcos M; Nuccio, José Carmelo; Villalobos, Marjorie; Torres, Christopher; Balladares N. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA Y RIESGO CARDIO-METABOLICO. Revisión. *Rev Venez Endocrinol* 2010; 8(1):3-10.
4. Morales Olivas FJ, Estañ Yago L. Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina. *Hipertens Riesgo Vasc* 2010; 27(5):211-217. doi:10.1016/j.hipert.2009.09.002.
5. Sun-Waterhouse D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *Int J Food Sci Technol* 2011;46(5):899-920. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02499.x.
6. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Effect of digestion on bioavailability of peptides with biological activity. *Rev Chil Nutr* 2010;37(3):386-391.
7. Shahidi, Fereidoon; Zhong Y. Bioactive Peptides. *J Agric Food Chem* 2008;91(4):914-932.
8. Norris R, FitzGerald RJ. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* 2013 Vol 3. :350–61. doi:10.1039/c2fo10192k
9. Hen C, Al MJ. Preparation and Characterization of Protein Isolate from Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) 2004; 69(2).
10. Orji DEO and BO. Phytochemical composition and nutritional quality of *Glycine max* and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Am J Food Technol* 2007;2(6):512-520.
11. Rangel A, Saraiva K, Schwengber P, *et al.* Biological evaluation of a protein isolate from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Food Chem* 2004; 87(4):491-499. doi:10.1016/j.foodchem.2003.12.023
12. Torruco-Uco, J. G. Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus vulgaris*). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F 2009
13. Li, G.H., Le, G.W., Liu H. and Y. Shi, Y.H. Mung-bean Protein Hydrolysates Obtained with Alcalase Exhibit Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Food Science and Technology International* 2005 Vol. 11, No. 4, pp. 281-287. doi:10.1177/1082013205056781
14. Cho M.J., Unklesbay N., Hsieh F., Clarke A.D. Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52 (19): 5895-5901
15. Cian RE, Luggren P, Drago SR. Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *Int J Food Sci Nutr* 2011, 62(7):774-80. doi:10.3109/09637486.2011.582034.
16. Pechanova, O., Bernatova, I., Pelouch,V., Babal, P. L-NAME induced Protein remodeling and Fibrosis in the Rat Heart. *Physiol Res* 1999, 48:353-362
17. Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2002;50(21):6245–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358510>
18. Lilia Isabel Ochoa Muñoz, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural P y A. NORMA Oficial Mexicana NOM-

- 062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para La Producción, Cuidado Y Uso de Los Animales de Laboratorio.; 1999.
19. Montgomery, D. C. Diseño y análisis de experimentos. 2da Ed. Editorial Limusa S.A. de C.V. México, D.F. 2007, pp 21-141
 20. Tovar-Pérez EG, Guerrero-Legarreta I, Farrés-González a., Soriano-Santos J. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chem* 2009;116(2):437-444. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.062.
 21. Zhang C, Cao W, Hong P, Ji H, Qin X, He J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of *Acetes chinensis* peptic hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Int J Food Sci Technol* 2009;44(10):2042-2048. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02028.x.
 22. Rho SJ, Lee J-S, Chung Y II, Kim Y-W, Lee HG. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from fermented soybean extract. *Process Biochem* 2009 ; 44(4):490-493. doi:10.1016/j.procbio.2008.12.017.
 23. Jakubczyk A, Baraniak B. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Obtained after In Vitro Hydrolysis of Pea (*Pisum sativum* var. Bajka) *Globulins. Biomed Res Int* 2014.; 2014:1-8. doi:10.1155/2014/438459.
 24. Norris R, FitzGerald RJ. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*.2013, Vol 3.:350-61. doi:10.1039/c2fo10192k.
 25. Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2008;19(10):643-654. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.11.010.
 26. Li, G.-. H., Le, G.-. W., Shi, Y.-. H., & Shrestha, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research* 2004,24, 469-486.
 27. Roy F, Boye JI, Simpson BK. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. *Food Res Int* 2010; 43(2):432-442. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.002.
 28. Li, Guang-Hong; Qu M-R. 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 (supl 1):275-280.
 29. Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Añón MC. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem*.2011;126(3):878-884. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.065.
 30. 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(1):501-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11170618>
 31. Paulis L, Zicha J, Kunes J, et al. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res* 2008;31(4):793-803. doi:10.1291/hypres.31.793.
 32. Benter IF, Yousif MHM, Anim JT, Cojocel C, Diz DI, Angiotensin- DID. Angiotensin- (1 – 7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L -NAME. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2006;(290):684-691. doi:10.1152/ajpheart.00632.2005.
 33. Biancardi VC, Bergamaschi CT, Lopes OU, Campos RR. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Brazilian J Med Biol Res* 2007;40(3):401-408. doi:10.1590/S0100-879X2007000300016.
 34. Aluko, R.E., et al., Structural and functional characterization of yellow field pea seed (*Pisum sativum* L.) protein-derived antihypertensive peptides, *Food Research International* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.029>
 35. 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 4 Spontaneously Hypertensive Model Rats. *J Food Sci* 2006;71(3):C164-C173. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.tb15612.x.
 36. García-Tejedor, A., Sánchez-Rivera, L., Castelló-Ruiz, M., Reicio, I., Salom, J. B., & Manzanares, P. Novel antihypertensive lactoferrin-derived peptides produced by *Kluyveromyces marxianus*: Gastrointestinal stability profile and in vivo angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014; 62, 1609-1616.
 37. Chen, J., Liu, S., Ye, R., Cai, G., Ji, B., & Wu, Y. Angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. *Journal of Functional Foods* 2013; 5, 1684-1692.