

En esta Tesis Doctoral se ha caracterizado el mecanismo de acción de hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de la proteína láctea lactoferrina bovina. En concreto, se ha determinado su efecto sobre los principales componentes del sistema renina-angiotensina y del sistema endotelina. Para ello, se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales que incluyen en primer lugar ensayos *in vitro* para determinar los efectos inhibitorios sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina y sobre la enzima convertidora de endotelina. En segundo lugar, se realizaron ensayos funcionales *ex vivo* para comprobar en arterias aisladas los efectos vasoactivos de los péptidos e hidrolizados tanto sobre la actividad ECA y ECE como sobre los receptores para la angiotensina II (receptores AT₁) y para la endotelina-1 (receptores ET_A). Además, se han llevado a cabo ensayos *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas para estudiar los efectos sobre la presión arterial tras la administración oral aguda y crónica. En este último caso se han determinado los niveles circulantes de actividad renina, ECA, angiotensina II y aldosterona. Finalmente se ha evaluado el efecto de los hidrolizados en la presión arterial de ratas normotensas Wistar-Kyoto.

TESIS DOCTORAL

Tesis Doctoral
Ricardo Fernández Musoles

TESIS DOCTORAL

PÉPTIDOS DERIVADOS DE LACTOFERRINA BOVINA CONTRA LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL: INHIBICIÓN DE LOS SISTEMAS ANGIOTENSINA Y ENDOTELINA



Ricardo Fernández Musoles

Dirigida por:
Dra. Paloma Manzanares Mir
Dr. Juan B. Salom Sanvalero



2015



**INSTITUTO DE AGROQUÍMICA Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA LA FE**



Péptidos derivados de lactoferrina bovina contra la hipertensión
arterial: inhibición de los sistemas angiotensina y endotelina

Doctorando:

RICARDO FERNÁNDEZ MUSOLES

Tesis Doctoral dirigida por:

DRA. PALOMA MANZANARES MIR

DR. JUAN B. SALOM SANVALERO



Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos, Universidad de Valencia

Tutor de la Universidad de Valencia:

DRA. REYES BARBERÁ SAEZ

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la
Alimentación, Toxicología y Medicina Legal

Valencia, Octubre de 2015



La Dra. Paloma Manzanares Mir, Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Departamento de Biotecnología de Alimentos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), y el Dr. Juan B. Salom Sanvalero, Facultativo en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia:

CERTIFICAN: Que D. Ricardo Fernández Musoles, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su codirección el trabajo titulado: “PÉPTIDOS DERIVADOS DE LACTOFERRINA BOVINA CONTRA LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL: INHIBICIÓN DE LOS SISTEMAS ANGIOTENSINA Y ENDOTELINA”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado.

Valencia, 27 de Octubre de 2015

Dra. Paloma Manzanares Mir

Dr. Juan B. Salom Sanvalero

El trabajo que aquí se expone se ha llevado a cabo en el Departamento de Biotecnología de los Alimentos del IATA (CSIC) y en el Centro de Investigación del Hospital Universitario y Politécnico “La Fe”. Este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de formación de personal investigador (BES-2008-004472) asociada al proyecto AGL2007-64672 y a la participación en el proyecto AGL2010-21009, ambos convocados por el Ministerio de Ciencia e Innovación. Esta Tesis Doctoral se enmarca también dentro del proyecto Consolider Ingenio Fun-C-Food CSD2007-00063, y del proyecto RETICS-RD06/0026/2006 del Instituto de Salud Carlos III.

A mis padres y a Marta

“No todo lo que cuenta puede ser cuantificado,
y no todo lo que puede ser cuantificado cuenta”

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores Paloma Manzanares Mir y Joan Salom Sanvalero la oportunidad que me dieron confiando en mí para el desarrollo de este proyecto. Sobre todo agradecerles el enorme esfuerzo que han realizado en el tramo final de esta tesis para que llegara a buen término. Además de dos excelentes directores habéis sido dos magníficos compañeros, tanto en el laboratorio como en los momentos de desconexión, ha sido un placer trabajar con vosotros.

Un agradecimiento especial a Salvador Vallés, que aunque no ha dirigido este trabajo también apostó por mí. Salvador, se echa de menos tu punto de vista siempre pragmático, en contadas ocasiones en la vida se encuentra a una persona con la sinceridad que tú tienes. Gracias por todos tus consejos, me han ayudado mucho. ¿Recuerdas el cuadro que habías pintado y me regalaste el día de tu jubilación? Preside un lugar privilegiado en el salón de mi casa.

Sin salirme del laboratorio, quiero dar las gracias a mis compañeros Fernando, María, Aida y Encarna, aunque compartimos poco tiempo juntos habéis sido unos enormes compañeros. Gracias a Pedro, tu trabajo fue el predecesor de mi tesis, y muchas cosas de las que he empleado aquí las aprendí de ti. Gracias por tu guía y apoyo. Gracias también a Meri, por tu compañerismo en el laboratorio y por tu amistad, hemos compartido muchas cosas todos estos años, con gente como tú siempre es agradable ir a trabajar. Javier, muchísimas gracias por toda la ayuda que me has ofrecido, aparte de un gran profesional eres un magnífico amigo, las tardes de pasar datos a una hoja Excel no habrían sido lo mismo sin ti y sin el tío Rosendo amenizando de fondo, afortunadamente Meri tiene un espíritu musical ecléctico. Aurora, lo mismo que yo continué el trabajo de Pedro, tú has continuado el mío, espero

que te aporte una buena base para presentar una tesis brillante, seguro que lo haces estupendamente, no me cabe duda. Gracias por tu ayuda y por todos los momentos compartidos, te deseo mucha suerte.

Gracias a mis compañeras de laboratorio del Hospital La Fe. María, Chelo, Carmen, Sonia y Mikahela, estar con vosotras ha sido una experiencia muy grata, tanto en lo profesional como en lo personal, gracias por todo. Muchas gracias también a Germán, ha sido un placer conocer a alguien en este mundo científico que comparte el gusto por tocar música. Y gracias finalmente a Enrique por abrirme las puertas de su unidad con tanta amabilidad.

También quiero agradecer a todos los compañeros y amigos del IATA que han compartido este viaje conmigo. David, sabes que te aprecio, a ti, a Neus, y a tus dos hijos Adrián y a Marc, siempre me habéis abierto las puertas de vuestra casa y me he sentido muy a gusto, quedan pendientes unas bravas de esas que vosotros sabéis hacer. Quiero agradecer a Juan, Eli, María, Ali, Amparo, Bea, Enric, Juanan, Montse, Clara, Fany, Ana y Jordi por todos los momentos que hemos compartido, sois la clase de compañeros de trabajo, y sobre todo amigos, que hacen que ir a trabajar un lunes sea mucho más agradable, estoy muy agradecido de haberos conocido, cada uno de vosotros habéis aportado una cosa diferente en mi vida, y por eso me llevo un trozo de cada uno de vosotros conmigo. Me gustaría dedicaros unas palabras a cada uno de vosotros, pero los agradecimientos iban a ser más largos que la discusión y quedaría cuanto menos raro.

Agradecimientos especiales a dos personas a las que enmarcaría perfectamente en el párrafo anterior pero que no quiero dejar escapar la ocasión que me brinda la tesis para decirlo. Ruud, seguro que no necesitas el traductor castellano-holandés para entender estas palabras, has sido un

excelente compañero y mejor amigo, muchas gracias a ti y a Nanda por todo, sois unas de las mejores personas que he conocido durante estos años, queda pendiente haceros una visita por tierras del tulipán, ¡dankzij vriend!. Y Crys, no existen palabras para agradecer tu apoyo en los buenos pero sobre todo en los malos momentos, siempre has estado ahí, un billón de gracias. Espero que hayas seguido practicando con los patines, ¡en unos años vas a tener que enseñar a Alejandra!

Por último, y más importante, la familia. Gracias a mis padres por guiarme, apoyarme y darme los mejores consejos posibles. De cada uno de vosotros he heredado cosas como la pasión por la ciencia, la curiosidad, el no abandonar hasta conseguir lo que te propones, el tener personalidad propia y un sinnúmero de cosas que me llevo en las alforjas. Gracias por darme la formación necesaria para haber llegado hasta aquí, sin vosotros no hubiera sido posible. Os quiero.

Gracias a mi hermano Carlos y a Sumi. Aunque lejos, siempre estáis cerca. Al fin ahora podremos ir a Manchester a visitaros.

Quiero acordarme de mis cuatro abuelos, Juan, Ricardo, Lola y Lola. Tres de ellos ya no están aquí, los cuatro son responsables de como soy yo, y no tengo más que palabras de cariño. Os quiero.

Gracias a Victoria, a Paco, y por edad, a Iván, a Luis, a Laura y a Paula por ser una familia estupenda.

He dejado para el final a la persona más especial de mi vida, Marta. Tú mejor que nadie sabes lo que es pasar por este proceso. Infinitas gracias por tu apoyo, tu paciencia y tu amor. Gracias por llevarme de la mano al final de este camino. Gracias por compartir y hacer todos los días diferentes.

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se ha caracterizado el mecanismo de acción de hidrolizados y péptidos antihipertensivos derivados de la proteína láctea lactoferrina bovina (LF). En concreto, se ha determinado su efecto sobre los principales componentes del sistema renina-angiotensina (RAS) y del sistema endotelina. Para ello, se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales que incluyen en primer lugar ensayos *in vitro* para determinar los efectos inhibitorios sobre la actividad de la enzima convertora de angiotensina (ECA) y sobre la enzima convertora de endotelina (ECE). En segundo lugar, se realizaron ensayos funcionales *ex vivo* para comprobar en arterias aisladas los efectos vasoactivos de los péptidos e hidrolizados tanto sobre la actividad ECA y ECE como sobre los receptores para la angiotensina II, AT₁, y para la endotelina-1, ET_A. Además, se han llevado a cabo ensayos *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHRs) para estudiar los efectos sobre la presión arterial (PA) tras la administración oral aguda y crónica. En este último caso se han determinado los niveles circulantes de actividad renina y ECA, angiotensina II (ang-II) y aldosterona. Finalmente se ha evaluado el efecto de los hidrolizados en la presión arterial de ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY).

Se generaron hidrolizados de LF (HLF) utilizando la enzima pancreática pepsina y la proteasa de origen microbiano proteinasa K. Se evaluó el efecto sobre los componentes clave del RAS y del sistema endotelina de estos dos hidrolizados, junto con un HLF obtenido previamente con pepsina (pHLF) cuyo efecto antihipertensivo agudo en SHRs ya había sido descrito. Para poder abordar la implicación del sistema endotelina, en primer lugar se desarrolló un método *in vitro* para comprobar el efecto inhibitor sobre ECE. Este método se complementó con otro *ex vivo*, utilizando arterias aisladas de conejo, que permitió comprobar, en términos de vasoactividad, los efectos de los péptidos

tanto sobre la actividad ECE como sobre los receptores ET_A. La combinación de esta metodología con los ensayos *in vitro* y *ex vivo* de inhibición de ECA sugieren que el pHLF podría ejercer su efecto antihipertensivo como inhibidor dual de vasopeptidasas. Esto se ha evidenciado por su capacidad de inhibir *in vitro* las actividades ECA y ECE, y se ha confirmado por su efecto inhibidor *ex vivo* sobre la vasoconstricción ECA-dependiente inducida por angiotensina I, así como sobre la vasoconstricción ECE-dependiente inducida por proendotelina (big ET-1). Además, se evidenció el efecto inhibidor de este hidrolizado y de dos de sus péptidos mayoritarios (LIWKL y RPYL) sobre la vasoconstricción ECA-independiente inducida por ang-II, bloqueando los receptores AT₁. La inhibición *in vivo* de la ECA por parte del pHLF fue confirmada por la reducción de los niveles circulantes de actividad ECA, ang-II y aldosterona, así como el incremento compensatorio de actividad renina, tras la administración oral mantenida del hidrolizado en la dieta. Finalmente, el hidrolizado de LF obtenido con proteinasa K podría ejercer su efecto antihipertensivo como inhibidor de la vasopeptidasa ECE, como se ha evidenciado por su capacidad de inhibir *in vitro* la actividad ECE, y se ha confirmado por su efecto inhibidor *ex vivo* sobre la vasoconstricción ECE-dependiente inducida por big ET-1. Además, la caracterización de los péptidos mayoritarios de este hidrolizado ha permitido identificar las secuencias GILRPY y REPYFGY, con efecto inhibidor de ECE.

En conclusión, se ha demostrado que la proteólisis enzimática de LF es un método eficaz para generar hidrolizados con efectos antihipertensivos tras su administración oral, cuyos mecanismos de acción van más allá de la inhibición de la ECA.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Hipertensión arterial	3
1.1. La hipertensión, un problema sanitario	3
1.2. Epidemiología de la hipertensión	5
2. Regulación de la presión arterial	6
2.1. El sistema renina-angiotensina	6
2.2. El sistema endotelina	12
3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión	16
4. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias	17
4.1. Péptidos antihipertensivos derivados de lactoferrina	25
4.2. Otros mecanismos de acción de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias	34
OBJETIVOS	39
METODOLOGÍA	45
RESULTADOS	71
Artículo I. Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction	73
Resultados	85
Discusión	94
Artículo II. Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: Inhibition of angiotensin and endothelin-converting enzymes	107
Resultados	122
Discusión	122

Artículo III. <i>In vivo</i> angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats	141
Resultados	151
Discusión	160
Artículo IV. Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: angiotensin receptor blocking effect	171
Resultados	183
Discusión	191
DISCUSIÓN GENERAL	207
CONCLUSIONES	229
BIBLIOGRAFÍA	235
DIFUSIÓN DE RESULTADOS	259

LISTADO DE ABREVIATURAS POR ORDEN ALFABÉTICO

ADH: *antidiuretic hormone (hormona antidiurética)*

Ang-I: *angiotensina-I*

Ang-II: *angiotensina-II*

AT₁/AT₂: *receptor de angiotensina tipo 1/receptor de angiotensina tipo 2*

Big ET-1: *big endothelin-1 (proendotelina)*

CCDV: *canales de calcio dependientes de voltaje*

C-terminal: *carboxilo terminal*

ECA: *enzima convertora de angiotensina I*

ECE: *enzima convertora de endotelina*

eNOS: *endotelial nitric oxide synthase (óxido nítrico sintasa endotelial)*

ET-1/ET-2/ET-3: *endotelina-1/endotelina-2/endotelina-3*

ET_A/ET_B: *receptor de endotelina tipo A/receptor de endotelina tipo B*

IC₅₀: *concentración necesaria para inhibir en un 50%*

kDa: *kiloDaltons*

LF: *lactoferrina*

LfcinB/LfcinH: *lactoferricina bovina/Lactoferricina humana*

mmHg: *milímetros de mercurio*

Listado de abreviaturas

NEP: *neutral endopeptidase (endopeptidasa neutra)*

N-terminal: *amino terminal*

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

PACEI: *péptido inhibidor de la enzima convertora de angiotensina-I*

PAS: *presión arterial sistólica*

RAS: *renin-angiotensin system (sistema renina-angiotensina)*

SHR: *spontaneously hypertensive rat (rata espontáneamente hipertensa)*

VPI: *vasopeptidase inhibitor (inhibidor de las vasopeptidasas)*

Los aminoácidos se identifican con el nombre completo cuando aparecen de manera individual y con el código de una letra en las secuencias peptídicas.

INTRODUCCIÓN

1. Hipertensión arterial

1.1. La hipertensión, un problema sanitario

La presión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos arteriales al ser bombeada por el corazón. Una persona adulta y sana muestra valores de presión o tensión arterial en reposo de 120 mmHg cuando el corazón se contrae (presión sistólica), y de 80 mmHg cuando el corazón se relaja (presión diastólica). La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial sistémica por encima de determinados valores umbral. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera prehipertensión valores hasta 139 mmHg de presión sistólica/89 mmHg de presión diastólica, e hipertensión cuando los valores son iguales o mayores a 140/90 mmHg. A su vez, la hipertensión se clasifica en estadio I o grado leve (hasta 159 mmHg/99 mmHg) y estadio II (a partir de 160 mmHg/100 mmHg), con los grados moderada, severa y muy severa (WHO, 2013a).

Desde el punto de vista clínico, la hipertensión es el principal factor de riesgo desencadenante de enfermedades cardiovasculares a nivel mundial, y afecta tanto a hombres como a mujeres. Aunque la hipertensión afecta al 30-45% de la población adulta, una tercera parte de los afectados lo desconoce, porque la mayoría de los hipertensos no presentan síntoma alguno. Además, una de cada tres personas que se está tratando para regular la hipertensión no consigue mantener su presión arterial por debajo del límite de 140/90 mmHg, tal y como se refleja en la Figura 1.

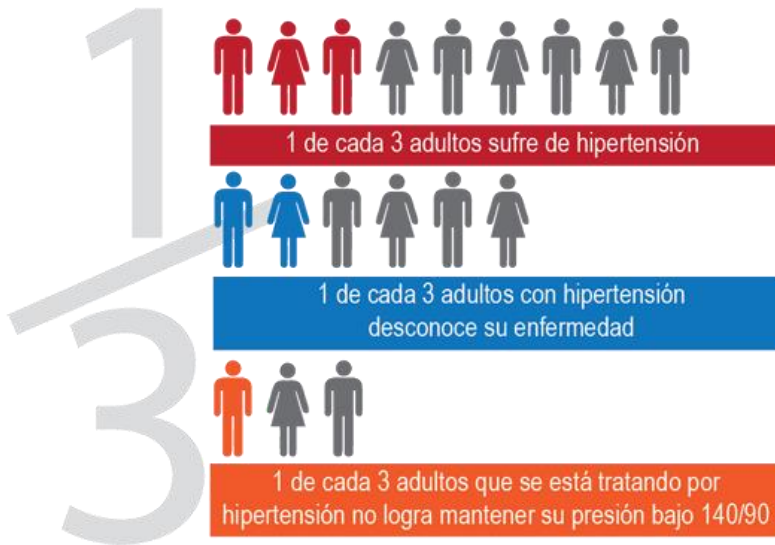


Figura 1. Situación mundial de la hipertensión (PAHO, 2013).

En ocasiones, la hipertensión causa síntomas y signos agudos como cefalea, dificultad respiratoria, vértigos, dolor torácico, palpitaciones del corazón y hemorragias nasales. A largo plazo, la hipertensión provoca daño en el corazón y los vasos sanguíneos de órganos vitales como el cerebro y los riñones. Si no se controla, la hipertensión puede provocar infarto de miocardio, hipertrofia del corazón e insuficiencia cardiaca. Los vasos sanguíneos pueden desarrollar aneurismas y zonas débiles que los hacen más susceptibles de obstruirse y romperse. La hipertensión puede ocasionar que la sangre se extravase al cerebro y provocar un accidente cerebrovascular. Finalmente, la hipertensión también puede provocar insuficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo. Las consecuencias de la hipertensión para la salud se pueden agravar por otros factores como el consumo de tabaco, una

dieta poco saludable, el abuso del alcohol, la inactividad física y la exposición a un estrés permanente, así como la obesidad, el colesterol alto y la diabetes mellitus (Mancia y cols., 2013).

1.2. Epidemiología de la hipertensión

Según datos aportados por la OMS en marzo de 2013, a nivel mundial, la hipertensión es responsable de la mitad de todas las muertes por accidente cerebrovascular o cardiopatía. Se considera que fue la causa directa de 7,5 millones de muertes en 2004, lo que representó aproximadamente el 13% de la mortalidad. En la mayoría de los países desarrollados, el diagnóstico y tratamiento generalizado de los hipertensos con medicamentos de bajo coste ha supuesto una extraordinaria reducción de la tensión arterial media en todas las poblaciones, contribuyendo al descenso de la mortalidad atribuida a enfermedades cardíacas. Por ejemplo, en 1980, casi un 40% de los adultos de la Región de Europa de la OMS y un 31% de los adultos de la Región de las Américas padecían hipertensión. En 2008 la cifra había caído a menos del 30% y el 23%, respectivamente (WHO, 2013b).

En España, en el año 2008, según el informe “Estadísticas sanitarias mundiales de 2012” elaborado por la OMS, el 27.7% de los hombres y el 18.8% de las mujeres mayores de 24 años padecían hipertensión (WHO, 2012). Además, tal y como refleja el último informe oficial de causas de muerte del año 2012, elaborado en 2014 por el Instituto Nacional de Estadística, las enfermedades del sistema circulatorio, aquellas en donde influye de manera relevante la hipertensión arterial, ocuparon el primer lugar, siendo responsables del 30.3% de las muertes totales producidas (INE, 2014).

2. Regulación de la presión arterial

La regulación de la presión arterial es compleja, interviniendo diversos sistemas de control en múltiples localizaciones sistémicas que están interrelacionados entre sí. Por una parte está el control a corto plazo, muy rápido y llevado a cabo por el sistema nervioso autónomo, actuando sobre el gasto cardiaco y la resistencia periférica. Por otro lado, la regulación a medio y largo plazo de la presión arterial es llevada a cabo por el sistema de control renal de los líquidos corporales mediante mecanismos hormonales de los que forman parte el sistema renina-angiotensina (RAS), el sistema quinina-callicreína, el sistema de la endopeptidasa neutra (NEP), y el sistema endotelina (ET) (FitzGerald y cols., 2004). Estos sistemas generan diversos péptidos vasoreguladores que, de forma colectiva y a través de su unión a receptores específicos localizados en diferentes tejidos, modulan la presión, los fluidos y el balance de electrolitos. Los principales componentes de estos sistemas son las dianas para los fármacos antihipertensivos y también para los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias. En este contexto, destacan el RAS y el sistema ET, que van a ser explicados con mayor profundidad a continuación.

2.1. El sistema renina-angiotensina

El RAS es un regulador de la función cardiovascular y renal. Además del RAS sistémico, muchos tejidos del cuerpo, incluyendo el cerebro, poseen sus propios RAS locales (Paul y cols., 2006).

El funcionamiento del RAS, que se esquematiza en la Figura 2, es el siguiente: cuando la presión arterial disminuye, se libera al torrente sanguíneo la renina, una proteasa sintetizada en el riñón. En los vasos sanguíneos, la renina actúa sobre el angiotensinógeno, péptido de 14 aminoácidos sintetizado en el hígado, liberando un decapeptido inactivo, la angiotensina I (ang-I) de secuencia DNVYIHPFHL. A continuación, se escinde el dipéptido carboxilo terminal (C-terminal) de la ang-I por la acción de la enzima convertora de la angiotensina I (ECA) formándose el potente octapéptido vasopresor angiotensina II (ang-II), DNVYIHPF, que permanece en la sangre hasta ser inactivada por un conjunto de enzimas denominadas angiotensinasas (Carey y Siragy, 2003a).

La ang-II actúa en varios tejidos mediante la unión selectiva a dos subtipos de receptores acoplados a proteína G: receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁) y tipo 2 (AT₂) (Brede y Hein, 2001, Paul y cols., 2006). La mayor parte de las acciones atribuidas a ang-II en la regulación de la presión arterial y el volumen sanguíneo, así como el balance corporal de fluidos y electrolitos, están mediadas por el receptor AT₁ (Levy, 2004), mientras que el receptor AT₂ parece tener un papel funcional en el desarrollo (Steckelings y cols., 2005). Se ha sugerido que en la etapa adulta las acciones mediadas por el receptor AT₂ contrarrestan los efectos a corto y largo plazo del receptor AT₁, como la vasoconstricción y la proliferación celular (Stoll y cols., 1995). Actualmente, se están aportando más evidencias sobre el papel que juega el receptor AT₂ en la regulación del crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y regeneración de tejidos nerviosos (Steckelings y cols., 2005).

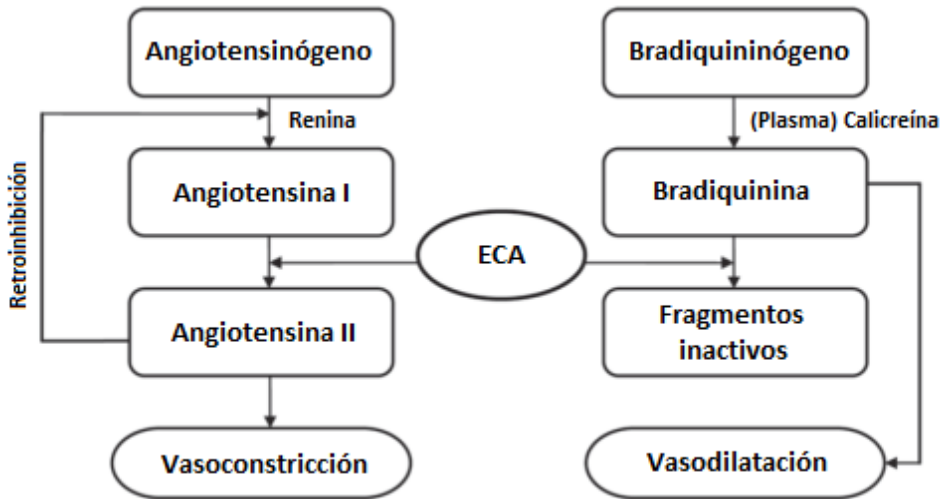


Figura 2. Representación del RAS y del sistema quinina-caliceína donde se observa su interconexión por la acción de la ECA. Adaptado de (Madureira y cols., 2010).

Durante su permanencia en la sangre, la ang-II provoca una serie de efectos que elevan la presión arterial:

a) La ang-II se une a los receptores AT_1 situados en el músculo liso vascular, produciéndose la contracción de las arteriolas, aumentando la resistencia periférica total y la presión arterial. Este efecto se produce durante los segundos posteriores a su síntesis.

b) La unión de la ang-II a los receptores situados en la corteza suprarrenal estimula la liberación de aldosterona. La aldosterona provoca un aumento de la reabsorción de sal y agua por parte de los túbulos renales. Esta disminución de la excreción de sal y agua aumenta el volumen de líquido plasmático, provocando el aumento de la presión arterial a lo largo de un período cuya duración puede oscilar entre horas y días.

c) La ang-II actúa también a nivel del sistema nervioso central. Desencadena el mecanismo de la sed en el hipotálamo a través de la estimulación de la secreción de la hormona antidiurética (ADH), estimulándose a su vez el “apetito” por la sal. La mayor ingesta de agua y sal aumentan el volumen plasmático restableciéndose los valores de presión arterial.

d) Por último, la ang-II actúa sobre el sistema nervioso autónomo, de manera que la interacción de ang-II con su receptor en las neuronas noradrenérgicas aumenta la frecuencia cardíaca y la resistencia periférica provocando un aumento de la presión arterial.

Además de la formación de ang-II, la ECA posee una segunda función importante para la regulación de la presión arterial hidrolizando la bradiquinina, principal péptido vasodilatador del sistema quinina-caliceína (Figura 2). Por lo tanto, al aumento de la presión arterial contribuyen la generación de ang-II que es vasopresora y la hidrólisis de la bradiquinina que es vasodilatadora.

ECA, la enzima clave del RAS, también conocida como peptidil-dipeptidasa A (EC 3.4.15.1), forma parte de la familia M2 de las metalopeptidasas de zinc. Tiene dos dominios (carboxilo y amino terminal), cada uno con un centro catalítico, con similar pero distinta especificidad de sustrato. ECA cataliza la hidrólisis de dipéptidos del extremo C-terminal de una amplia gama de oligopéptidos, entre los que se encuentran la ang-I y la bradiquinina (Acharya y cols., 2003). Estructuralmente es una glicoproteína formada por una sola cadena polipeptídica con un peso molecular entre 130 y 150 kDa (Das y Soffer, 1975, Lanzillo y Fanburg, 1976, Soffer, 1976). Su estructura tridimensional se muestra en la Figura 3.

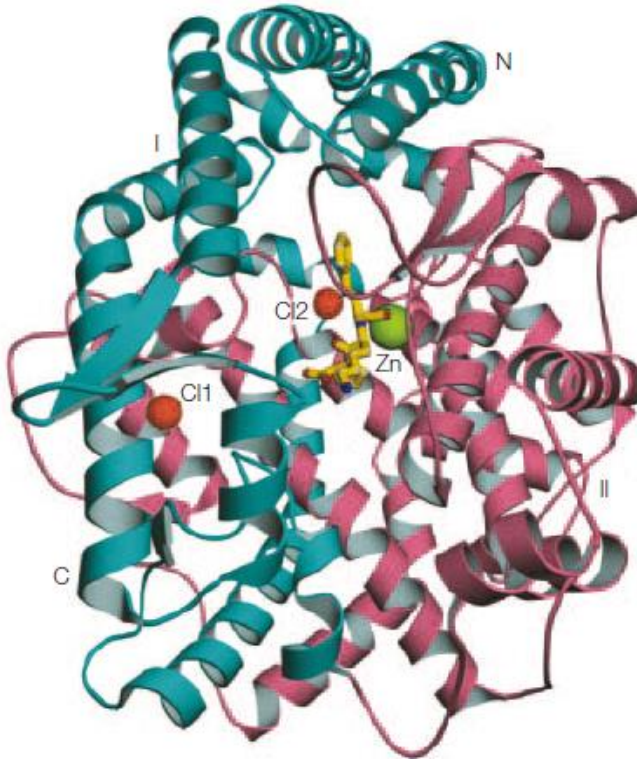


Figura 3. Estructura tridimensional de ECA. Subdominios I y II coloreados en cian y magenta respectivamente. Las esferas rojas representan enlaces iónicos cloruro. La esfera verde representa el ion zinc del centro catalítico. En amarillo se muestra un ejemplo de cómo se posicionaría lisinopril, un fármaco inhibidor de ECA, interactuando con esta enzima (Acharya y cols., 2003).

Los sustratos peptídicos de la ECA se unen al centro activo de la enzima a través del tripéptido C-terminal. En el centro activo de ECA, Figura 4, destacan los subsitios S1, S1' y S2' donde específicamente interaccionan las cadenas laterales de los aminoácidos. El subsitio S1 es un bolsillo hidrofóbico con una buena afinidad por las cadenas aromáticas como las de la fenilalanina, el

subsitio S1' no interacciona de manera efectiva con la prolina, mientras que el subsitio S2' no acepta las cadenas ácidas de los aminoácidos dicarboxílicos. Además, en el centro activo de la enzima existe un grupo cargado positivamente que forma un enlace iónico con el grupo C-terminal del sustrato cargado negativamente lo que provoca el alineamiento correcto del tripéptido C-terminal del sustrato con los subsitios. El ion Zn^{2+} , fuertemente unido a ECA, se localiza entre los subsitios S1 y S1' y participa en la hidrólisis del enlace peptídico entre los residuos antepenúltimo y penúltimo del sustrato, liberándose el dipéptido C-terminal (Cushman y cols., 1981, Ondetti y Cushman, 1982).

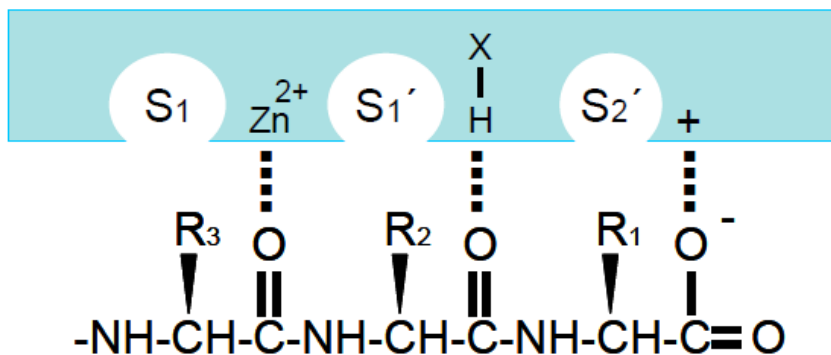


Figura 4. Detalle del centro catalítico de ECA y de su interacción con el sustrato.

Se ha identificado un homólogo de ECA, llamado ECA2. Se expresa predominantemente en células endoteliales vasculares del riñón y corazón. A diferencia de ECA, ECA2 funciona como una carboxipeptidasa, eliminando un único residuo aminoacídico del extremo C-terminal de la ang-I, generando angiotensina (1-9), y de la ang-II, generando angiotensina (1-7). Se cree que

ECA2 podría modular el RAS y por tanto afectar a la regulación de la presión arterial. Además, se ha observado que ECA2 es capaz de hidrolizar otros sustratos peptídicos además de ang-I y ang-II. Sin embargo, el rol que juega ECA2 *in vivo* en el sistema cardiovascular y en el RAS todavía se desconoce (Crackower y cols., 2002).

2.2. El sistema endotelina

La familia endotelina (ET) consiste en tres péptidos relacionados, de nombre ET-1, ET-2 y ET-3, cada uno formado por 21 aminoácidos y codificados por diferentes genes. ET-1 es la isoforma mayoritaria producida en el sistema cardiovascular, ET-2 es producida principalmente en el riñón e intestino, mientras que ET-3 se encuentra predominantemente en el sistema nervioso central. Los roles de ET-2 y ET-3, excepto en el desarrollo embrionario, son poco conocidos (Schiffrin, 2005).

ET-1 se genera en respuesta a un amplio rango de estímulos, los cuales varían según el tejido (Haynes y Webb, 1998). En los vasos sanguíneos, se sintetiza en el citosol de las células endoteliales y requiere ser procesada antes de alcanzar la forma madura activa, para secretarse al exterior celular donde ejerce su acción. El paso final en la ruta de ET-1, como se representa en la Figura 5, implica el corte del péptido de 38 aminoácidos llamado big-ET-1 por la enzima convertora de endotelina (ECE), una metaloproteinasa altamente específica unida a membrana.

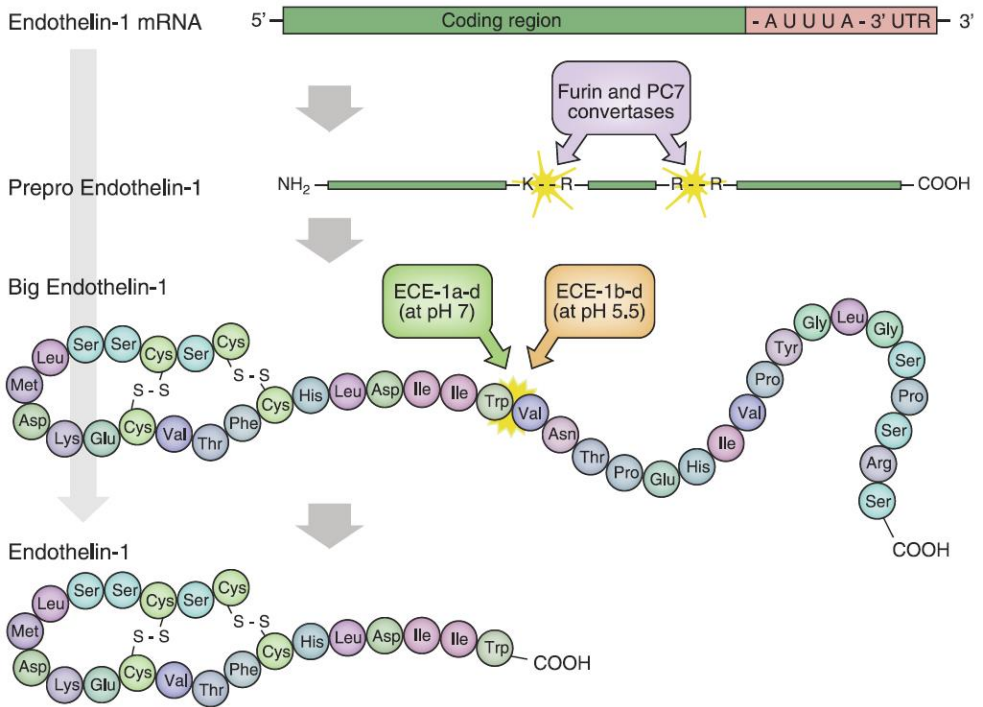


Figura 5. Ruta de biosíntesis de la ET-1. Adaptado de (Kohan y cols., 2011).

ET-1 ejerce su acción a través de su unión a receptores específicos acoplados a proteínas G, llamados receptores tipo A (ET_A) y tipo B (ET_B). Ambos muestran características moleculares y funciones diferentes según su localización. La unión de ET-1 a sus receptores resulta en la activación de la ruta de la fosfolipasa C, iniciándose una cascada de eventos intracelulares, con efectos a corto y largo plazo, como un rápido incremento del calcio intracelular, activación de la proteína quinasa C, y mecanismos de señalización nuclear (Attinà y cols., 2005).

El receptor ET_A se expresa principalmente en las células del músculo liso vascular y los miocitos cardíacos. Su interacción con ET-1 resulta en

vasoconstricción y proliferación celular. Por el contrario, el receptor ET_B se expresa mayoritariamente en las células endoteliales vasculares, y su activación resulta en vasodilatación inducida por óxido nítrico y liberación de prostaciclina. Este receptor está también presente, en mucha menos cantidad, en las células del músculo liso vascular, donde su activación puede contribuir a la vasoconstricción. Las acciones de ET-1 resultan en una compleja modulación del tono vasomotor, así como proliferación y diferenciación celular, dirigidas por una combinación de los efectos desencadenados por la actuación de las vías activadas a través de los receptores ET_A y ET_B (Clozel y Flores, 2006).

ECE es una metaloproteasa tipo II de membrana, perteneciente a la familia de las endopeptidasas, con una cola N-terminal en el interior citosólico y un dominio extracelular C-terminal situado sobre la membrana plasmática. Su estructura dimérica se encuentra covalentemente unida a través de residuos de cisteína, Figura 6. La región C-terminal contiene el centro catalítico y un sitio de unión a zinc (Schulz y cols., 2009).

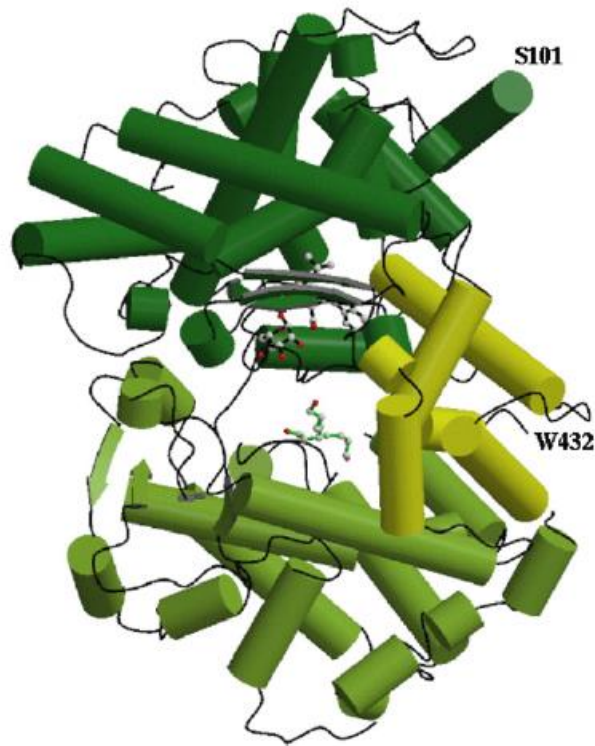


Figura 6. Estructura tridimensional de ECE-1 humana. El dominio catalítico C-terminal se muestra en verde oscuro, el dominio N-terminal se muestra en verde claro, en la parte derecha. El centro de unión se muestra en verde oliva, parte inferior. Las flechas representan láminas β y los cilindros representan α -hélices. Se muestra un ejemplo de la interacción de esta enzima con un ligando, esquematizado con esferas rojas y grises y bastones verdes claro, en el centro de la imagen (Schulz y cols., 2009).

ECE-1 se expresa en el endotelio así como en células no vasculares de muchos tejidos incluyendo el cerebro y tejidos neuroendocrinos. Su actividad consiste en el corte proteolítico de su sustrato específico big ET-1 entre los aminoácidos triptófano²¹ y valina²² del extremo C-terminal, liberándose el péptido ET-1 (Gray y Webb, 1996), ver Figura 5.

Se han descrito dos genes que codifican dos enzimas conversores de endotelina, ECE-1 y ECE-2. ECE-1 tiene una distribución tisular más amplia y se encuentra expresada siempre en mayor concentración que ECE-2. ECE-1, de la cual se han descrito 4 isoformas, es la enzima que juega un rol central en el sistema endotelina para la regulación de la presión arterial (Gray y Webb, 1996).

3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión

Entre la gran variedad de fármacos antihipertensivos destacan los diuréticos, bloqueadores de los α - y β -adrenoreceptores, bloqueadores de los canales de calcio, agentes que actúan a nivel del sistema nervioso central, y aquellos que tienen como diana el RAS y el sistema endotelina (Perez y Musini, 2008). Su empleo puede ser individual (estrategias de acción simple) o en combinación para lograr un mayor eficacia (estrategias de acción múltiple).

Por lo que se refiere al RAS (ver Figura 2), diferentes fármacos antihipertensivos tienen como diana distintos puntos de la cascada (Williams, 2009). La renina es la enzima que cataliza el primer paso del RAS, por lo que su inhibición podría suponer un descenso de los niveles circulantes de ang-I. En la actualidad, el aliskiren es el único fármaco aprobado para uso clínico que inhiba la renina (Friedrich y Schmieder, 2013). El siguiente paso en la cascada, se encuentra mediado por ECA, y su inhibición resultaría en un descenso de los niveles del vasoconstrictor ang-II y un aumento de la concentración de bradiquinina, vasodilatadora. El primer inhibidor de ECA de uso clínico fue el captopril (Ondetti y Cushman, 1977), un ejemplo clásico de diseño racional de fármacos. Al captopril le han seguido otros inhibidores que han sido aprobados para su uso clínico y que son variaciones diseñadas para mejorar la

interacción con el centro activo de la ECA (Acharya y cols., 2003). Más abajo en la cascada RAS, los antagonistas de los receptores AT₁ bloquean la respuesta desencadenada por las proteínas G acopladas a dichos receptores, impidiendo la vasoconstricción asociada. El primer antagonista específico desarrollado fue el losartán, a partir del cual se han desarrollado nuevos fármacos como el valsartán o el telmisartán (Kim y cols., 2012).

Respecto al sistema ET, los esfuerzos en la búsqueda de inhibidores efectivos han ido encaminados hacia la inhibición de ECE y el bloqueo de los receptores ET (ver Figura 5). La inhibición de ECE bloquea la conversión de Big ET-1 en ET-1 y esto se asocia a respuestas de vasodilatación e hipotensión (Haynes y Webb, 1994). Aunque a nivel clínico se sigue investigando el desarrollo de fármacos, a nivel de investigación preclínica sí se han estado utilizando inhibidores de ECE, como por ejemplo el fosforamidón o el CGS 35066 (Fukuroda y cols., 1990, De Lombaert y cols., 2000). Por lo que se refiere a los antagonistas, a nivel clínico se ha desarrollado el bosentán (Schiffrin, 2005), aunque su aplicación sólo ha sido aprobado para el tratamiento de la hipertensión pulmonar. A nivel preclínico se han descrito el BQ123, antagonista específico de los receptores ET_A, y BQ788, antagonista específico de los receptores ET_B (Ihara y cols., 1992, Ishikawa y cols., 1994).

4. Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias

Las proteínas son uno de los componentes principales de la dieta y, al ser digeridas en el tracto gastrointestinal, se hidrolizan en aminoácidos libres y una gran cantidad de péptidos, algunos de los cuales son absorbidos y transportados por el torrente circulatorio. Se ha descrito que algunos de esos

péptidos derivados de los alimentos comparten estructuras moleculares con los péptidos endógenos, lo cual podría permitir a los péptidos alimentarios interactuar con los receptores del organismo, tal y como ocurre con los péptidos opiáceos, o inhibir ciertas enzimas reguladoras. A estos péptidos, generalmente de pequeño tamaño (entre 2 y 15 residuos de aminoácidos) se les conoce como péptidos bioactivos y son foco de gran interés científico debido a su variedad y multifuncionalidad (Figura 7). Entre ellos, los péptidos antihipertensivos son indudablemente el grupo del cual se encuentra más información disponible y cuya caracterización y demostración de su efecto en estudios clínicos ha llegado más lejos (Martínez-Maqueda y cols., 2012, Bejjani y Wu, 2013, Hernández-Ledesma y cols., 2014, Balti y cols., 2015, Ngo y cols., 2015, Puchalska y cols., 2015).

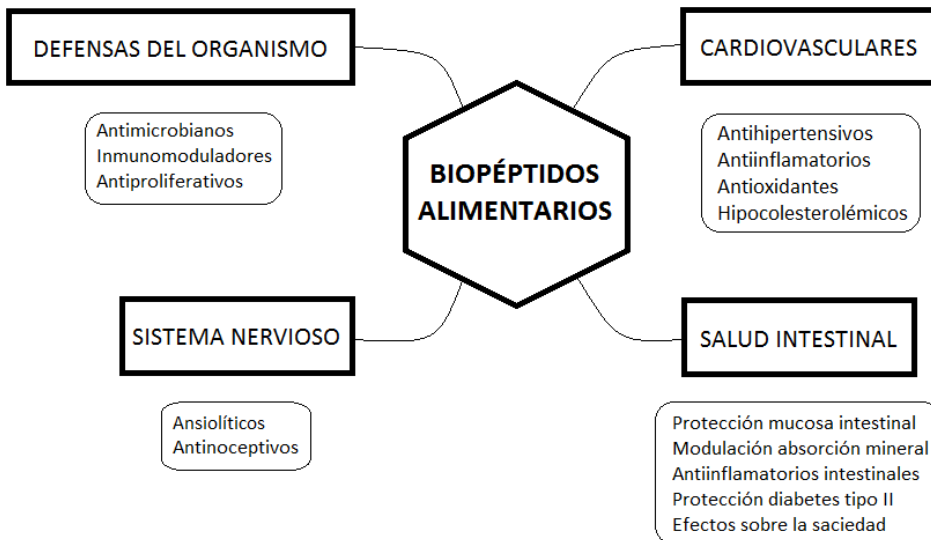


Figura 7. Efectos biológicos beneficiosos producidos por péptidos de origen alimentario. Basado en (Hernández-Ledesma y cols., 2014).

En el contexto de las proteínas alimentarias, las lácteas han demostrado ser fuente de numerosos péptidos antihipertensivos. Diversos estudios sugieren que el consumo de leche y productos lácteos está inversamente relacionado con el riesgo de padecer hipertensión (Chrysant y Chrysant, 2013, Dugan y Fernandez, 2014, Prentice, 2014). La leche es rica en minerales (como el calcio y el potasio, entre otros) que son capaces de reducir la presión sanguínea (van Mierlo y cols., 2006). Pero además en su composición existen otros elementos, como las proteínas y sus péptidos derivados, los cuales también han sido relacionadas con el efecto antihipertensivo (Martinez-Maqueda y cols., 2012, McGregor y Poppitt, 2013, Hernández-Ledesma y cols., 2014). Estos péptidos podrían interaccionar con los principales componentes de los sistemas de regulación de la presión arterial, como el RAS, el sistema quinina-calicroína, y los sistemas NEP y ET. Sin embargo, en la actualidad ECA es la diana principal de los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas.

La caracterización de los péptidos antihipertensivos incluye como estrategia más común ensayos de inhibición *in vitro* de la ECA y experimentos *in vivo* con animales. Los primeros miden la conversión enzimática de un sustrato apropiado en presencia y ausencia de péptido, y la potencia inhibitoria se expresa con el valor de IC_{50} , que se define como la concentración de péptido necesaria para inhibir la actividad ECA en un 50%. Para ello se han descrito métodos basados en la detección espectrofotométrica o fluorimétrica, y también ensayos cromatográficos (Cushman y Cheung, 1971, Vermeirssen y cols., 2002, Wu y cols., 2002, Li y cols., 2005, Sentandreu y Toldra, 2006). Para los experimentos *in vivo* se utilizan ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que constituyen un modelo animal científicamente aceptado para estudiar la hipertensión (FitzGerald y cols., 2004). Estos estudios incluyen administración aguda y crónica de los péptidos antihipertensivos, y en algunos casos se evalúa

también el efecto de los péptidos en la presión arterial de ratas normotensas Wistar-Kyoto (WKY). Además, los ensayos funcionales *ex vivo*, empleando arterias aisladas, permiten conocer los efectos vasoactivos de los péptidos (Centeno y cols., 2006). Finalmente, los estudios clínicos deben demostrar la eficacia de los péptidos antihipertensivos estableciéndose las dosis adecuadas.

Los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas son producidos principalmente mediante fermentación con bacterias ácido lácticas (BAL) o mediante hidrólisis enzimática (Hernández-Ledesma y cols., 2014). Ambas estrategias han permitido aislar secuencias con efectos antihipertensivos tanto en animales de experimentación como en ensayos clínicos. La primera aproximación se basa en la capacidad del sistema proteolítico de las BAL para hidrolizar las proteínas, principalmente las caseínas, durante la producción de productos lácteos como leches fermentadas o quesos. De esta manera se originan péptidos y aminoácidos que serán utilizados como fuente de nitrógeno para el crecimiento bacteriano (Juillard y cols., 1998). Diferentes especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, entre otros, son capaces de liberar péptidos antihipertensivos tal y como se recoge en la Tabla 1. Por lo que se refiere a la hidrólisis enzimática, se emplean enzimas implicadas en la digestión gastrointestinal como la pepsina gástrica o la tripsina pancreática, y también enzimas de origen vegetal y microbiano. Esta estrategia se ha aplicado tanto a caseínas como a las proteínas del suero. Algunos ejemplos de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas lácteas aislados a partir de hidrolizados enzimáticos se presentan en la Tabla 1. En general, hay una falta de correlación entre la potencia inhibitoria *in vitro* de ECA y el efecto antihipertensivo *in vivo*. Este hecho se ha relacionado fundamentalmente con la biodisponibilidad de los péptidos, que tras su

administración oral suele ser bastante limitada. Por el contrario, también debe tenerse en cuenta que la degradación de los péptidos puede originar secuencias peptídicas con mayor potencia inhibitoria de la ECA y mayor efecto antihipertensivo (FitzGerald y cols., 2004, Vermeirssen y cols., 2004b). Asimismo, cada vez hay más evidencias que apuntan a la posibilidad de que el efecto *in vivo* de los péptidos antihipertensivos no sólo se limite a la inhibición de la ECA (Hernández-Ledesma y cols., 2011, Martínez-Maqueda y cols., 2012).

Tabla 1. Procedimientos de obtención de péptidos antihipertensivos

Procedimiento de obtención	Enzima/microorganismo	Fragmento proteico de origen	Secuencia	IC ₅₀ (μM)	Dosis (mg/kg)	PSS (mmHg)	Referencia
Hidrólisis	Tripsina	α _{s1} -CN f(23-34)	FFVAPFPGVFGK	1.5	100.0	-34.0	(Karaki y cols., 1990)
		α _{s1} -CN f(194-199)	TTMPLW	17.4	100.0	-13.6	
		β-CN f(177-193)	AVPYPQR	15.7	100.0	-10.0	
		CMP f(106-112)	MAIPPKK	727.0	10.0	-28.0	
	Pepsina	α _{s1} -CN f(90-94)	RYLGY	0.7	5.0	-25.0	(Contreras y cols., 2009)
		α _{s1} -CN f(143-149)	AYFYPEL	6.6	5.0	-20.0	
		α _{s2} -CN f(89-95)	YQKFPQY	20.1	5.0	-15.0	
	Enzimas gástricas y pancreáticas Pepsina, quimotripsina y tripsina	α-La f(50-53)	YGLF	260.0	0,1	-23.4	(Nurminen y cols., 2000)
		κ-CN f(22-24)	IAK	15.7	4.0	-20.7	(Miguel y cols., 2010)
			κ-CN f(61-66)	YAKPVA	14300.0	6.0	
κ-CN f(76-86)			WQVLPNAVPAK	10100.0	7.0	-18.4	
κ-CN f(98-105)			HPHPHSF	28900.0	10	-15.7	
Proteinasa K		β-CN f(59-61)	VYP	288.0	8.0	-21.0	(Abubakar y cols., 1998)
		β-CN f(59-64)	VYPPFG	221.0	8.0	-22.0	
	β-CN f(80-90)	TPVVVPPFLQP	749.0	8.0	-8.0		
	β-Lg f(78-80)	IPA	141.0	8.0	-31.0		
	BSA f(221-222)	FP	315.0	8.0	-27.0		

(Continúa en página siguiente)

Procedimiento de obtención	Enzima/ microorganismo	Fragmento proteico de origen	Secuencia	IC ₅₀ (μM)	Dosis (mg/kg)	PSS (mmHg)	Referencia
	Proteinasas de <i>L. helveticus</i> CP790	α _{s1} -CN f(104-109)	YKVPQL	22.0	2.0	-13.0	(Maeno y cols., 1996)
		α _{s2} -CN f(189-192)	AMPKPW	580.0	2.0	-5.0	
		α _{s2} -CN f(190-197)	MKPWIQPK	300.0	2.0	-3.0	(Maeno y cols., 1996)
		α _{s2} -CN f(198-202)	TKVIP	400.0	2.0	-9.0	
		β-CN f(140-143)	LQSW	500.0	2.0	-2.0	
		β-CN f(169-174)	KVLPVP	5.0	2.0	-32,2	
		β-CN f(169-175)	KVLPVPQ	1000.0	2.0	-31,5	
	Termolisina	β-Lg f(58-61)	LQKW	3.5	10.0	-18,1	(Hernandez-Ledesma y cols., 2007)
		β-Lg f(103-105)	LLF	82.4	10.0	-29.0	
	Proteasa neutra AS1.398	κ-CN f(15-18); κ-CN f(25-30)	DERF; RYPSYG	37.1;	300,0 ^a	n.d. ^a	(Jiang y cols., 2010)
	Flavourzyme + <i>S. thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i>			72.8			
	Prozyme 6 y mezcla de bacterias acidolácticas	κ-CN f(58-61)	YPYY	90.9	3,4	-15,9	(Tsai y cols., 2008)
		α _{s1} -CN f(162-164) o β-Lg f(17-19)	GVW; GTW	240.0; 464.0	3,3	-22.0	(Chen y cols., 2007)

(Continúa en página siguiente)

Procedimiento de obtención	Enzima/microorganismo	Fragmento proteico de origen	Secuencia peptídica	IC ₅₀ (μM)	Dosis (mg/kg)	PSS (mmHg)	Referencia
Fermentación	<i>L. helveticus</i> CPN4	α _{s1} -CN f(146-147)	YP	720.0	1.0	-27.4	(Yamamoto y cols., 1999)
	<i>L. helveticus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	β-CN f(74-76)	IPP	5.0	0,3	-28,3	(Nakamura y cols., 1995a, Nakamura y cols., 1995b)
		β-CN f(84-86)	VPP	9.0	0,6	-32,1	
	<i>E. faecalis</i>	β-CN f(58-76)	LVYFPFGPIPNQLPQ	5.3	6.0	-14,9	(Miguel y cols., 2006, Quiros y cols., 2007, Miguel y cols., 2010)
		β-CN f(133-138)	LHLPLP	5.4	3.0	-25,3	
		β-CN f(133-139)	LHLPLPL	432.7	10.0	-7,7	
		β-CN f(134-138)	HLPLP	21600.0	7.0	-23,5	
		β-CN f(197-206)	VLGPVRGPFP	137.0	10.0	-16,2	
		β-CN f(201-209)	VRGPFPIIV	630.0	10.0	-16,1	
	Kefir de cabra	β-CN f(58-68)	LVYPTFGPIPN	27900.0	10.0	-28.0	(Miguel y cols., 2010)
	Queso Manchego	α _{s1} -CN f(102-109)	KKYNVPQL	77100.0	10.0	-11,5	(Gomez-Ruiz y cols., 2002, Miguel y cols., 2010)
	Queso Gouda	α _{s1} -CN f(1-9)	RPQHPIKHQ	13.4	6,1	-9,3	(Saito y cols., 2000)
		β-CN f(60-68)	YFPFGPIPN	14.8	7,5	-7.0	
Enzimas modificadas del queso	β-CN f(102-104)	MAP	0.8	3.0	-17.0	(Tonouchi y cols., 2008)	

PSS, descenso presión sanguínea sistólica máximo;

n.d., no detectado.

^a Efecto observado tras la administración de un hidrolizado de caseína.

Los péptidos antihipertensivos mejor estudiados son los llamados lactotripéptidos de secuencia VPP e IPP derivados de la β -caseína. Pueden obtenerse tanto mediante fermentación (Nakamura y cols., 1995b) como por hidrólisis enzimática utilizando proteasas microbianas (Mizuno y cols., 2004). Aunque sus efectos antihipertensivos han sido demostrados en varios modelos animales (Jäkälä y Vapaatalo, 2010), los resultados de los estudios clínicos son contradictorios. Pese a que se han descrito descensos significativos en la presión arterial sistólica y diastólica en dos meta-análisis que recogen un total de 12 (Xu y cols., 2008) y 15 ensayos clínicos (Pripp, 2008), otros estudios detallan la falta de efecto sobre la presión arterial tras la ingesta de los lactotripéptidos (Engberink y cols., 2008, van der Zander y cols., 2008, van Mierlo y cols., 2009). Finalmente, un meta-análisis reciente de 19 ensayos clínicos donde se suministraron pequeñas dosis de lactotripéptidos mostró un efecto positivo sobre la presión arterial (-4.8 mmHg para la presión arterial sistólica y -1 mmHg para la presión arterial diastólica), aunque este efecto no se había observado en todos los ensayos (Turpeinen, 2013). Estos datos contradictorios se reflejaron en un informe de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria donde se estableció que no existía evidencia suficiente sobre el mecanismo de acción por el cual VPP e IPP pudieran ejercer su efecto sobre la presión arterial (EFSA, 2012).

4.1. Péptidos antihipertensivos derivados de lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una proteína quelante de hierro, perteneciente a la familia de las transferrinas, y componente minoritario del suero lácteo. Además de en la leche, considerada la principal fuente de LF, la proteína se localiza en superficies mucosas, en el interior de gránulos específicos de

leucocitos polimorfonucleares, la saliva y el fluido seminal, por lo que se piensa que podría estar implicada en la respuesta inmune innata (Farnaud y Evans, 2003).

La LF es una glicoproteína con una estructura monomérica bilobular y una masa molecular aproximada de 80 kDa. Sus dos lóbulos corresponden a los extremos N-terminal (residuos 1-333) y C-terminal (residuos 345-692), y son homólogos (37%), estando conectados por una cadena en α -hélice (residuos 334-344) (Figura 8). Cada uno de estos lóbulos está subdividido en dos dominios, que poseen una zona de unión reversible a hierro. Cada átomo de hierro está coordinado a cuatro ligandos (dos residuos de tirosina, un aspartato y una histidina), además de a un anión, habitualmente carbonato (Metz-Boutigue y cols., 1984, Farnaud y Evans, 2003). Las LFs de origen humano y bovino poseen un 69% de homología de secuencia y una estructura terciaria muy similar (Pierce y cols., 1991).

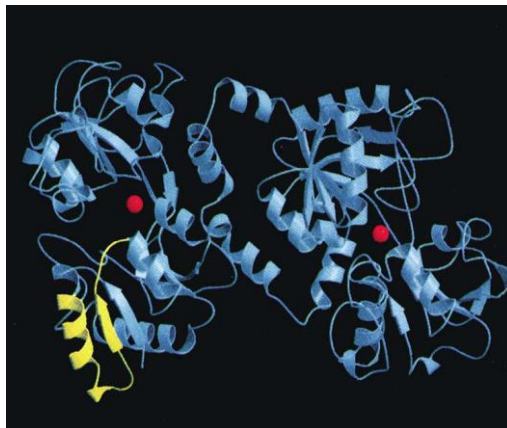


Figura 8. Estructura molecular tridimensional de la LF. La localización de la lactoferricina está marcada en amarillo y las dos esferas rojas corresponden a iones férricos (Farnaud y Evans, 2003).

Se han descrito una gran cantidad de efectos biológicos para la LF tales como propiedades antimicrobianas, antivirales, antioxidantes, anticarcinogénicas o actividades inmunomoduladoras entre otras (Wakabayashi y cols., 2006), representadas en la Figura 9. Algunas de ellas, como por ejemplo la actividad antibacteriana, están relacionadas con su capacidad intrínseca de quelar hierro, mientras que otras parecen ser independientes de dicha propiedad (Branen y Davidson, 2000, Eliassen y cols., 2002, Eliassen y cols., 2003, Andersen y cols., 2004, van der Kraan y cols., 2005, Chen y cols., 2006, Muñoz y Macos, 2006, Enrique y cols., 2007, 2008).

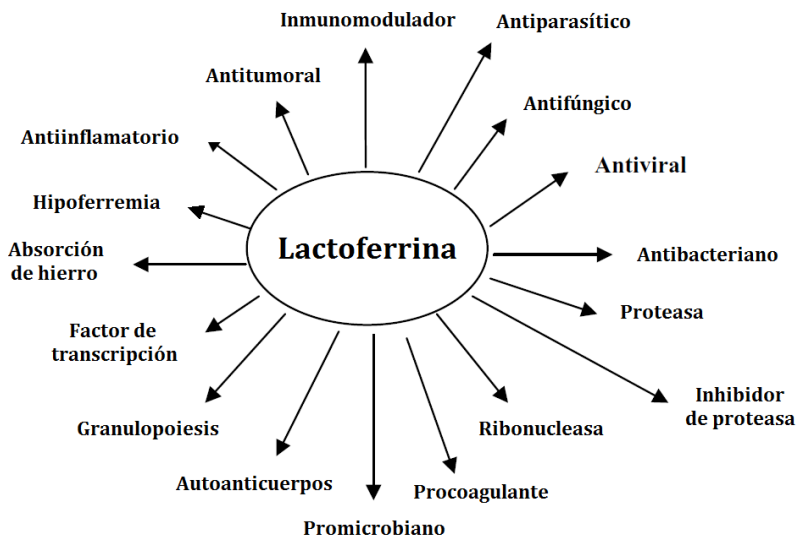


Figura 9. Efectos biológicos de la LF. Adaptado de (Farnaud y Evans, 2003).

Por lo que se refiere a péptidos derivados de LF, en un trabajo pionero sobre la estabilidad de proteínas antimicrobianas en el tracto digestivo, se

demostró que la hidrólisis de LF, tanto humana como bovina, con pepsina generaba péptidos con mayor capacidad antimicrobiana que la proteína nativa (Tomita y cols., 1991). Los péptidos activos responsables de dicha actividad se identificaron posteriormente (Bellamy y cols., 1992b), y se denominaron lactoferricina H (LfcinH, proveniente de leche humana) y lactoferricina B (LfcinB, proveniente de leche bovina), cuya secuencia de aminoácidos se muestran en la Figura 10. LfcinH corresponde a los residuos de aminoácidos 1-47 de la región N-terminal de la proteína e incluye un bucle de 18 residuos de aminoácidos cerrado mediante un puente disulfuro interno. Los residuos 1-11 constituyen un fragmento separado, que se mantiene unido al bucle principal mediante otro puente disulfuro. La LfcinB está constituida por 25 aminoácidos y comprende únicamente los residuos 17-41, incluyendo el bucle estabilizado con el puente disulfuro (Farnaud y Evans, 2003).

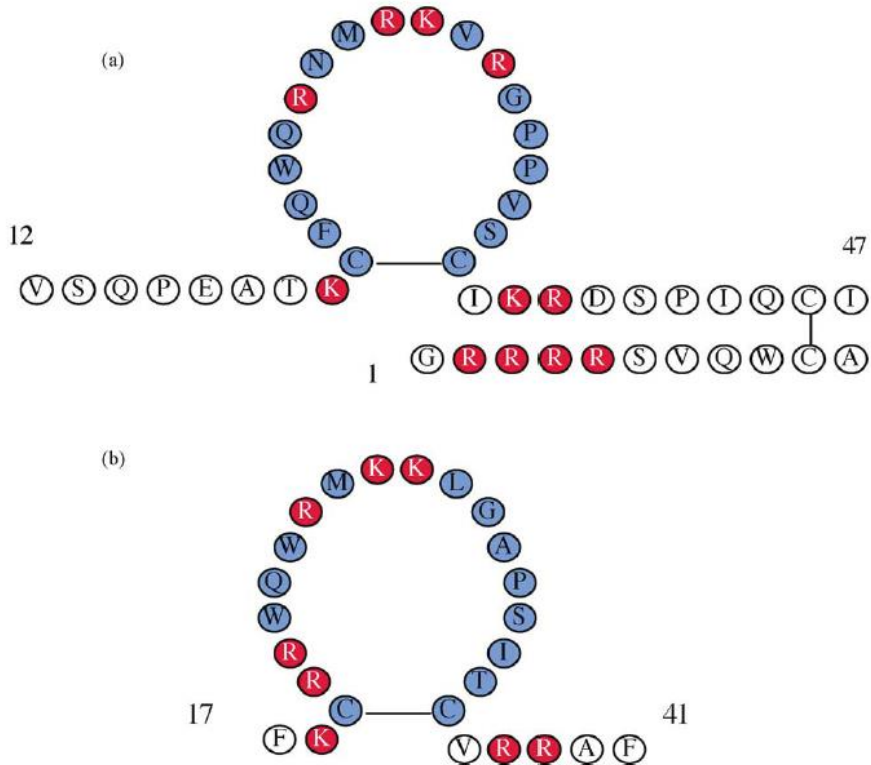


Figura 10. Secuencias de lactoferrina (a) humana (LfcinH) y (b) bovina (LfcinB), mostrándose los puentes disulfuro en su estructura. La numeración corresponde a la posición que ocupan los residuos en la proteína parental LF. Los residuos aminoacídicos cargados positivamente se encuentran marcados en rojo (Farnaud y Evans, 2003).

La potencia antimicrobiana de LfcinB es mayor que la de LfcinH, y además no sólo retiene sino que mejora las actividades de la LF. Se ha descrito que LfcinB posee una potente actividad antimicrobiana (Bellamy y cols., 1992a, Yamauchi y cols., 1993, Bellamy y cols., 1994, Wakabayashi y cols., 1996) y una ligera actividad antiviral (Andersen y cols., 2001, Andersen y cols., 2003). El péptido también exhibe propiedades antitumorales e inmunológicas.

Además, derivados más cortos de LfcinB, que carecen del puente disulfuro, también poseen actividad antimicrobiana (Kang y cols., 1996, Wakabayashi y cols., 1999, Enrique y cols., 2007, 2008, Enrique y cols., 2009).

A pesar de un análisis *in silico* que señaló a la LF bovina como una fuente prometedora de péptidos inhibidores de ECA y de la multifuncionalidad mostrada por LfcinB y secuencias derivadas (Vermeirssen y cols., 2004b), se han descrito pocos péptidos derivados de LF con efecto antihipertensivo, sobre todo si se compara con el número de secuencias provenientes de otras proteínas lácteas. En 2006 se describió la secuencia LRPVAA con capacidad de inhibición *in vitro* de la ECA, y efecto antihipertensivo tras inyección intravenosa en SHR (Lee y cols., 2006). Nuestro grupo de investigación también ha contribuido a la caracterización de péptidos derivados de LF bovina mediante ensayos *in vitro* de inhibición enzimática, ensayos funcionales *ex vivo* de vasoconstricción ECA-dependiente, y ensayos *in vivo* de evaluación del efecto antihipertensivo tras administración oral en SHR (Tabla 2). En concreto, se han caracterizado péptidos derivados de distintas zonas de la secuencia de LF bovina, incluido su dominio antimicrobiano LfcinB, y también un hidrolizado generado con pepsina (Centeno y cols., 2006, Ruiz-Gimenez y cols., 2007, Ruiz-Giménez y cols., 2010, Ruiz-Giménez y cols., 2012).

Tabla 2. Potencia de inhibición de ECA, efectos antihipertensivos orales e inhibición de la vasoconstricción dependiente de ECA de péptidos derivados e hidrolizado de LF

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ ^a	PSS (mmHg) ^b	Inhibición de la vasoconstricción (%) ^c	Referencia
Derivados de LfcinB					
LfcinB ₁₇₋₃₂	FKCRRWQWRMKKLGAP	11.0 ± 1.5	n.s.	20	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₇₋₃₁	FKCRRWQWRMKKLGA	25.5 ± 2.3	n.s.	21	(Centeno y cols., 2006, Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₂₀₋₂₅	RRWQWR	32.0 ± 4.9	-16.7 ± 3.2	30	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₉₋₂₅	CRRWQWR	2.3 ± 0.1	n.s.	n.s.	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₈₋₂₅	KCRRWQWR	5.8 ± 0.2	n.s.	25	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₇₋₂₅	FKCRRWQWR	2.9 ± 0.6	n.s.	26	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₇₋₂₄	FKCRRWQW	10.5 ± 0.6	n.s.	18	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₁₇₋₂₂	FKCRRW	26.7 ± 1.9	n.s.	28	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₂₁₋₂₃	RWQ	n.d.	n.s.	n.d.	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)
LfcinB ₂₂₋₂₃	WQ	n.d.	-11.4 ± 2.7	n.s.	(Ruiz-Giménez y cols., 2010)

(Continúa en página siguiente)

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ ^a	PSS (mmHg) ^b	Inhibición de la vasoconstricción (%) ^c	Referencia
Derivados de LF					
f(266-270)	LIWKL	0.47 ± 0.01	-25.3 ± 3.5	22	(Ruiz-Giménez y cols., 2012)
f(133-136)	RPYL	56.5 ± 1.9	-18.9 ± 2.3	14	(Ruiz-Giménez y cols., 2012)
f(232-238)	LNNSRAP	105.3 ± 6.4	-15.3 ± 3.7	n.s.	(Ruiz-Giménez y cols., 2012)
Hidrolizado de LF					
HLF pepsina		14.3 ± 3.3	-15.9 ± 3.6	29	(Ruiz-Giménez y cols., 2012)

^a Unidades IC₅₀ dadas en μM (péptidos) o μg/mL (hidrolizado).

^b Descenso máximo de la PSS (presión sanguínea sistólica) tras administración oral de dosis de 10 mg/kg (péptidos) o 200 mg/kg (hidrolizado).

^c Inhibición de la vasoconstricción dependiente de ECA expresada como porcentaje respecto a la vasoconstricción control.

n.s. no significativo; n.d. no determinado.

Los péptidos derivados de LfcinB inhibieron *in vitro* la actividad ECA, y los valores de IC₅₀ se situaron dentro del rango 2.3-32 μM (Centeno y cols., 2006, Ruiz-Giménez y cols., 2010). En el caso de los péptidos de secuencia LIWKL, RPYL y LNNSRAP, identificados a partir de un hidrolizado de LF con pepsina, también se obtuvieron valores de IC₅₀ en el rango micromolar (0.47-105.3 μM) (Ruiz-Giménez y cols., 2012), como es habitual para los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias (Hernández-Ledesma y cols., 2011, Martínez-Maqueda y cols., 2012). También se caracterizó la fracción < 3kDa del hidrolizado de LF con pepsina, a partir del cual se identificaron las secuencias anteriormente citadas, capaz de inhibir la ECA con un valor de IC₅₀ de 14.3 μg/ml (Ruiz-Gimenez y cols., 2007, Ruiz-Giménez y cols., 2012).

Los estudios *ex vivo* con arterias aisladas en baño de órganos registran efectos vasoactivos y aportan evidencia funcional de la capacidad de los péptidos inhibidores de la ECA para inhibir la vasoconstricción ECA-dependiente. Los ensayos *ex vivo* realizados con los péptidos derivados de LfcinB y con el hidrolizado de LF < 3kDa y sus tres secuencias identificadas, han mostrado que la mayoría de ellos tienen efectos inhibidores sobre la vasoconstricción ECA-dependiente. Los valores de inhibición de vasoconstricción oscilaron entre el 14% para RPYL y el 30% para LfcinB₂₀₋₂₅ (Centeno y cols., 2006, Ruiz-Giménez y cols., 2010, Ruiz-Giménez y cols., 2012), a pesar de las marcadas diferencias entre sus potencias inhibitorias de la ECA. A destacar que LfcinB₁₉₋₂₅, LfcinB₂₂₋₂₃ y LNNSRAP no mostraron efecto inhibidor de la vasoconstricción dependiente de la ECA.

Por lo que se refiere a los estudios *in vivo*, de los péptidos derivados de LfcinB ensayados, solamente LfcinB₂₀₋₂₅ y LfcinB₂₂₋₂₃ mostraron efecto

antihipertensivo tras administración oral a SHR (Ruiz-Giménez y cols., 2010). También provocaron una bajada en la presión arterial el hidrolizado de pepsina < 3kDa y las tres secuencias RPYL, LIWKL y LNNSRAP. Cabe destacar que el efecto de LIWKL se mantuvo tras 24 horas de su administración oral, de forma similar a como lo hizo el hidrolizado de pepsina < 3 kDa (Ruiz-Giménez y cols., 2012).

Teniendo en cuenta los resultados de los tres tipos de ensayos, se puede afirmar que la inhibición de la actividad ECA es el mecanismo de acción responsable, al menos en parte, de los efectos antihipertensivos del péptido LfcinB₂₀₋₂₅, del hidrolizado de LF < 3 kDa y de sus péptidos RPYL y LIWKL. Por el contrario, el efecto antihipertensivo mostrado por el dipéptido LfcinB₂₂₋₂₃ y el péptido LNNSRAP no puede explicarse a través de un efecto inhibitor de la actividad ECA.

4.2. Otros mecanismos de acción de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias

Como ya se ha comentado anteriormente, no siempre se observa una correlación entre la potencia inhibitoria *in vitro* de la ECA y el efecto antihipertensivo *in vivo* ejercido por los péptidos derivados de proteínas alimentarias (Vermeirssen y cols., 2004a). Generalmente, la potencia inhibitoria de estos péptidos suele ser bastante inferior a las mostradas por fármacos inhibidores de ECA como el captopril (IC₅₀=0.022 µM) (Ondetti y Cushman, 1977). Sin embargo, sus efectos antihipertensivos testados *in vivo* son en algunos casos bastante similares. Para explicar esta aparente discrepancia, hay que tener en cuenta que cuando se ensaya por vía oral este

tipo de compuestos en animales de experimentación, entran en juego cuestiones como la biodisponibilidad o la participación simultánea de otros mecanismos de acción además de la inhibición de la ECA. Por ejemplo, mecanismos vasoactivos a corto plazo, así como mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes a largo plazo, podrían suponer la mejora o el mantenimiento de la salud vascular en los ensayos *in vivo*, cuyo efecto en ensayos *in vitro* no se ve reflejado (Marques y cols., 2012). De hecho, en los últimos años se acumulan evidencias científicas que señalan la relevancia de dianas moleculares diferentes a ECA en el efecto antihipertensivo de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Estas dianas incluyen distintos componentes del RAS (como la renina o los receptores AT), el sistema ET y la ruta de biosíntesis de óxido nítrico (Udenigwe y Mohan, 2014), tal y como se resume en la Figura 11 y la Tabla 3. A continuación se describen con mayor detalle aquellos estudios referentes al RAS y el sistema ET.

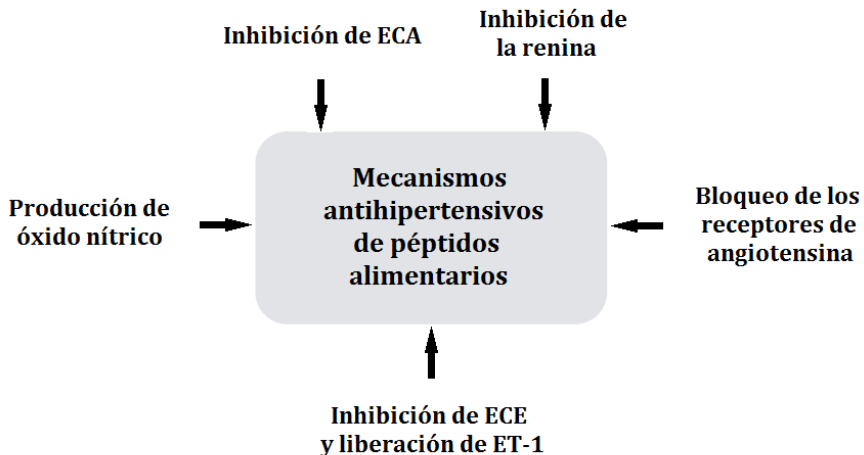


Figura 11. Mecanismos antihipertensivos de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Adaptado de (Udenigwe y Mohan, 2014).

Centrándonos en el RAS (ver Figura 2), se han descrito distintas secuencias peptídicas derivadas de proteínas vegetales que inhiben *in vitro* la renina (Li y Aluko, 2010, Udenigwe y cols., 2012b, He y cols., 2013b). Algunas de ellas, derivadas de la colza, presentan efecto antihipertensivo tras administración oral a SHR (He y cols., 2013b). También se ha observado que la ingesta prolongada de un hidrolizado de proteínas de cáñamo inhibió las actividades plasmáticas de la renina y ECA, produciéndose una reducción concomitante de la presión arterial en SHR (Girgih y cols., 2014). Asimismo, se ha descrito un hidrolizado de proteínas de guisante con una potencia inhibitoria de la renina bastante débil, pero con un potente efecto antihipertensivo en animales de experimentación, lo que se atribuyó a la represión del gen que codifica la renina (Li y cols., 2011). Otro estudio de expresión génica también ha demostrado el efecto de la secuencia RVPSL derivada de proteínas de huevo y con efecto antihipertensivo en SHR sobre los principales componentes del RAS. En concreto, se observó una represión de los genes que codifican la renina, la ECA, y el receptor AT₁, y una sobreexpresión del gen que codifica el receptor AT₂ (Yu y cols., 2014).

Respecto al sistema ET (ver Figura 5), sólo se ha descrito la inhibición de ECE por parte de hidrolizados de pepsina originados de proteínas de bonito y ternera (Okitsu y cols., 1995), y también que el péptido inhibidor de la ECA conocido como lactokinina (ALMPHIR), derivado de la β -lactoglobulina, es capaz de modular la liberación de ET-1 en células endoteliales (Maes y cols., 2004).

Tabla 3. Origen, y mecanismo de acción, distinto de la inhibición de ECA, de péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias. Adaptado de (Udenigwe y Mohan, 2014)

Origen	Péptido	Mecanismo	Referencia
Guisante	IR, KF, EF, LR, NR, FT	Inhibición de la renina	(Li y Aluko, 2010, Udenigwe y cols., 2012a)
Macroalgas	IRLIIVLMPILMA	Inhibición de la renina	(Fitzgerald y cols., 2012)
Colza	GHS, RALP, LY, TF	Inhibición de la renina	(He y cols., 2013a, He y cols., 2013c)
Linaza	fracciones peptídicas ricas en arginina	Liberación de arginina y aumento de la producción de NO	(Udenigwe y cols., 2012a, Doyen y cols., 2014)
Leche (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina)	α -lactorfina (YGLF), β -lactorfina (YLLF)	Producción de NO mediada por receptores opiáceos	(Nurminen y cols., 2000, Sipola y cols., 2002b)
Amaranto	péptidos derivados de glutelina	Producción de NO mediada por la bradiquinina	(de la Rosa y cols., 2010)
Huevo (ovoalbúmina)	IVF, RADHPFL, YAEERYPIL	Producción de NO mediada por el receptor B1 de bradiquinina	(Miguel y cols., 2007a)
Leche (β -lactoglobulina)	ALPMHIR	Modulación de la liberación de ET-1	(Maes y cols., 2004)

NO, óxido nítrico.

OBJETIVOS

La prevención o el tratamiento de la hipertensión mediante una dieta diaria que aporte péptidos antihipertensivos es una opción nutracéutica atractiva, alternativa o complementaria al uso de fármacos que no están exentos de efectos secundarios indeseables.

Proteínas de muy diverso origen se han utilizado como fuente de péptidos antihipertensivos obtenidos mediante hidrólisis enzimática o fermentación microbiana, destacando las proteínas lácteas y en particular la caseína. La proteína y el método de degradación influyen en el perfil peptídico del producto y en consecuencia en su potencial antihipertensivo. Nuestro grupo ha obtenido y parcialmente caracterizado un hidrolizado antihipertensivo de lactoferrina (LF), una proteína minoritaria de la leche, sometida a la acción de la enzima gástrica pepsina.

El criterio mayoritariamente seguido para seleccionar péptidos con potencial antihipertensivo ha sido su capacidad para inhibir *in vitro* a la enzima convertora de angiotensina (ECA), clave en la regulación de la presión arterial por el sistema renina-angiotensina (RAS). No obstante, en la regulación de la presión arterial intervienen otros componentes del RAS y otros sistemas como el de la endotelina, que son dianas potenciales de los péptidos antihipertensivos. La comprobación *ex vivo*, en arterias aisladas, de los efectos vasoactivos de los péptidos añade evidencia funcional en apoyo de su potencial antihipertensivo.

Finalmente, los efectos antihipertensivos generalmente descritos para los péptidos son agudos y transitorios, tras la administración oral de una sola dosis a ratas espontáneamente hipertensas (SHR). La comprobación *in vivo* del mecanismo antihipertensivo es de gran importancia para alegar el uso preventivo o paliativo frente a la hipertensión en humanos.

Con estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo genérico profundizar en el estudio del mecanismo de acción de hidrolizados enzimáticos y péptidos derivados de LF, caracterizando su efecto sobre los principales componentes del RAS y del sistema endotelina. Para ello se propusieron los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollar y validar *ex profeso* métodos *in vitro* y *ex vivo* para comprobar los efectos inhibidores de péptidos e hidrolizados derivados de LF sobre dos componentes del sistema de la endotelina: la enzima convertora de la endotelina (ECE) y los receptores para la endotelina-1, ET_A. Para ello se empleará un set de 8 péptidos de secuencia relacionada derivados de la lactoferricina bovina (LfcinB) previamente caracterizados en el laboratorio como inhibidores de ECA.

2. Obtener nuevos hidrolizados de LF con efecto antihipertensivo y con perfil peptídico diferente al del hidrolizado generado con pepsina. Para ello se someterá la proteína a la acción de una enzima pancreática, tripsina, y otra de origen microbiano, proteinasa K y se ultrafiltrarán los hidrolizados para enriquecerlos en péptidos de bajo peso molecular (< 3 KDa). Se comprobará el efecto antihipertensivo de los hidrolizados en ratas SHR y se identificarán los péptidos mayoritarios en los hidrolizados, potencialmente responsables del efecto antihipertensivo. Se descartarán efectos de los hidrolizados sobre la presión arterial en ratas Wistar normotensas. Se estudiarán los mecanismos de acción de los hidrolizados y péptidos identificados mediante ensayos *in vitro* y *ex vivo* de inhibición de la ECA y ECE.

3. Confirmar el mecanismo antihipertensivo *in vivo* de los péptidos derivados de LF. Para ello se seleccionará un hidrolizado de LF en base a sus efectos inhibidores *in vitro* y *ex vivo* sobre ECA y ECE, así como por su efecto

agudo *in vivo*. Se comprobará su efecto antihipertensivo crónico tras una administración oral mantenida como parte de la dieta. Se estudiarán los efectos del hidrolizado sobre diferentes componentes del RAS: actividades renina y ECA, así como niveles de angiotensina II (ang-II) y aldosterona circulantes.

4. Estudiar los efectos inhibidores de péptidos derivados de LF sobre los receptores de ang-II, AT₁, y endotelina-1 (ET-1), ET_A. Se estudiarán los efectos inhibitorios tanto sobre las vasoconstricciones inducidas por ang-II y ET-1 como sobre la unión agonista-receptor mediante el uso de radioligandos.

METODOLOGÍA

1. Lactoferrina y péptidos derivados

La lactoferrina bovina (LF) la suministró FrieslandCampina Domo (Zwolle, Holanda) y se envasó al vacío para su almacenamiento.

Todos los péptidos caracterizados en esta tesis (tabla 4) derivan de LF. Su síntesis, mediante la química del grupo base-lábil N-(9-fluorenil) metoxicarbonilo (Fmoc) (Fields y Noble, 1990), se encargó a la compañía GenScript Corporation (Piscataway, New Jersey, EEUU; <http://www.genscript.com>). Se purificaron al 90% por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) y su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF.

Tabla 4. Péptidos utilizados en este estudio.

Péptido	Secuencia	MW (g/mol)
<u>Péptidos derivados de LfcinB</u>		
LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a	Ac-FKCRRWQWRMKKLGA-NH ₂	2053.5
LfcinB ₁₇₋₃₂ ^a	Ac-FKCRRWQWRMKKLGAP-NH ₂	2132.6
LfcinB ₁₇₋₂₅ ^a	Ac-FKCRRWQWR-NH ₂	1406.7
LfcinB ₁₇₋₂₄ ^a	Ac-FKCRRWQW-NH ₂	1250.5
LfcinB ₁₇₋₂₂ ^a	Ac-FKCRRW-NH ₂	936.2
LfcinB ₁₈₋₂₅ ^a	Ac-KCRRWQWR-NH ₂	1259.5
LfcinB ₁₉₋₂₅ ^a	Ac-CRRWQWR-NH ₂	1131.3
LfcinB ₂₀₋₂₅ ^a	Ac-RRWQWR-NH ₂	1028.2
LfcinB ₂₁₋₂₃	RWQ	488.5
LfcinB ₂₂₋₂₃	WQ	332.4
<u>Péptidos derivados de LF</u>		
LF ₁₃₀₋₁₃₅	GILRPY	717.9
LF ₁₃₃₋₁₃₆	RPYL	547.7
LF ₁₈₆₋₁₉₂	REPYFGY	931.0
LF ₂₆₆₋₂₇₀	LIWKL	671.9

MW, masa molecular. ^aExtremo N-terminal acetilado (Ac) y extremo C-terminal amidado (NH₂).

Para la cuantificación espectrofotométrica, los péptidos se disolvieron en agua MilliQ (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, EEUU). La concentración de cada péptido se determinó por medida de la absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{280}=5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el aminoácido triptófano) en un espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro (Ge Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, EEUU) (figura 12). Las soluciones madre de cada péptido se prepararon a una concentración máxima de 3 mM y se mantuvieron almacenadas a una temperatura de -20°C .

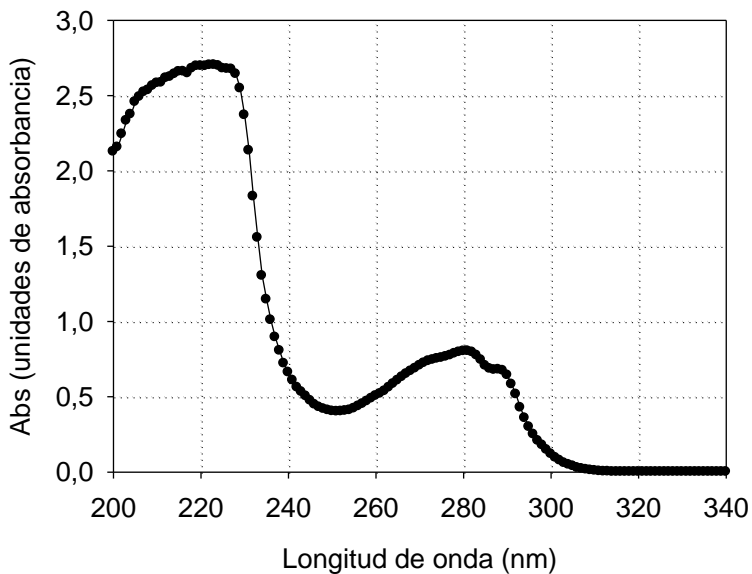


Figura 12. Cuantificación espectrofotométrica de los péptidos. A modo de ejemplo se muestra el espectro de absorción de LfcinB₁₇₋₃₁ a la concentración de 75 μM , observándose el pico de absorción del triptófano a 280 nm.

En el caso de aquellos péptidos que no contenían el aminoácido triptófano en su secuencia, las soluciones madre se prepararon pesando la cantidad adecuada en una balanza de precisión.

2. Animales de experimentación

Se utilizaron un total de 80 conejos macho de la cepa New Zealand White (Centro de Transferencia Tecnológica, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España) con un peso de 2.5-3.5 kg, 55 ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR) (Charles River España, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España) con un peso de 300-350 g y 5 ratas macho de la cepa Wistar Kyoto (WKY) (Charles River España) con un peso de 300-350 g.

Ratas y conejos fueron mantenidos en salas con temperatura controlada (23°C) con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, consumiendo agua corriente y dieta estándar *ad libitum*. En todos los casos, desde el momento de la llegada de los animales al estabulario, éstos permanecieron al menos una semana aclimatándose antes de iniciar los ensayos.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española sobre “Protección de los animales de laboratorio usados para experimentación y otros fines científicos” (R.D. 1201/2005) y los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal del Hospital La Fe de Valencia.

3. Hidrolizados de LF

3.1. Hidrólisis enzimática con pepsina, tripsina y proteinasa K

Se prepararon tres hidrolizados de LF utilizando las enzimas pepsina y tripsina (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España), y proteinasa K (Roche, Mannheim, Alemania). En el caso de la hidrólisis con pepsina, la LF (5% p/v) se disolvió en agua destilada y se ajustó a un pH de 2.5. Se añadió pepsina porcina al 3% (p/p) y se incubó la mezcla en agitación a 37°C durante 4 horas (Tomita y cols., 1991). La hidrólisis con tripsina se llevó a cabo disolviendo la LF (5% p/v) en tampón Tris-HCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 8, y añadiendo la enzima a una concentración del 1 % (p/p). La reacción se llevó a cabo en agitación a 37°C durante 24 horas (Abubakar y cols., 1998). El hidrolizado de proteinasa K se obtuvo disolviendo la LF (5% p/v) en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, utilizando proteinasa K al 1% (p/p) e incubando la mezcla de reacción en las mismas condiciones que el hidrolizado de tripsina. Las hidrólisis enzimáticas se detuvieron calentando a 80°C durante 15 minutos y las mezclas de reacción obtenidas se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos. En el caso del hidrolizado con pepsina, antes de centrifugar se neutralizó el hidrolizado mediante adición de NaOH 1 N.

3.2. Ultrafiltración de los hidrolizados de LF

Los hidrolizados de LF (HLFs) se ultrafiltraron a través de una membrana de polietersulfona con un tamaño de poro de 3 kDa (VivaFlow 50; Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Francia). Los permeados (HLFs < 3 kDa) se liofilizaron y almacenaron a temperatura ambiente hasta que fueron reconstituidos con agua destilada para posteriores análisis.

3.3. Cuantificación de proteína en los HLFs < 3 kDa

Para determinar la cantidad de proteína en los HLFs < 3 kDa, se empleó el método del ácido bicinonínico (BCA; Sigma-Aldrich Química) usando la albúmina del suero bovino (BSA) como patrón (Ruiz-Giménez y cols., 2012).

El método consiste en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} por parte de las proteínas en medio alcalino (reacción de Biuret). La interacción del Cu^{+1} con dos moléculas de ácido bicinonínico da lugar a un complejo de color púrpura con un máximo de absorción a 562 nm.

En una placa de 96 pocillos se prepararon mezclas de reacción de un volumen de 210 μl , consistentes en 200 μl del reactivo de trabajo BCA (el cual contiene Cu^{+2} en medio alcalino) y 10 μl de muestra. A continuación se incubaron las placas a 37°C durante 30 minutos, y tras atemperar, se midió la absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de 562 nm. Se realizaron curvas patrón de BSA.

3.4. Identificación de péptidos en los HLF < 3 kDa mediante RP-HPLC-MS/MS

Este método se empleó para identificar los péptidos mayoritarios presentes en el hidrolizado de LF < 3 kDa generado con proteinasa K. Se utilizó un sistema HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con una columna Mediterranea™ Sea₁₈ de 150 x 2.1 mm, con un tamaño de partículas de 5 μm (Teknokroma, Barcelona, España). Se estableció un flujo de 0.2 mL/min, inyectándose 50 μl de muestra, la cual fue eluida con un gradiente lineal del solvente B (acetonitrilo con 0.027% TFA) en A (acetonitrilo con

0.037% TFA) yendo del 0 al 20% de B en 15 minutos seguido por un gradiente de 40 minutos del 20 al 45% de B. El sistema HPLC estaba conectado a una trampa de iones cuadrupolo Esquire 3000 (Bruker Daltonik GMBH, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de ionización por electrospray. A la salida del detector el caudal se dividió para canalizar un flujo de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ hacia el espectrómetro de masas a través de una fuente de ionización por electrospray. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de secado, y helio a una presión estimada de 5×10^{-3} bares como gas portador. El capilar se mantuvo con un voltaje de 4 kV. Los espectros de masas fueron registrados en un intervalo de 100-1.500 masa/carga. El límite de intensidad para los análisis de MS/MS fue de 5.000 unidades arbitrarias (5% del total de la señal) y los iones precursores fueron aislados con un intervalo de 4.0 m/z y fragmentados con una rampa de voltaje de 0.35 a 1.4 V.

Para el análisis de los datos espectrales y su transformación a valores de masas se empleó el software Data Analysis (versión 4.0; Bruker Daltoniks). El programa BioTools (versión 3.1; Bruker Daltoniks) se utilizó para procesar los espectros MS/MS y llevar a cabo la secuenciación de los péptidos.

4. Ensayos *in vitro* de actividad enzimática

4.1. Determinación de la inhibición de enzima convertora de angiotensina (ECA)

La capacidad de inhibición de la actividad ECA de HLFs < 3 kDa, fracciones peptídicas y péptidos se determinó utilizando el método fluorimétrico descrito por Sentandreu y Toldrá (Sentandreu y Toldra, 2006). Este método se basa en la utilización del sustrato fluorogénico *o*-aminobenzoilglicil-*p*-

nitrofenilalanilprolina (Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH; Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Suiza), que es hidrolizado por acción de la ECA, liberándose el compuesto fluorescente Abz-Gly-OH. La liberación de dicho compuesto fluorescente, y por tanto la cantidad de fluorescencia emitida, es directamente proporcional al grado de actividad de la ECA, pudiéndose calcular la inhibición enzimática producida por una determinada sustancia cuantificando el descenso de la fluorescencia emitida.

Se preparó una mezcla de reacción de un volumen total de 250 μ l, conteniendo 200 μ l del sustrato fluorescente Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH (0.45 mM) disuelto en tampón Tris-base 150 mM a pH 8.3 (el cual contiene NaCl 1.125 mM), 30 μ l del inhibidor ensayado y 20 μ l de agua MilliQ. La mezcla se preincubó en placas opacas de 96 pocillos modelo U96 PP-0.5 mL Black (Nunc A/S, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EEUU) durante 15 minutos a 37°C, tras los cuales se añadió 50 μ l de ECA de riñón de cerdo (Sigma-Aldrich Química) con una actividad de 42.6 mU/mL. La placa se introdujo en un lector de fluorescencia Fluoroskan Ascent Fl (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EEUU), donde se incubó 30 minutos a 37°C. Cada 5 minutos se realizó una medida de la fluorescencia emitida (longitud de onda de excitación 320 nm y longitud de onda de emisión 405 nm) lo que permitió calcular la actividad ECA (unidades de fluorescencia emitidas por unidad de tiempo). La actividad ECA en presencia de un inhibidor se expresó como porcentaje respecto a la actividad mostrada por la enzima en ausencia de inhibidor.

Para expresar la potencia inhibidora de ECA se utilizó el parámetro IC_{50} , el cual se define como la concentración del inhibidor requerida para reducir al 50% la actividad enzimática, figura 13, que se estimó usando el software

SigmaPlot v10.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EEUU). Dicho software calcula una regresión no lineal de los datos experimentales ajustándolos a una curva sigmoidea de cuatro parámetros de acuerdo con la siguiente ecuación, donde las variables X e Y son la concentración de inhibidor y la actividad residual de la enzima respectivamente:

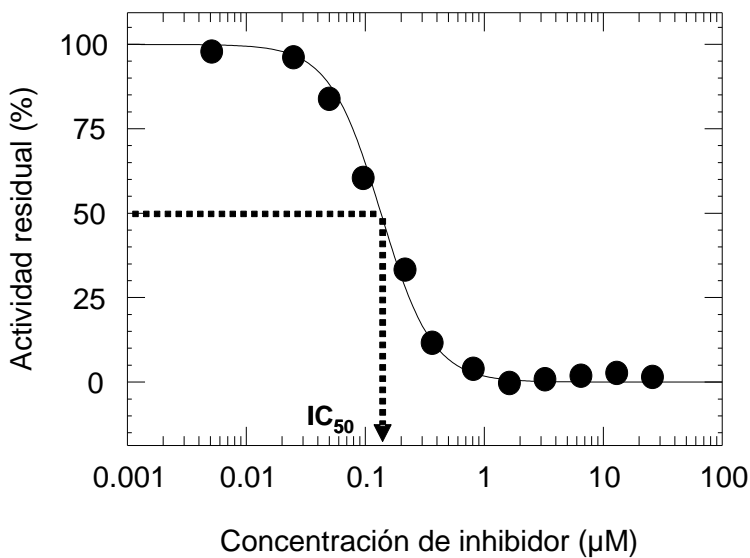


Figura 13. Representación gráfica de cálculo del IC_{50} .

4.2. Determinación de la inhibición de la enzima convertora de endotelina (ECE)

Para determinar la capacidad inhibidora de ECE de los HLF y los péptidos, se utilizaron dos protocolos *in vitro*. El primero es un método fluorimétrico,

basado en la cuantificación de la fluorescencia emitida como consecuencia de la liberación de un fluoróforo por acción de ECE. El segundo es un inmunoensayo, basado en la cuantificación de la ET-1 generada por acción de ECE sobre su sustrato biológico big ET-1.

4.2.1. Ensayo fluorimétrico

Este método se basa en la cuantificación de la fluorescencia emitida por el producto de reacción 7-metoxicumarina, el cual se libera del sustrato FPS V (Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K(Dnp)-OH; R&D systems, Minneapolis, EEUU) por acción de ECE.

Para tal fin, se preparó una mezcla de reacción de 90 μ L consistente en 65 μ L de tampón MES 25 mM, 150 mM NaCl, pH 6; 15 μ L de una solución enzimática de ECE-1 (R&D systems, Minneapolis, EEUU) con una actividad de 20 mU/ml disuelta en el tampón anterior, y 10 μ L del péptido estudiado a una concentración 500 μ M disuelto en tampón MES 100 mM pH 6. Dicha mezcla se preincubó en una placa opaca de 96 pocillos modelo Microplate Devices Uniplate 96 Wells (Whatman, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, New Jersey, EEUU) durante 15 minutos a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se inició la reacción enzimática añadiendo a la mezcla anterior 10 μ L del sustrato fluorogénico FPS V a una concentración 100 μ M preparado en tampón MES 100 mM pH 6, incubándose durante 15 minutos a 37°C. La fluorescencia se determinó en un fluorímetro de placas a una longitud de onda de excitación de 320 nm y de emisión de 405 nm, lo que permitió calcular la actividad ECE (unidades de fluorescencia emitidas por unidad de tiempo). La actividad ECE en presencia del inhibidor se expresó

como un porcentaje respecto a la actividad mostrada por la enzima en ausencia del mismo.

4.2.2. Inmunoensayo

Este método consta de dos partes. En la primera parte se prepara una reacción enzimática en la cual ECE actúa sobre su sustrato natural big ET-1 generando ET-1. Esta reacción se lleva a cabo en presencia y ausencia del inhibidor de ECE. Para ello, péptidos, HLFs o fosforamidón (inhibidor de ECE usado como control positivo) se prepararon a las concentraciones de 330 μM , 1100 $\mu\text{g/mL}$ o 495 μM respectivamente, disueltos en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, el cual contenía NaCl a una concentración de 150 mM y 0.1 μM ZnCl_2 . Seguidamente, se mezclaron 25 μL del inhibidor con 125 μL de la enzima ECE-1 (1 ng/ μL), disuelta en el mismo tampón, y 125 μL del sustrato big ET-1 humana a 6.6 μM (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Suiza), también en el mismo tampón. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 15 minutos con agitación suave, transcurrido este tiempo se paró la reacción añadiendo 27.5 μL EDTA 50 mM pH 8.0.

En la segunda parte del método, mediante un ensayo inmunológico se cuantifica la ET-1 generada utilizando el kit EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, EEUU), que se basa en una técnica de doble anticuerpo o “sándwich”, en la cual un anticuerpo monoclonal reconoce y se une específicamente a la ET-1. A dicho anticuerpo se une un anticuerpo secundario marcado con la enzima acetilcolinesterasa, cuyo producto de reacción final es un compuesto coloreado con máxima absorbancia a 412 nm. La absorbancia, determinada espectrofotométricamente, es directamente proporcional a la

cantidad de anticuerpo secundario unido, y por tanto proporcional a la concentración de endotelina presente en el pocillo. La actividad ECE en presencia del inhibidor se expresó en porcentaje respecto a la actividad mostrada por la enzima en ausencia del mismo.

5. Ensayos *ex vivo* en arterias aisladas

5.1. Aislamiento de arteria carótida y preparación de membranas

Para los ensayos *ex vivo* se utilizaron conejos macho New Zealand White, los cuales se anestesiaron inyectando 3 mL de tiopental sódico (Tiobarbital Braun®, B. Braun Medical, Jaén, España) a una concentración de 25 mg/kg y a continuación se sacrificaron inyectando 1.5 mL de KCl 10 mM a través de la vena marginal de la oreja, lo cual produce despolarización e inmediata parada miocárdica. Una incisión ventral media en el cuello permite acceder a ambas arterias carótidas, las cuales fueron diseccionadas y conservadas en solución nutritiva Ringer-Locke (NaCl 120 mM, KCl 5.4 mM, CaCl₂ 2.2 mM, MgCl₂ 1.0 mM, NaHCO₃ 25 mM, y glucosa 5.6 mM). A continuación, con la ayuda de una lupa binocular y una fuente de luz fría, se limpió la arteria para eliminar los restos de adventicia y sangre, y se cortó en 4 segmentos de 4 mm de longitud.

Cada uno de los segmentos arteriales de 4 mm se montó en una copa del baño de órganos (figura 14) con la ayuda de dos alambres de acero inoxidable de 207 µm de diámetro introducidos en el lumen arterial, uno fijado a un soporte inferior estacionario, y el otro conectado a un transductor de tensión isométrica en la parte superior (Universal Transducing Cell UC3, Gould Statham, Oxnard, California, EEUU).

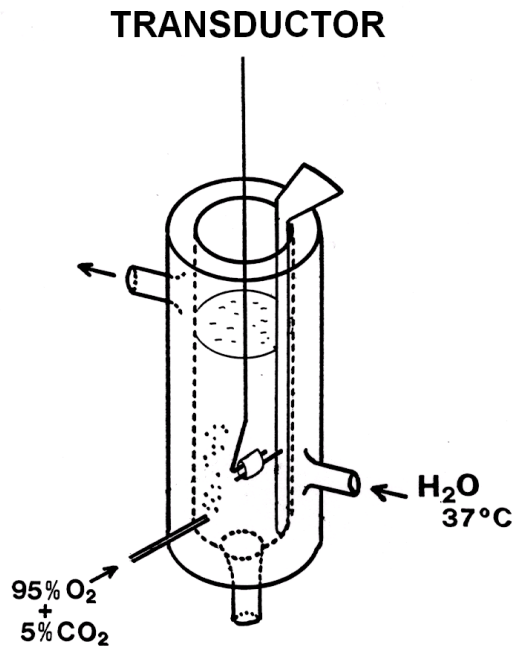


Figura 14. Representación de una copa del baño de órganos, donde se monta un segmento de 4mm de arteria carótida sumergida en solución Ringer-Locke a una temperatura de 37°C y un pH de 7.3-7.4.

Cada copa contenía 5 mL de solución nutritiva Ringer-Locke, atemperada a 37°C. El pH se ajustó a 7.3-7.4 durante todo el experimento mediante burbujeo con una mezcla de gas carbógeno de composición 95% O₂ y 5% CO₂.

Las fracciones microsomales de arteria carótida de conejo fueron obtenidas para los ensayos de unión del radioligando según el método descrito por Faber y colaboradores (Faber y cols., 2001) con algunas modificaciones. El tejido congelado fue pulverizado en nitrógeno líquido, y sometido a 5 tandas de 10 segundos de homogeneización en un Ultra-Turrax T8 (IKA-Werke,

Staufen, Alemania), a máxima velocidad. Para ello, por cada 100 mg de tejido se añadieron 500 μ L de tampón a 4°C (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, y 100 mM KCl, pH 7.4) y un coctel inhibidor de proteasas (1% v/v). Todo el proceso se llevó a cabo a una temperatura mantenida de 4°C. El homogeneizado se sometió a tres tandas de 4 W de ultrasonidos en un disruptor celular Microson XL (Misonix, Farmingdale, Nueva York, EEUU), tratado con 0.6 M de KCl durante 20 minutos para eliminar proteínas contráctiles de gran tamaño, y centrifugado a 1000 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante y se sometió a centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, y de nuevo se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 110.000 g durante 1 hora. El pellet final se resuspendió en tampón de almacenamiento que contenía 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10% de sacarosa y coctel inhibidor de proteasas, a pH 7.4, y se conservó a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas de membrana se determinó mediante el método del ácido bicinónico.

5.2. Registro de la tensión isométrica en baño de órganos

La tensión isométrica ejercida por cada segmento arterial se amplificó (OCTAL Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australia), digitalizó (PowerLab/8SP, ADInstruments), registró y almacenó en un PC IBM® compatible a través del software Chart 5 de ADInstruments para posterior análisis.

Una vez montados los segmentos arteriales sobre los soportes, se les aplicó una tensión basal inicial de 2 g, y se les dejó equilibrar durante 60 minutos durante los cuales se fue cambiando la solución nutritiva cada 15 minutos y periódicamente se fue reajustando la tensión en 2 g hasta que se estabilizó. Se

evaluó la capacidad contráctil llenando la copa con solución Ringer-Locke 50 mM KCl, en la cual el NaCl se sustituye por una cantidad equimolar de KCl, que produce despolarización celular y la consecuente contracción de la arteria. Aquellos segmentos que registraron una contracción menor a 1 g fueron descartados. A continuación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con solución Ringer-Locke, los segmentos se relajaron hasta alcanzar de nuevo la tensión basal, y se realizó uno de los protocolos experimentales que se describen a continuación.

5.3. Ensayo funcional del sistema angiotensina

Para evaluar el efecto producido por distintos inhibidores de ECA sobre la vasoconstricción arterial inducida por ang-I, se contemplaron dos grupos experimentales: un primer grupo de arterias control, donde se añadió ang-I (Calbiochem Co., La Jolla, California, EEUU) a una concentración 1 μM y posteriormente se lavó la arteria durante 30 minutos con cambio de solución nutritiva cada 10 minutos; al finalizar los lavados la arteria recuperó su tensión basal y en ese momento, se volvió a añadir ang-I a la misma concentración para comprobar la reproducibilidad de la respuesta. Un segundo grupo de arterias, en las cuales, 20 minutos antes de la adición del segundo estímulo de ang-I, los segmentos se preincubaron con un péptido o un hidrolizado a una concentración de 20 μM o 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, para cuantificar el efecto del péptido/hidrolizado sobre la contracción inducida por ang-I. Se utilizó como control captopril, fármaco inhibidor de ECA, a una concentración de 0.1 μM .

En los experimentos realizados para evaluar el efecto del inhibidor sobre los receptores de ang-II, se realizó el mismo protocolo sustituyendo ang-I por ang-II (Calbiochem Co., La Jolla, California, EEUU) a una concentración de 1 μ M. El compuesto utilizado como control, valsartan, fármaco bloqueador de los receptores de ang-II AT₁, se ensayó a 10 nM.

5.4. Ensayo funcional del sistema endotelina

Para evaluar el efecto producido por distintos inhibidores de ECE sobre la vasoconstricción arterial inducida por big ET-1, se sometió a cada uno de los segmentos arteriales a uno de los siguientes protocolos: un grupo de arterias donde se añadió big ET-1 a una concentración de 0.1 μ M para obtener la respuesta vasoconstrictora control; un segundo grupo de arterias donde se incubó durante 20 minutos el fármaco inhibidor de ECE fosforamidón (Sigma-Aldrich Química) en un rango de concentración de 1-10 μ M, y posterior adición de big ET-1 para comprobar la ECE-dependencia de la respuesta a big ET-1; y un tercer grupo de arterias donde se preincubó durante 20 minutos con un péptido (30 μ M) o hidrolizado (100 μ g/mL) para comprobar los efectos del inhibidor sobre la contracción inducida por big ET-1.

Tres parámetros caracterizaron la respuesta de contracción a las endotelinas: el efecto máximo (Emax), expresado como el porcentaje de la contracción respecto a un estímulo previo de KCl, el tiempo en alcanzar el efecto máximo, expresado en minutos, y la pendiente media, expresada en mg/min, indicativa de la velocidad de contracción, figura 15. En algunos casos, después de la incubación con los inhibidores ensayados, las respuestas a big ET-1 no alcanzaron un efecto máximo real dentro de la ventana de tiempo de 2 horas establecida para este experimento. En dicho caso, el efecto máximo y

pendiente aparentes fueron estimados tomando como referencia el tiempo medio en alcanzar el máximo en condiciones control.

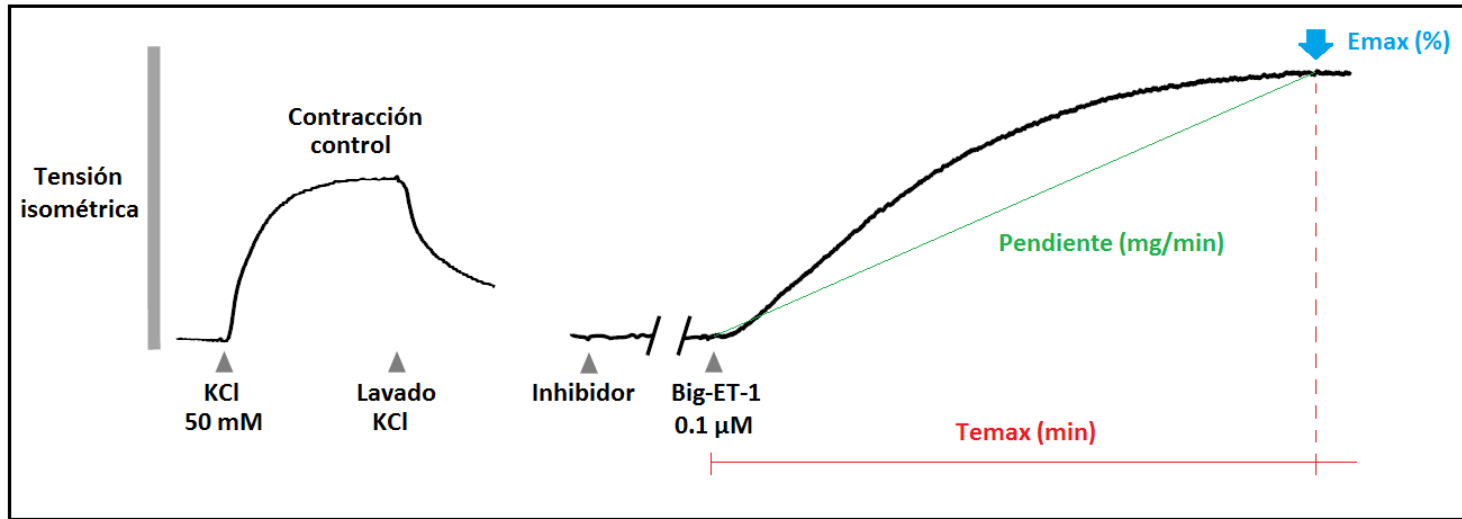


Figura 15. Representación gráfica del cálculo de los tres parámetros que caracterizan la respuesta de contracción a las endotelinas. E_{max} , efecto máximo de contracción referido a la contracción media de la curva control, expresado como porcentaje; T_{emax} , tiempo en alcanzar el efecto máximo de contracción, expresado en minutos; Pendiente, pendiente media de la curva, indicativa de la velocidad de contracción, expresada en mg/min.

Adicionalmente, para valorar los efectos sobre los receptores de ET-1 (receptores ET), en lugar de big ET-1 se añadió ET-1 (Sigma-Aldrich Química) a los segmentos arteriales a una concentración 10 nM, en condiciones control o después de incubación con fosforamidón (10 μ M), péptidos (30 μ M), HLFs (100 μ g/mL) o BQ-123 (1-10 μ M; Sigma-Aldrich Química), el cual es un antagonista selectivo del receptor ET_A.

5.5. Ensayo funcional de efectos inespecíficos

Para evaluar la incidencia de posibles efectos de los tratamientos sobre la capacidad contráctil arterial, segmentos arteriales de carótida de conejo se sometieron a dos adiciones consecutivas de 50 mM de KCl, con o sin incubación previa antes de la segunda adición con HLFs (100 μ g/mL), péptidos (20 μ M) o valsartan (0.1 μ M).

5.6. Ensayo de unión radioligando-receptor de angiotensina

Se llevaron a cabo ensayos de unión competitiva a partir de dos tipos de muestra, un preparado de membrana que contenía receptores AT₁ humanos y una fracción microsomal de membrana procedente de arteria carótida de conejo. El preparado de receptores de membrana humanos, que contenía 0.6 μ g de proteína, se incubó a 27°C durante 60 minutos en un volumen total de 200 μ L de tampón (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ a pH 7.4) con [125I]-(Sar¹, Ile⁸)-angiotensina II (0.03 nM) y diferentes concentraciones de competidores no marcados. La mezcla se filtró en vacío a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, España) previamente empapados en 0.5% de BSA mediante un recolector de células

Brandel (M24R, Valley Research Ibérica, Madrid, España). Los filtros se lavaron 5 veces con 1 mL de tampón frío Tris-HCl (pH 7.4), y se midió la radioactividad en un contador gamma (2480 Wizard, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EEUU). La unión no específica se determinó en presencia de 1 μ M de valsartan. La unión específica se definió como la unión total menos las uniones no específicas. Con la preparación de membrana de arteria carótida de conejo, se usaron 40 μ g de proteína y 0.06 nM de [125I]-(Sar1, Ile8)- ang-II. Se elaboró una curva completa (1 pM – 1 μ M) de unión competitiva para el valsartan, y las concentraciones seleccionadas de RPYL (3, 30 y 300 μ M) se ensayaron de acuerdo a sus respuestas vasoactivas en los ensayos funcionales *ex vivo*.

6. Ensayos *in vivo* en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)

6.1 Medición no invasiva de la presión arterial

Se tomaron medidas indirectas de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas SHR despiertas mediante el método no invasivo del manguito en la cola, colocando un manguito compresor y un sensor de pulso en la base de la cola. Se utilizaron dos equipos distintos: NIPREM 645 (Cibertec, Madrid, España) y LE5001 con el transductor LE5160R (Panlab Harvard Apparatus, Cornellá, Barcelona, España), siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Giménez y colaboradores (Ruiz-Giménez y cols., 2010).

Para realizar las mediciones, las ratas se inmovilizaron en un cepo de metacrilato y se colocaron en un calentador a 37°C durante 15 minutos, lo cual dilata los vasos de la cola y hace detectable la pulsación de la arteria. Cada

valor de la PAS se obtuvo promediando tres medidas satisfactorias y consecutivas sin distorsión de la señal.

6.2. Ensayos de tratamiento agudo

Los tratamientos se administraron de forma oral mediante una sonda gástrica (péptidos en dosis de 60 mg/kg o HLFs < 3 kDa en dosis de 200 mg/kg), disueltos en 0.75 mL de solución salina fisiológica (NaCl 0.9%). La PAS se midió antes de la administración para establecer la presión de referencia a tiempo cero (basal), y posteriormente a 1, 2, 3, 4, y 24 horas tras la administración del tratamiento. Se utilizaron solución fisiológica salina y captopril 50 mg/kg como controles negativo y positivo respectivamente. Las variaciones de la PAS se expresaron como la diferencia absoluta (en mm Hg) entre el valor de presión medido a cada tiempo y el valor de presión en la misma rata a tiempo cero.

6.3. Ensayos de tratamiento crónico

Se repartieron aleatoriamente las ratas SHR en tres grupos de tratamiento recibiendo con la bebida (1) agua corriente (control negativo), (2) captopril (76 mg/kg/día, control positivo), (3) LFH < 3 kDa (285 mg/kg/día), o (4) LFH < 3 kDa (782 mg/kg/día). Las dosis de los tratamientos se estimaron en base a un estudio previo de los efectos antihipertensivos producidos por la administración oral aguda de captopril y LFH < 3 kDa en esta misma cepa de ratas (Ruiz-Giménez y cols., 2012). Para realizar el cálculo de la dosis real que se suministró a las ratas se midió la ingesta de líquido dos veces por semana.

Al mismo tiempo que se medía el volumen bebido, se pesaron las ratas y se midió la PAS utilizando el método del manguito en la cola como en los ensayos de tratamiento agudo.

6.4. Determinación de componentes del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) en sangre

6.4.1. Determinación de la actividad renina y cuantificación de aldosterona en plasma

Tras finalizar los experimentos crónicos en ratas SHR, se anestesió a los animales mediante inyección intraperitoneal de 5 mg/kg de diazepam (Valium, Roche Farma, Madrid, España) y 100 mg/kg de ketamina (Ketolar, 141 Parke-Davis, Alcobendas, Madrid, España). A continuación se extrajeron muestras de sangre de la aorta abdominal en tubos que contenían EDTA tripotásico como anticoagulante, se centrifugaron a 1500 g durante 30 minutos a 4°C y posteriormente se recogió el sobrenadante, el cual se almacenó congelado a -80°C hasta su análisis.

La determinación *in vitro* de la actividad renina se basa en la cuantificación de la ang-I, producto de la reacción enzimática mediada por la acción de la renina sobre el angiotensinógeno. Para ello, se utilizó el kit Gammacoat® Plasma Renin Activity 125I RIA Kit (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El método incluye la incubación inicial del plasma para generar ang-I, seguido de su cuantificación por radioinmunoensayo de tipo competitivo, en el cual la ang-I generada y la ang-I añadida marcada con I125 compiten para

unirse específicamente al anticuerpo de conejo inmovilizado en la pared de los tubos donde se realiza el experimento. La señal emitida por el I125, será inversamente proporcional a la cantidad de ang-I presente. Por medio de un curva patrón estándar se determina la cantidad de ang-I y por tanto la actividad renina.

La determinación de la cantidad de aldosterona se realiza con el kit Coat-A-Count Aldosterona (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Malvern, Pennsylvania, EEUU). El método se basa en un radioinmunoensayo análogo al de determinación de la actividad renina pero en este caso la aldosterona marcada con I125 compete con la aldosterona presente en la muestra. La cantidad de aldosterona en la muestra se determina con una curva patrón estándar.

6.4.2. Determinación de la actividad ECA y cuantificación de angiotensina II en suero

Para obtener el suero, antes de centrifugar los tubos sin anticoagulante se dejaron a temperatura ambiente para que la sangre coagulara.

Para determinar la actividad ECA se utilizó el kit cinético ECA de Bühlman (Bühlmann Laboratories, Schönenbuch, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la disminución de la absorbancia producida a una longitud de onda de 340 nm al hidrolizarse por acción de la ECA el sustrato sintético N-[3-(2-furil)acriloil]-L-fenilalanilglicilglicina (FAPGG) en furilacriloilfenilalanina (FAP) y glicina.

Para la determinación de ang-II en suero se utilizó el kit AssayMax Human Angiotensin II ELISA (AssayPro, St. Charles, Missouri, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El protocolo se basa en un inmunoensayo enzimático sándwich de tipo competitivo en el cual se inmoviliza un anticuerpo policlonal específico para ang-II en la pared de los pocillos de una placa. La ang-II se unirá a dicho anticuerpo inmovilizado y a un anticuerpo secundario policlonal conjugado a la enzima peroxidasa añadido posteriormente. La adición al pocillo del sustrato de la peroxidasa desencadena una reacción enzimática que produce la coloración del medio, que se mide espectrofotométricamente a 450 nm.

7. Análisis estadísticos

Para la comparación de dos variables se utilizó el test t de Student desparejado. El estudio de más de dos variables se abordó mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) seguido de un post test múltiple de Dunnett (comparación de cada grupo de medias frente al grupo control) o Student-Newman Keuls (comparación de cada grupo de medias frente a los demás grupos). Para evaluar relaciones entre dos variables se utilizó el análisis de correlación seguido de un test de linealidad. Un P-valor menor de 0.05 se consideró como una diferencia estadísticamente significativa. Todos los tests estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, California, EEUU).

RESULTADOS

Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction

Fernández-Musoles R., López-Díez J. J., Torregrosa G., Vallés S., Alborch E., Manzanares P., Salom J. B.

Peptides 31 (2010) 1926-1933

ABSTRACT

Endothelin-converting enzyme (ECE), a key peptidase in the endothelin (ET) system, cleaves inactive big ET-1 to produce active ET-1, which binds to ET_A receptors to exert its vasoconstrictor and pressor effects. ECE inhibition could be beneficial in the treatment of hypertension. In this study, a set of eight lactoferricin B (LfcinB)-derived peptides, previously characterized in our laboratory as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides, was examined for their inhibitory effects on ECE. *In vitro* inhibitory effects on ECE activity were assessed by using both the synthetic fluorogenic peptide substrate V (FPS V) and the natural substrate big ET-1. To study vasoactive effects, an *ex vivo* functional assay was developed using isolated rabbit carotid artery segments. With FPS V, only four LfcinB-derived peptides induced inhibition of ECE activity, whereas the eight peptides showed ECE inhibitory effects with big ET-1 as substrate. Regarding the *ex vivo* assays, six LfcinB-derived peptides showed inhibition of big ET-1 induced, ECE-dependent vasoconstriction. A positive correlation between the inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE activity when using big ET-1 and the inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction was shown. ECE-independent vasoconstriction induced by ET-1 was not affected, thus discarding effects of LfcinB-derived peptides on ET_A receptors or intracellular signal transduction mechanisms. In conclusion, a combined *in vitro* and *ex vivo* method to assess the effects of potentially antihypertensive peptides on the ET system has been developed and applied to show the inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction of six LfcinB-derived peptides, five of which were dual vasopeptidase (ACE/ECE) inhibitors.

Keywords: lactoferricin B-derived peptide, bioactive peptide, hypertension, vascular tone, endothelin system, endothelin-converting enzyme, vasopeptidase inhibitor.

INTRODUCTION

Hypertension is usually defined as a chronic elevation of systemic arterial blood pressure above certain threshold values. However, elevated blood pressure is only a manifestation of a progressive disease representing an important health problem. Currently it is estimated that a quarter of the world's adult population is hypertensive, and this number is projected to increase to 30% by 2025 [15]. Progression is strongly associated with functional and structural abnormalities that damage the heart, kidneys, brain, vasculature, and other target organs. The inherent increase in cardiovascular risk leads to premature morbidity and mortality [9]. Prolonged blood pressure lowering through lifestyle interventions or pharmacological treatments is associated with reductions in the risks of fatal or non-fatal stroke (30–40%) and coronary events (20%), and appears to reduce to a lesser degree the incidences of other complications like heart failure, renal disease and vascular dementia [39]. Unfortunately, blood pressure control to target is still only achieved in 30% of patients [11].

Systemic blood pressure is regulated through nervous and humoral mechanisms acting on vascular tone and blood volume. The renin-angiotensin system (RAS) is the most recognized humoral system for the control of fluid/electrolyte balance and blood pressure, and its dysfunction is involved in the pathophysiology of hypertension [3]. Another peptidic system, the endothelin (ET) system, has also an increasingly recognized role in blood pressure regulation, and an ET-mediated component is thought to be implicated in the vasoactive, inflammatory and hypertrophic processes leading to hypertension and its complications [32]. Moreover, increasing

evidence points to different interactions between the RAS and the ET system in the pathophysiology of hypertension [27].

Several current antihypertensive drugs target on the RAS at different points of the cascade: renin inhibitors, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, AT₁ receptor blockers and aldosterone receptor antagonists [39]. On the other hand, the ET system has also been targeted for hypertension drug treatment. The ET system consists of two activating peptidases, three peptide ligands, and two G-protein-coupled receptors. Of particular relevance in the cardiovascular system, ET-1 has powerful vasoconstrictor and pressor properties. The gene product preproET-1 is cleaved by a furin-like endopeptidase to form a biologically inactive intermediate termed big ET-1. Next, big ET-1 is cleaved by an endothelin-converting enzyme (ECE) to form ET-1, which binds to vascular ET_A and ET_B receptors to induce its biological effects [16]. ET receptor antagonists have been approved for pulmonary hypertension treatment and are under clinical development for systemic hypertension treatment [28]. Selective ECE inhibitors have been tested in preclinical rat models of hypertension [1,36].

Bioactive antihypertensive peptides of food origin are gaining importance as alternative to synthetic drugs in hypertension therapy. To date, ACE inhibition is the main goal of antihypertensive peptides derived from plant and animal proteins such as milk, soy or fish. These ACE inhibitory peptides can be enzymatically released from precursor proteins during food processing and gastrointestinal digestion. By using specific procedures they may be generated in or incorporated into functional foods for the development of 'natural' beneficial health products. Several products containing bioactive peptides with ACE inhibitory properties are currently on the market or in

development [7]. However, antihypertensive effects of food derived peptides mediated by vasoactive mechanisms other than ACE inhibition have also been reported [17,23,40,41]. With regard to ECE activity, inhibitory effects in pepsin digests of bonito and beef proteins have been reported, although individual peptides were not purified and identified [24].

Bovine milk proteins are a good source of ACE inhibitory peptides [21]. Antihypertensive peptides generated from casein [25] as well as whey protein derived peptides [26] have been deeply studied. Bovine lactoferrin (LF), a minor component of milk whey, and its derived peptide lactoferricin B (LfcinB) have received considerable attention due to the diverse range of biological effects exhibited, including antimicrobial, antiviral, antioxidant, anticarcinogenic and immunomodulatory activities [8,38]. Moreover the potential antihypertensive effects of LF hydrolysates and individual derived peptides have been recently described [4,18,30].

Present strategies in the search of novel classes of antihypertensive drugs include the development of single compounds capable of simultaneously inhibiting more than one receptor or enzymatic activity involved in hypertension pathophysiology. For example, a triple inhibitor of ACE, neutral endopeptidase (NEP) and ECE (also known as vasopeptidase inhibitor) has proven to be effective in preclinical rat models of hypertension [2]. In a recent study from our laboratory, a set of LfcinB-derived peptides was examined for their inhibitory effects on ACE activity and ACE-dependent vasoconstriction [31]. To gain insight into the mechanisms of action of these LfcinB-derived peptides, the aim of the present study was to assess their capability to act as dual vasopeptidase inhibitors. For this purpose, their inhibitory effects on ECE activity and ECE-dependent vasoconstriction were studied.

MATERIALS AND METHODS

Peptides and other materials

Peptides (Table 1) were purchased at >90% purity from GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA) wherein they were synthesized by solid phase methods using N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. All the peptides were acetylated at the N-terminus and amidated at the C-terminus. Stock solutions of each peptide were prepared at 5 mM concentration in MilliQ water (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) and stored at -20°C . Peptide concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm ($\epsilon_{280} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for W residue).

Table 1. Amino acid sequences of LfcinB-derived peptides used in this study.

Peptide ^a	Sequence
LfcinB ₁₇₋₃₂	Ac-FKCRRWQWRMKKLGAP-NH ₂
LfcinB ₁₇₋₃₁	Ac-FKCRRWQWRMKKLGA-NH ₂
LfcinB ₂₀₋₂₅	Ac-RRWQWR-NH ₂
LfcinB ₁₉₋₂₅	Ac-CRRWQWR-NH ₂
LfcinB ₁₈₋₂₅	Ac-KCRRWQWR-NH ₂
LfcinB ₁₇₋₂₅	Ac-FKCRRWQWR-NH ₂
LfcinB ₁₇₋₂₄	Ac-FKCRRWQW-NH ₂
LfcinB ₁₇₋₂₂	Ac-FKCRRW-NH ₂

^aAll the peptides were acetylated at the N-terminus (Ac) and amidated at the C-terminus (NH₂).

BQ-123, human ET-1 and phosphoramidon were from Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain). Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K(Dnp)-OH (fluorogenic peptide substrate V; FPS V) and recombinant human endothelin-converting enzyme (ECE)-1 were from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Human big ET-1 was from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Endothelin EIA kit was from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

***In vitro* assay of inhibitory effect on ECE**

Peptides were assayed *in vitro* for their capacity to inhibit the ECE activity using the synthetic substrate FPS V or the natural substrate big ET-1, and quantifying the reaction products 7-methoxycoumarin group or ET-1, respectively.

For the synthetic substrate, 10 μL of peptide solution (500 μM) in 100 mM MES (4-morpholineethanesulfonic acid buffer, pH 6), 15 μL of a 20 mU/mL ECE-1 solution in 25 mM MES Buffer (pH 6) containing 150 mM NaCl, and 65 μL of MES-NaCl buffer were preincubated at 37°C for 15 min, and the mixture was incubated with 10 μL of FPS V (100 μM) in MES buffer for 15 min at the same temperature. A fluorescence plate reader with excitation at 320 nm and emission at 405 nm was used for the measurement of the initial rate (V_0 , RFU per minute) of the ECE-catalysed reaction [10].

For the natural substrate, 25 μL of peptide (330 μM) or phosphoramidon (495 μM) solution in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 150 mM NaCl and 0.1 μM ZnCl_2 , 125 μL of a 1 ng/ μL ECE-1 solution in the same buffer, and 125 μL of big ET-1 (6.6 μM) in the same buffer were incubated at 37°C for 15 min with gentle shaking. The reaction was terminated by the addition of 27.5

μ L of 50 mM EDTA (pH 8.0) in water. Quantification of ECE-1 product was carried out with the endothelin EIA Kit following the supplier's instructions.

ECE activity, measured by using either synthetic or natural substrate was expressed as percent ECE residual activity with respect to a control without peptide (100%).

Animal welfare

Rabbits were housed in temperature-controlled rooms (23°C) with 12 h light/dark cycles and consumed tap water and standard diets ad libitum.

Experimental procedures were conducted in accordance with the Spanish legislation on 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' and the study was approved by the 'Ethics Committee for Animal Welfare' of the Hospital 'La Fe'.

Ex vivo functional assay of inhibitory effect on ECE

Forty-five male New Zealand White rabbits (Technology Transferring Center, Polytechnic University of Valencia, Spain), weighing 2.5-3 kg, were killed by injection of 25 mg/kg sodium thiopental (Tiobarbital Braun[®], B. Braun Medical, Jaén, Spain) and 1.5 mL of 10 mM KCl solution through the ear vein. A midline throat incision provided access to both common carotid arteries, which were dissected free and cut in four 4 mm long segments.

For computer-assisted isometric tension recording, the arterial segments were mounted in an organ bath by using tungsten wires (207 μ m in diameter).

Two pins were introduced through the arterial lumen: one pin was fixed to a stationary support, while the other was connected to a strain gauge (Universal Transducing Cell UC3, Gould Statham, Oxnard, CA, USA). Isometric tension was conveniently amplified (OCTAL Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australia), digitized (PowerLab/8SP, ADInstruments), recorded and stored in an IBM® PC compatible computer by means of the appropriate software (Chart 5, ADInstruments) for later analysis. Each organ bath contained 5 mL of Ringer-Locke solution (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃ and 5.6 mM glucose) at 37°C and bubbled with a 95% O₂ and 5% CO₂ mixture to give a pH of 7.3-7.4. Previously determined optimal resting tension of 2 g was applied to the carotid arterial segments and they were allowed to equilibrate for 60 min before starting the experiments.

The contractile capacity of every arterial segment was assessed by exposure to 50 mM KCl Ringer-Locke solution (NaCl was replaced by an equimolar amount of KCl). Carotid arteries contracting less than 1 g were discarded. After washing out, each arterial segment was subjected to one of the following protocols: (1) a challenge to big ET-1 (0.1 μM) to obtain the control vasoconstrictor response, (2) preincubation with phosphoramidon (1-10 μM, 20 min) and a challenge to big ET-1 to check for the ECE-dependence of the response to big ET-1, and (3) preincubation with one of the peptides (30 μM, 20 min) and a challenge to big ET-1 to check for their effects on big ET-1-induced contraction. Additionally, in order to assess effects on ET receptors, arterial segments were subjected to a challenge to ET-1 (10 nM) instead of big ET-1 in control conditions or after incubation with the ECE inhibitor phosphoramidon (10 μM), one of the peptides (30 μM) or the selective ET_A receptor antagonist BQ-123 (1-10 μM).

Three parameters featured contraction responses to endothelins: (1) maximum effect (E_{max}), expressed as a percentage of previous KCl-induced contraction, (2) time spent to reach this maximum effect, expressed in minutes, and (3) mean slope, expressed in mg/min. In some cases, responses to big ET-1 did not reach a true maximum effect after incubation with the LfcinB-derived peptide. Then, apparent E_{max} and slope values were estimated taking as reference the average time to E_{max} in control conditions.

RESULTS

***In vitro* inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE activity**

The inhibitory effects of eight LfcinB-derived peptides on ECE activity were assessed by using the synthetic substrate FPS V or the natural substrate big ET-1 (Table 2). With the synthetic substrate, LfcinB-derived peptides (50 μ M) showed the following effects: LfcinB₁₇₋₃₁, LfcinB₂₀₋₂₅ and LfcinB₁₈₋₂₅ failed to inhibit ECE activity, and LfcinB₁₇₋₂₂ produced negligible inhibition (99% residual activity), while the remaining four peptides assayed (LfcinB₁₇₋₃₂, LfcinB₁₉₋₂₅, LfcinB₁₇₋₂₅ and LfcinB₁₇₋₂₄) induced significant inhibitions of ECE activity ranging from 87% residual activity to, at the most, 53% residual activity. With the natural substrate big ET-1, phosphoramidon (45 μ M) induced strong inhibition of ECE activity ($8 \pm 2\%$ residual activity, $n = 3$).

Table 2. Effects of LfcinB-derived peptides on endothelin-converting enzyme (ECE) activity.

Peptide	ECE activity (%)	
	FPS V	big ET-1
LfcinB ₁₇₋₃₂	78 ± 3 (4) (b) **	19 ± 2 (5) (d) **
LfcinB ₁₇₋₃₁	≥ 100 (4) (a)	18 ± 4 (5) (d) **
LfcinB ₂₀₋₂₅	≥ 100 (3) (a)	81 ± 1 (5) (a) **
LfcinB ₁₉₋₂₅	87 ± 2 (4) (b) **	33 ± 6 (7) (c) **
LfcinB ₁₈₋₂₅	≥ 100 (4) (a)	58 ± 4 (5) (b) **
LfcinB ₁₇₋₂₅	53 ± 4 (4) (c)**	14 ± 2 (5) (d) **
LfcinB ₁₇₋₂₄	75 ± 3 (4) (b) **	62 ± 3 (9) (b) **
LfcinB ₁₇₋₂₂	99 ± 1 (4) (a)	62 ± 3 (5) (b) **

LfcinB-derived peptides were assayed at 50 μM against the synthetic fluorogenic peptide substrate V (FPS V) and at 30 μM against the natural substrate big endothelin-1 (big ET-1). ECE activity is expressed as percent ECE residual activity with respect to a control without peptide (100%). Data are mean ± SEM from (n) experiments and were subjected to two-way ANOVA followed by Bonferroni post-tests. Data with the same letter are not significantly different (P>0.05). Except for LfcinB₁₇₋₂₄, residual activities are always significantly lower with big ET-1 when compared to FPS V (P<0.05). **Significantly lower than their respective controls without peptide (P<0.01; Student's t-test on unshown absolute values of ECE activity).

As summarized in Table 2, the eight LfcinB-derived peptides (30 μM) showed significant ECE inhibitory effects, with residual activities ranging from 81% for LfcinB₂₀₋₂₅ to 14% for LfcinB₁₇₋₂₅. When the two substrates were compared, residual ECE activities were significantly lower with big ET-1 for all LfcinB-derived peptides except for LfcinB₁₇₋₂₄. As shown in Fig.1, residual ECE activities on both substrates did not show good significant correlation.

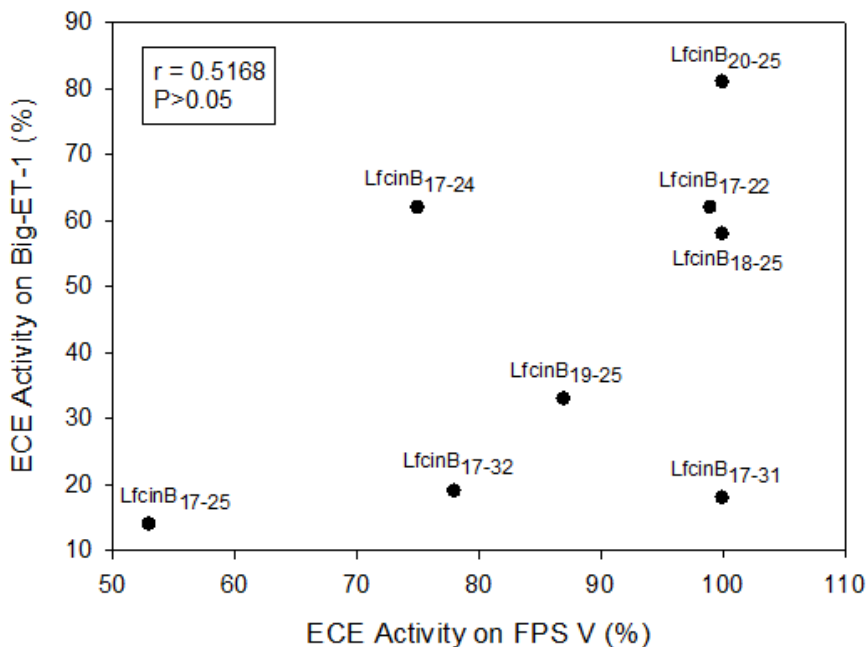


Figure 1. Correlation analysis of *in vitro* residual endothelin-converting enzyme (ECE) activities, using fluorogenic peptide substrate V (FPS V) or big endothelin-1 (big ET-1) as substrate, after incubation with each of the eight LfcinB-derived peptides. ECE activity is expressed as percent ECE residual activity with respect to a control without peptide (100%). Pearson correlation coefficients (r) and two-tailed P values are given in the insert.

***Ex vivo* inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE-dependent vasoconstriction**

Challenge of rabbit carotid arterial segments with a depolarizing solution (50 mM KCl) induced rapid phasic contraction followed by active tone maintained until KCl wash-out (Fig. 2A, B and C).

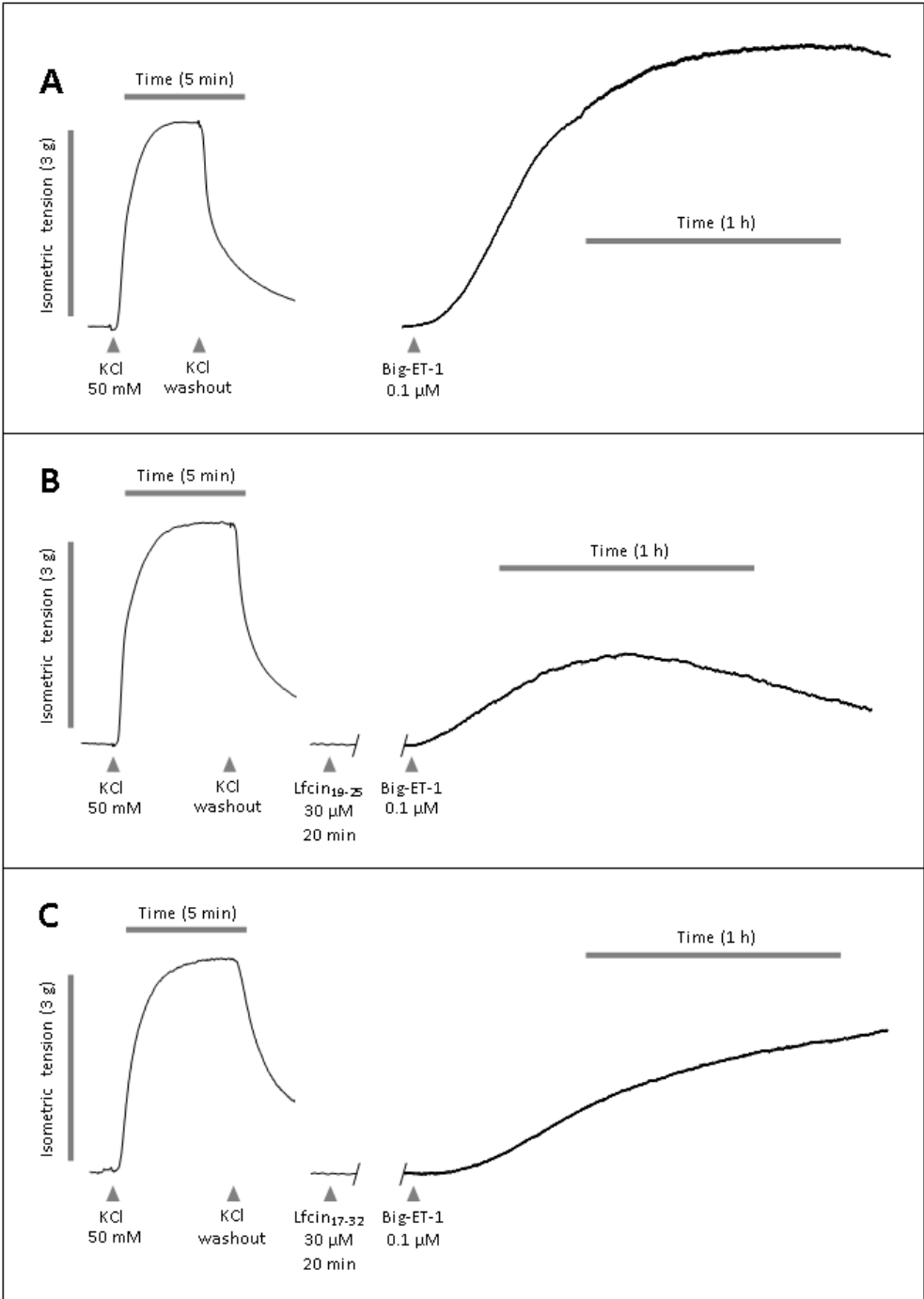


Figure 2. Contraction of carotid artery segments. A, Effect of high-KCl to check for tissue viability, and vasoconstriction to big endothelin-1 (big ET-1) in control conditions. B, Effect of LfcinB₁₉₋₂₅ on big ET-1-induced contraction. C, Effect of LfcinB₁₇₋₃₂ on big ET-1-induced contraction. Note that response to big ET-1 did not reach a true maximum effect (Emax) after incubation with LfcinB₁₇₋₃₂. Then, apparent Emax and slope values were estimated taking as reference the average time to Emax in control conditions.

Average active tone amounted to 3351 ± 69 mg (n = 279). Big ET-1 (0.1 μ M) induced slower contraction (Fig. 2A) with maximum effect (Emax) amounting to $137 \pm 5\%$ relative to previous response to KCl, reached at 91 ± 2 min, with mean slope of 59 ± 3 mg/min (n = 57). As shown in Table 3, preincubation of arterial segments with phosphoramidon (1-10 μ M) induced significant, concentration-dependent inhibition of big ET-1-induced contraction.

Table 3. Effects of LfcinB-derived peptides on ECE-dependent, big endothelin-1-induced arterial contractions.

	E _{max} (%)	Time to E _{max} (min)	Slope (mg/min)	n
Control	137 ± 5	91 ± 2	59 ± 3	57
Phosphoramidon (1 μM)	128 ± 8	184 ± 8 **	26 ± 2 **	19
Phosphoramidon (10 μM)	81 ± 7 **	194 ± 10 **	14 ± 1 **	17
LfcinB ₁₇₋₃₂ ^a	63 ± 7 **	n.d.	27 ± 4 **	14
LfcinB ₁₇₋₃₁ ^a	63 ± 6 **	n.d.	24 ± 3 **	22
LfcinB ₂₀₋₂₅	181 ± 11 **	67 ± 4 **	89 ± 10 **	20
LfcinB ₁₉₋₂₅	46 ± 8 **	69 ± 4 **	29 ± 5 **	20
LfcinB ₁₈₋₂₅	77 ± 10 **	90 ± 5	33 ± 3 **	15
LfcinB ₁₇₋₂₅ ^a	52 ± 8 **	n.d.	20 ± 3 **	20
LfcinB ₁₇₋₂₄ ^a	137 ± 10	n.d.	49 ± 3	19
LfcinB ₁₇₋₂₂	62 ± 7 **	76 ± 4	28 ± 3 **	18

LfcinB-derived peptides were assayed at 30 μM. Maximum effect (E_{max}) is expressed as a percentage of previous KCl-induced contraction. Data are the mean ± SEM from 'n' arterial segments (n.d., not determined). ^aApparent E_{max} and slope values.

**Significantly different from control, P<0.01. One way ANOVA followed by Dunnett test.

The inhibitory effects of eight LfcinB-derived peptides (30 μM) on ECE-mediated, big ET-1-induced vasoconstriction were assessed as shown in the representative recordings of Fig. 2 (B and C). Six LfcinB-derived peptides produced inhibition when compared to control vasoconstriction, with significant reductions in both the E_{max} and the mean slope (Table 3). LfcinB₁₇₋₂₄ did not show inhibitory effect and LfcinB₂₀₋₂₅ increased the big ET-1-induced vasoconstriction. Fig. 3 summarizes and compares the effects of LfcinB-derived peptides and phosphoramidon on vasoconstriction E_{max}.

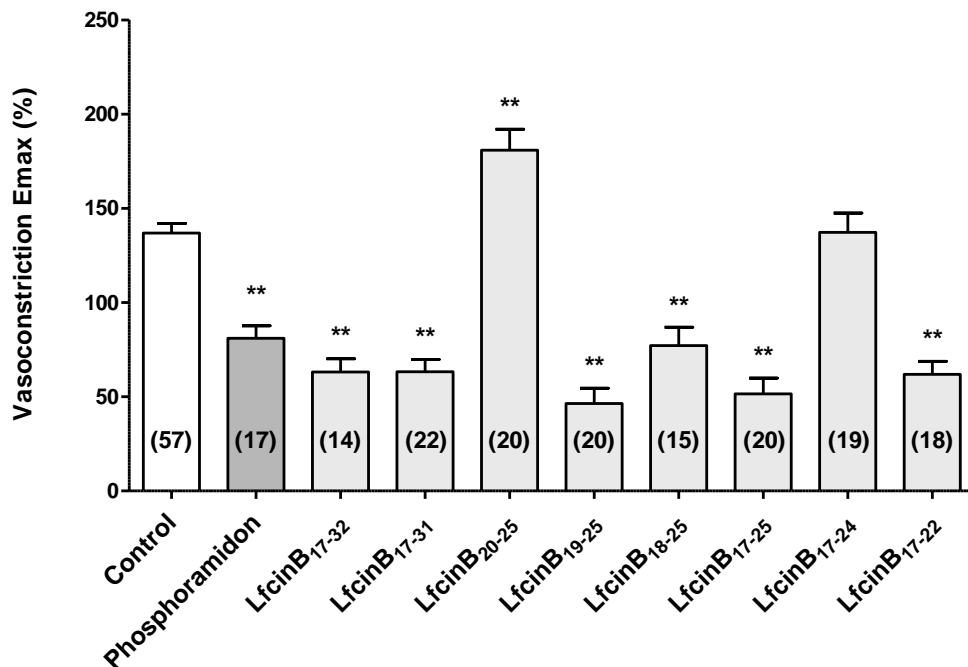


Figure 3. Comparison of the effects of phosphoramidon ($10 \mu\text{M}$) and LfcinB-derived peptides ($30 \mu\text{M}$) on vasoconstriction Emax elicited by big endothelin-1. Data are the mean \pm SEM from (n) arterial segments. **Significantly different from control, $P < 0.01$ (one way ANOVA followed by Dunnett test).

The inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE activity assessed by using the natural substrate big ET-1 showed significant positive correlation with the inhibitory effects on big ET-1-induced vasoconstriction in terms of both Emax (Fig. 4A) and mean slope (Fig. 4B).

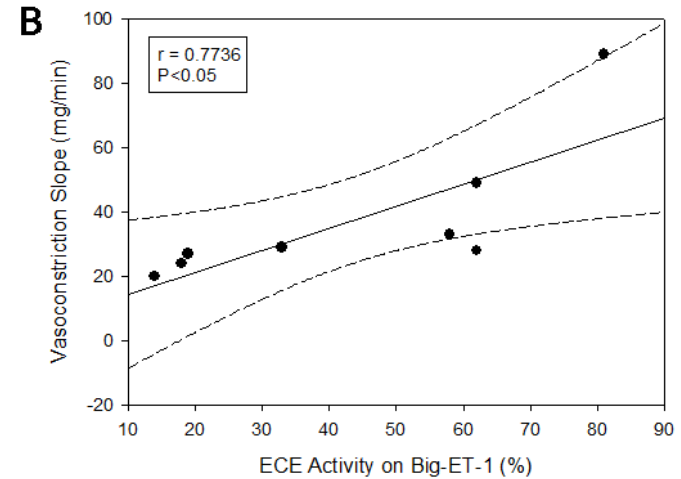
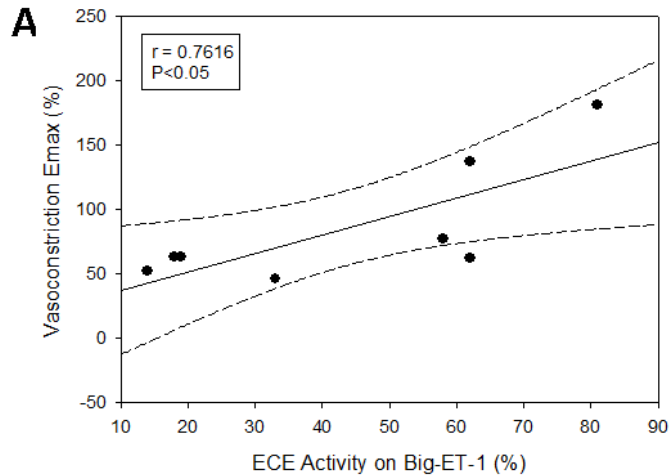


Figure 4. Correlation analysis of *in vitro* residual endothelin-converting enzyme (ECE) activity, using big endothelin-1 (big ET-1) as substrate, and *ex vivo* ECE-dependent vasoconstrictor response to big ET-1, after incubation with each of the eight LfcinB-derived peptides. ECE activity is expressed as percent ECE residual activity with respect to a control without peptide (100%). Maximum effect (Emax) is expressed as a percentage of previous KCl-induced contraction. (A) ECE activity versus vasoconstriction Emax, and (B) ECE activity versus vasoconstriction slope. Pearson correlation coefficients (r) and two-tailed P values are given in the inserts.

ET-1 (10 nM) induced contraction of rabbit carotid arterial segments with E_{max} amounting to $123 \pm 7\%$ relative to previous response to KCl, reached at 65 ± 6 min, with mean slope of 57 ± 8 mg/min ($n = 12$). Neither phosphoramidon (10 μ M) nor LfcinB₁₉₋₂₅ (30 μ M) modified the vasoconstriction induced by ET-1. In contrast, BQ-123 (1 μ M) produced significant inhibition of ET-1-induced, ECE-independent contraction, which was almost abolished by 10 μ M BQ-123 (Table 4).

Table 4. Effect of LfcinB₁₉₋₂₅ on ECE-independent, endothelin-1-induced arterial contractions mediated by ET_A receptors.

	E_{max} (%)	Time to E_{max} (min)	Slope (mg/min)	n
Control	123 ± 7	65 ± 6	57 ± 8	12
Phosphoramidon (10 μ M)	110 ± 6	60 ± 3	50 ± 5	8
LfcinB ₁₉₋₂₅ (30 μ M)	108 ± 2	66 ± 5	70 ± 12	7
BQ-123 (1 μ M)	$49 \pm 3^{**}$	$86 \pm 6^*$	$21 \pm 3^{**}$	8
BQ-123 (10 μ M)	$7 \pm 2^{**}$	n.d.	n.d.	3

Maximum effect (E_{max}) is expressed as a percentage of previous KCl-induced contraction. Data are the mean \pm SEM from 'n' arterial segments (n.d., not determined).

*Significantly different from control, $P < 0.05$. **Significantly different from control, $P < 0.01$. One way ANOVA followed by Dunnett test.

DISCUSSION

To date, ACE inhibition has been the most studied target in the screening of potentially antihypertensive bioactive peptides derived mainly from milk proteins [29] but also from proteins of other animal or plant sources [7]. However, the ET system has an increasingly recognized role in blood pressure regulation and hypertension pathophysiology [32], and it is being targeted by means of ECE inhibition or ET receptor antagonism in development studies for hypertension drug treatment [1,28,36]. In this study, we have set up a method to assay the effects of bioactive peptides on the ET system, which combines an *in vitro* test for the inhibitory effect on ECE activity and a functional *ex vivo* test for the inhibitory effect on ET-induced vasoconstriction. A set of eight LfcinB-derived peptides, with known ACE inhibitory properties [31], was examined with the newly developed method.

The *in vitro* test to assess the inhibitory effects on ECE activity was carried out with two different substrates: the synthetic fluorogenic substrate FPS V and the natural substrate big ET-1. Our results showed that four of the LfcinB-derived peptides failed to inhibit ECE activity on the synthetic substrate or produced negligible inhibition, and the remaining four peptides induced rather modest inhibitions of ECE activity that in no case reached 50 %. Given these results and since FPS V is selective but not specific for ECE, acting also as substrate for NEP and related enzymes [14], we tested the natural ECE substrate big ET-1 in order to obtain more functionally relevant results. Once the assay was validated by the strong inhibition of ECE activity with the generic metalloprotease inhibitor phosphoramidon [33], our results showed significant inhibition of ECE activity by the eight LfcinB-derived peptides, despite using lower peptide concentrations (30 μ M) than those previously

used with the synthetic substrate (50 μ M). The following ranking of inhibitory effects could be established: LfcinB₁₇₋₂₅ = LfcinB₁₇₋₃₁ = LfcinB₁₇₋₃₂ > LfcinB₁₉₋₂₅ > LfcinB₁₈₋₂₅ = LfcinB₁₇₋₂₄ = LfcinB₁₇₋₂₂ > LfcinB₂₀₋₂₅. Given the higher inhibitions of ECE activity obtained with the natural substrate and the lack of correlation with the inhibitory effects obtained using the synthetic substrate, the assay with big ET-1 was selected as the more suitable reference to be compared with *ex vivo* data obtained in isolated arteries.

Big ET-1 elicited contraction of isolated rabbit carotid artery, which was inhibited by phosphoramidon, the reference drug used to show the involvement of ECE in the cleavage of the ET precursor to render the vasoactive peptide ET-1 [42]. This big ET-1-induced, ECE-mediated vasoconstriction was significantly inhibited by six of the LfcinB-derived peptides assayed, which produced both reduction in the magnitude of the contraction and slope decline. Differences between the inhibitory effects of phosphoramidon and the peptides can be due to the different concentrations used and the fact that phosphoramidon is a not selective metalloprotease inhibitor [13]. Vascular ECE is located both in the endothelium and the smooth muscle [12], and functional differences in their respective activities can occur [42]. To which extent endothelial and/or muscular ECE activities are inhibited by LfcinB-derived peptides in our vascular preparation cannot be stated.

Globally, the inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE-dependent vasoconstriction were in line with the inhibitory effects previously observed *in vitro* on ECE activity with the natural substrate, as supported by the good positive correlation between the data obtained with the respective tests. However, LfcinB₁₇₋₂₄ did not show inhibitory effect and LfcinB₂₀₋₂₅ increased the big ET-1-induced vasoconstriction, despite the inhibitory effects

shown by these two peptides on ECE activity *in vitro*. Although this apparent discrepancy deserves further research, two methodological aspects could at least in part account for it. First, the *in vitro* test was carried out with recombinant human ECE-1, while rabbit arteries were used in the *ex vivo* test. Four isoforms of human ECE-1 have been reported [34,37], which show different levels of sequence conservation in the corresponding murine and bovine proteins [19]. Although ECE-1 isoform expression has not been reported in rabbit, differences in the structure and function between the expressed rabbit vascular isoform (or isoforms) and the human isoform used *in vitro* are possible. Second, in contrast to the simple *in vitro* reaction in which ECE catalyzes the production of ET-1 from its precursor big ET-1, enzymatic pathways involved in ET-1 production by isolated vessels can be complex. In rabbit aorta, there is a main direct pathway in which ECE or NEP produce ET-1 from big ET-1, but in an alternative two-step pathway chymase cleaves big ET-1 to the intermediate peptide ET-1(1-31), which in turn is cleaved by NEP to ET-1 [35]. To which extent these complex pathways operate in rabbit carotid artery and whether LfcinB-derived peptides are able to inhibit chymase and NEP remain to be elucidated.

Once produced, ET-1 binds to vascular smooth muscle ET_A receptors to elicit vasoconstriction [16]. Our results showed that LfcinB₁₉₋₂₅, the most effective peptide on big ET-1-induced vasoconstriction, was ineffective on ET-1-induced vasoconstriction, thus supporting that LfcinB-derived peptides inhibited ET conversion but did not act on downstream ET_A receptors or intracellular signal transduction mechanisms leading to vasoconstriction. The lack of effect of phosphoramidon on ET-1-elicited vasoconstriction confirmed that ECE did not mediate this response, while the concentration-dependent

inhibitory effect of BQ-123 verified the participation of ET_A receptors, as previously reported in isolated rabbit arteries [20,35].

In contrast to structure-activity relationships reported for ACE inhibitory peptides [6], there is no information available about the relationship between the sequence and ECE inhibitory effect of peptides. As for the LfcinB-derived peptides studied, our *in vitro* data suggest that elongation of the LfcinB₁₇₋₂₅ sequence at the C-terminus (LfcinB₁₇₋₃₁ and LfcinB₁₇₋₃₂) has no effect on ECE inhibition. Our results also show that deletion of the arginine residue at the C-terminus of LfcinB₁₇₋₂₅ (LfcinB₁₇₋₂₄) as well as N-terminal deletions (LfcinB₁₈₋₂₅, LfcinB₁₉₋₂₅ and LfcinB₂₀₋₂₅) decrease the inhibitory effect. However, the *ex vivo* data did not fully confirm these relationships, most probably because of the methodological differences already discussed.

In a previous paper, we reported the effects of LfcinB-derived peptides on ACE activity and ACE-dependent vasoconstriction [31]. Although LfcinB-derived peptides were used at 20 μM against ACE in the former study and at 30 μM against ECE in the present study, some major differences are evident when the *ex vivo* inhibitory effects on both endopeptidases are compared in terms of reduction of vasoconstriction E_{max}. On one hand, LfcinB₁₉₋₂₅ was the most effective inhibitor (66% reduction) of big ET-1-induced contraction, while it was ineffective on angiotensin I-induced contraction. On the other hand, LfcinB₁₇₋₂₄ and LfcinB₂₀₋₂₅, the most effective inhibitors (30% reduction) of angiotensin I-induced contraction, did not inhibit big ET-1-induced contraction. Therefore, although most of the LfcinB-derived peptides assayed can be considered dual vasopeptidase (ACE and ECE) inhibitors, differences in the structure-activity relationships with respect to each of the enzymes are evident. In line with our results, the lactokinin ALPMHIR was reported as an

ACE-inhibitory peptide able to inhibit ET-1 release by endothelial cells [22]. Taken together our present and previous results, we for the first time have shown the functionally relevant dual inhibitory ability on ACE and ECE of five milk protein derived peptides: LfcinB₁₇₋₂₅, LfcinB₁₇₋₃₁, LfcinB₁₇₋₃₂, LfcinB₁₈₋₂₅ and LfcinB₁₇₋₂₂.

Finally, it should be noted that all the peptides used in this study have both termini protected, which could be of relevance regarding the retention of their potential effects *in vivo*. Indeed, enhancement of the antihypertensive effects of food-derived peptides modified into cyclic forms or at the N-termini has been described [5]. Whether the bioactivity of the peptides used in this study, acetylated at the N-terminus and amidated at the C-terminus, might be representative of the activity of peptides naturally produced as a result of hydrolysis of LF or LfcinB deserves further research.

CONCLUSIONS

A method to assay the effects of bioactive peptides on the ET system, which combines an *in vitro* test for the inhibitory effect on ECE activity and a functional *ex vivo* test for the inhibitory effect on ET-induced vasoconstriction, has been developed and applied to a set of eight LfcinB-derived peptides, with previously known ACE inhibitory properties. All the eight peptides showed inhibitory effects on ECE activity assayed with the natural substrate big ET-1. Six of them inhibited big ET-1-induced, ECE-dependent vasoconstriction with good correlation with the *in vitro* inhibitory effects. No effect on ET_A receptors or intracellular signal transduction mechanisms leading to vasoconstriction was detected. Five of the LfcinB-derived peptides were dual vasopeptidase (ACE/ECE) inhibitors with antivasoconstrictor effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank María C. Mañez for her technical assistance. This work was supported by grants AGL2007-64672/ALI from 'Ministerio de Educación y Ciencia - FEDER', Consolider Ingenio 2010, Fun-C-Food, CSD2007-00063, and RETICS-RD06/0026/2006 from 'Instituto de Salud Carlos III'. R. Fernández-Musoles is recipient of a fellowship from 'Ministerio de Educación y Ciencia' (BES-2008-004472).

REFERENCES

[1] Battistini B, Ayach B, Molez S, Blouin A, Jeng AY. Effects of benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, combined with CGS 35066, a selective endothelin-converting enzyme inhibitor, on arterial blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 2002;103(Suppl 48):363S-6S.

[2] Battistini B, Daull P, Jeng AY. CGS 35601, a triple inhibitor of angiotensin converting enzyme, neutral endopeptidase and endothelin converting enzyme. *Cardiovasc Drug Rev* 2005;23:317-30.

[3] Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* 2003;24:261-71.

[4] Centeno JM, Burguete MC, Castelló-Ruiz M, Enrique M, Vallés S, Salom JB, et al. Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *J Agric Food Chem* 2006;54:5323-9.

[5] Chen TL, Lo YC, Hu WT, Wu MC, Chen ST, Chang HM. Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2003;51:1671-5.

[6] Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF, Cushman DW. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 1980;255:401-7.

[7] De Leo F, Panarese S, Gallerani R, Ceci LR. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food. *Curr Pharm Des* 2009;15:3622-43.

[8] Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2588-98.

[9] Giles TD, Materson BJ, Cohn JN, Kostis JB. Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2009;11:611-4.

[10] Gokhale NH, Cowan JA. Metallopeptide-promoted inactivation of angiotensin-converting enzyme and endothelin-converting enzyme 1: Toward dual-action therapeutics. *J Biol Inorg Chem* 2006;11:937-47.

[11] Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988–2000. *JAMA* 2003;290:199-206.

[12] Hein TW, Ren Y, Yuan Z, Xu W, Somvanshi S, Nagaoka T, et al. Functional and molecular characterization of the endothelin system in retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3329-36.

[13] Ikegawa R, Matsumura Y, Tsukahara Y, Takaoka M, Morimoto S. Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:669-75.

[14] Johnson GD, Ahn K. Development of an internally quenched fluorescent substrate selective for endothelin-converting enzyme-1. *Anal Biochem* 2000;286:112-8.

[15] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365:217-23.

[16] Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:851-76.

[17] Kouno 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 aorta: a possible mechanism of antihypertensive action. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005;69:911-5.

[18] Lee NY, Cheng JT, Enomoto T, Nakamura I. The antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide containing in bovine lactoferrin. *Chin J Physiol* 2006;49:67-73.

[19] Lindenau S, von Langsdorff C, Saxena A, Paul M, Orzechowski HD. Genomic organisation of the mouse gene encoding endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and mRNA expression of ECE-1 isoforms in murine tissues. *Gene* 2006;373:109-15.

[20] Lloréns S, Miranda FJ, Alabadí JA, Marrachelli VG, Alborch E. Different role of endothelin ET_A and ET_B receptors and endothelial modulators in diabetes-induced hyperreactivity of the rabbit carotid artery to endothelin-1. *Eur J Pharmacol* 2004;486:43-51.

[21] López-Fandiño R, Otte J, van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *Int Dairy J* 2006;16:1277-93.

[22] Maes W, Van Camp J, Vermeirssen V, Hemeryck M, Ketelslegers JM, Schrezenmeir J, et al. Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regul Pept* 2004;118:105-9.

[23] Miguel M, Alonso MJ, Salaices M, Aleixandre A, López-Fandiño R. Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. *Food Chem* 2007;104:163-8.

[24] 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;59:325-6.

[25] Otte J, Shalaby SM, Zakora M, Pripp AH, El-Shabrawy SH. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *Int Dairy J* 2007;17:488-503.

[26] Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 2001;11:347-56.

[27] Pollock DM. Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension. *Hypertension* 2005;45:477-80.

[28] Prasad VS, Palaniswamy C, Frishman WH. Endothelin as a clinical target in the treatment of systemic hypertension. *Cardiol Rev* 2009;17:181-91.

[29] Ricci I, Artacho R, Olalla M. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010;50:390-402.

[30] Ruiz-Giménez P, Burguete MC, Castelló-Ruiz M, Marcos JF, Salom JB, Vallés S, et al. Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on ACE-dependent vasoconstriction. *Int Dairy J* 2007;17:1212-5.

[31] Ruiz-Giménez P, Ibáñez A, Salom JB, Marcos JF, López-Díez JJ, Vallés S, et al. Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *J Agric Food Chem* 2010;58:6721-7.

[32] Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005;43:19-29.

[33] Schulz H, Dale GE, Karimi-Nejad Y, Oefner C. Structure of human endothelin-converting enzyme I complexed with phosphoramidon. *J Mol Biol* 2009;385:178-87.

- [34] Schweizer A, Valdenaire O, Nelböck P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 1997;328(Pt 3):871-7.
- [35] Tirapelli CR, Fecteau MH, Honore JC, Legros E, Gobeil F, D'Orleans-Juste P. Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta. *Br J Pharmacol* 2006;148:527-35.
- [36] Trapani AJ, Beil ME, Bruseo CW, De Lombaert S, Jeng AY. Pharmacological properties of CGS 35066, a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;36(Suppl 1):S40-3.
- [37] Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, et al. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *Eur J Biochem* 1999;264:341-9.
- [38] Wakabayashi H, Yamauchi K, Takase M. Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J* 2006;16:1241-51.
- [39] Williams B. The changing face of hypertension treatment: treatment strategies from the 2007 ESH/ESC hypertension Guidelines. *J Hypertens* 2009;27(Suppl 3):S19-26.
- [40] Yamada Y, Iwasaki M, Usui H, Ohinata K, Marczak ED, Lipkowski AW, et al. Rapakinin, an anti-hypertensive peptide derived from rapeseed protein, dilates mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats via the prostaglandin IP receptor followed by CCK₁ receptor. *Peptides* 2010;31:909-14.
- [41] Zhao H, Usui H, Ohinata K, Yoshikawa M. Met-Arg-Trp derived from Rubisco lowers blood pressure via prostaglandin D₂-dependent vasorelaxation in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* 2008;29:345-9.

[42] Zimmermann M, Jung CS, Vatter H, Raabe A, Seifert V. Effect of endothelin-converting enzyme inhibitors on big endothelin-1 induced contraction in isolated rat basilar artery. *Acta Neurochir (Wien)* 2002;144:1213-9.

Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: inhibition of angiotensin and endothelin-converting enzymes

Fernández-Musoles R., Salom J. B., Martinez-Maqueda D., Lopez-Diez J. J., Recio I. y Manzanares P.

Food Chemistry 139 (2013) 994-1000

ABSTRACT

The potential of bovine lactoferrin (LF) as a source of antihypertensive peptides acting on the renin-angiotensin system (RAS) and the endothelin (ET) system as dual vasopeptidase inhibitors has been examined. For this purpose enzymatic LF hydrolysates (LFHs) were generated by trypsin and proteinase K digestions and permeate fractions with molecular masses lower than 3 kDa (LFH < 3 kDa) were orally administered to spontaneously hypertensive rats (SHRs). Although both LFHs < 3 kDa showed *in vitro* angiotensin I- converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, only proteinase K LFH < 3 kDa exerted *in vivo* antihypertensive effect. The proteinase K LFH < 3 kDa and a previously characterized pepsin LFH < 3 kDa with ACE-inhibitory and antihypertensive effects were tested in *ex vivo* functional assays as inhibitors of ACE-dependent vasoconstriction. Pepsin LFH < 3 kDa but not proteinase K LFH < 3 kDa inhibited ACE-dependent vasoconstriction. When tested as inhibitors towards endothelin converting enzyme (ECE), both LFHs < 3 kDa exerted *in vitro* inhibitory effects on ECE activity and inhibited ECE-dependent vasoconstriction. Most abundant peptides in proteinase K LFH < 3 kDa were identified by using an ion trap mass spectrometer. Based on peptide abundance, two peptides (GILRPY and REPYFGY) were chemically synthesized and their ECE-inhibitory activity was tested. Both exerted *in vitro* inhibitory effects on ECE activity. In conclusion, orally effective antihypertensive LFHs < 3 kDa may act as dual vasopeptidase (ACE/ECE) or as single ECE inhibitors with different antivasoconstrictor effects depending on the protease used to release bioactive peptide sequences.

Keywords: Lactoferrin hydrolysates, renin-angiotensin system, endothelin system, vasopectidase inhibitors, ACE-dependent vasoconstriction, ECE-dependent vasoconstriction, antihypertensive effect.

INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) is the most recognized humoral system for the control of blood pressure, and its dysfunctions are involved in the pathophysiology of hypertension. Briefly, prorenin is converted to active renin by a trypsin-like enzyme. Renin cleaves angiotensinogen to form angiotensin I. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) hydrolyzes both the inactive angiotensin I into vasoconstrictor angiotensin II and the vasodilator bradykinin into an inactive metabolite leading to blood pressure upregulation (Carey & Siragy, 2003). Several antihypertensive drugs target on this system at different points of the cascade (Williams, 2009). Another peptidic system, the endothelin (ET) system, has also an increasingly recognized role in blood pressure regulation, and has also been targeted for hypertension drug treatment (Schiffrin, 2005). In the ET system, the endothelin-converting enzyme (ECE) cleaves the biologically inactive intermediate termed big ET-1 to form ET-1 which has powerful vasoconstrictor and pressor properties. Selective ECE inhibitors have been tested in preclinical rat models of hypertension (Battistini, Ayach, Molez, Blouin & Jeng, 2002). Moreover, present strategies in the search of novel classes of antihypertensive drugs include the development of single compounds capable of simultaneously inhibiting more than one enzymatic activity involved in hypertension pathophysiology (Battistini, Daull & Jeng, 2005).

In recent years interest on food protein-derived peptides with antihypertensive effects has grown as an alternative to drugs in the control of systemic blood pressure and prevention of associated cardiovascular disease events. Although ACE inhibition is the main goal of most of the antihypertensive peptides derived from food proteins, some of them are

multifunctional. In this context, enzymatic hydrolysates of food proteins have been reported to exert both ACE-inhibitory and antioxidant activities (Udenigwe & Aluko, 2010; Vastag, Popovic, Popovic, Krimer & Pericin, 2011; Rao, Sun, Liu, Zeng, Su & Yang, 2012). Also flaxseed peptide fractions inhibited both ACE and renin activities (Udenigwe, Lin, Hou & Aluko, 2009) and jellyfish protein hydrolysates showed ACE-inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities (Liu, Zhang, Zhang & Liu, 2012). Recently antithrombotic and ACE-inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* have been described (Rojas-Ronquillo et al., 2012) and two antihypertensive sequences found in a casein hydrolysate also stimulated mucin secretion in intestinal cells (Martínez-Maqueda, Miralles, de Pascual-Teresa, Reverón, Muñoz & Recio, 2012). By contrast, few studies have focused on the potential effect of food-derived peptides on the ET-system. Only pepsin digests of bonito and beef proteins were described as ECE inhibitors (Okitsu, Morita, Kakitani, Okada & Yokogoshi, 1995). Interestingly the ACE-inhibitory peptide lactokinin derived from the milk protein β -lactoglobulin can also modulate ET-1 release by endothelial cells (Maes et al., 2004).

Recently we characterized a set of peptides derived from lactoferricin B (LfcinB), the well known antimicrobial lactoferrin (LF)-derived peptide (Gifford, Hunter & Vogel, 2005), as dual vasopeptidase inhibitors since they showed inhibitory effects on ACE and ECE activities (Ruiz-Giménez et al., 2010; Fernández-Musoles et al., 2010). Moreover we have reported the *in vivo* antihypertensive effects of an ACE-inhibitory LF hydrolysate obtained by pepsin digestion (Ruiz-Giménez et al., 2012) although the effects on the ET-system were not assessed.

The main objective of the present study was to generate multifunctional LF hydrolysates with ACE and ECE inhibitory properties which could be applied as functional ingredients or as pharmaceutical products for the treatment of hypertension. For this purpose, we report the preparation of new LF hydrolysates using trypsin and proteinase K, their antihypertensive effects on spontaneously hypertensive rats (SHRs) and their evaluation as dual vasopectidase (ACE and ECE) inhibitors. Also we further characterized the ACE-inhibitory and antihypertensive pepsin digested LF hydrolysate by assessing its inhibitory effects on ECE activity and ECE-dependent vasoconstriction. Finally, the identification of the main peptides from the antihypertensive LF hydrolysate generated by proteinase K is carried out, and their potential bioactivities are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bovine LF was provided by FrieslandCampina Domo (Zwolle, The Netherlands). Porcine pepsin and trypsin (type II-S), ACE from porcine kidney, captopril, bicinchoninic acid and human ET-1 were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Angiotensin I was supplied by Calbiochem Co. (La Jolla, CA). Human big ET-1 and o-aminobenzoylglycyl-p-nitrophenylalanylproline were from Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Switzerland). Human ECE-1 was provided by R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Endothelin enzyme immunoassay (EIA) kit was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Sodium thiopental (Tiobarbital Braun®) was supplied by B. Braun Medical (Jaén, Spain). Recombinant proteinase K was purchased from Roche (Mannheim, Germany).

Lactoferrin hydrolysis and ultrafiltration of hydrolysates

Bovine LF (5% w/v) was dissolved in distilled water (pH 2.5), 20 mM Tris-HCl buffer pH 8 containing 10 mM CaCl₂ or 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 and hydrolysed using porcine pepsin (3% w/w), trypsin (1% w/w) or proteinase K (1% w/w), respectively. The reactions were performed at 37°C for 4 h (hydrolysis with pepsin; Ruiz-Giménez et al., 2007) or 37°C for 24 h (hydrolysis with trypsin or proteinase K; Abubakar, Saito, Kitazawa, Kawai & Itoh, 1998). After digestion, each hydrolysate (LFH) was heated at 80°C for 15 min to inactivate the enzymes.

LFHs were subjected to ultrafiltration through a VivaFlow 50 cassette with a 3 kDa cut-off polyethersulfone membrane (Vivascience, Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France). The permeates (LFHs < 3 kDa) were lyophilised and kept at room temperature until reconstitution with distilled water for further analyses. Protein content was estimated by the bicinchoninic acid method using bovine serum albumin as standard (Ruiz-Giménez et al., 2012).

***In vitro* assay of ACE-inhibitory effect**

In vitro ACE-inhibitory activity of LFHs < 3 kDa was measured using the fluorescent method described by Sentandreu and Toldrá (2006) based on the hydrolysis of the internally quenched fluorescent substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitrophenylalanylproline by the action of ACE.

The IC₅₀ value was defined as the peptide concentration required to inhibit 50% of the ACE activity, and the value for each experiment was estimated by non-linear regression of the experimental data to a four-parameter logistic curve using the software package SigmaPlot v 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

***In vitro* assay of ECE-inhibitory effect**

In vitro ECE-inhibitory activity of LFHs < 3 kDa and individual peptides identified in the proteinase K LFH < 3 kDa was measured using the method described by Fernández-Musoles et al. (2010) based on the hydrolysis of the natural substrate big ET-1 by the action of the recombinant human ECE-1. The

reaction product ET-1 was quantified with the endothelin EIA kit following the supplier's instructions.

Effects on ECE activity were expressed as percent of ECE activity inhibition with respect to a control without hydrolysate or peptide.

Animal welfare

Rabbits and rats were housed in temperature-controlled rooms (23°C) with 12 h light/dark cycles and consumed tap water and standard diets ad libitum. Experimental procedures were conducted in accordance with the Spanish legislation on 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' and to the Directives of the European Community on this subject. The study was approved by the 'Ethics Committee for Animal Welfare' of the Hospital 'La Fe'.

Preparation of rabbit carotid arterial segments

Thirteen male New Zealand White rabbits (Technology Transferring Center, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain), weighing 2.5–3 kg, were killed by injection of 25 mg/kg sodium thiopental and 1.5 ml of 10 mM KCl solution through the ear vein. A midline throat incision provided access to both common carotid arteries, which were dissected free and cut into four 4 mm-long segments each one. For computer-assisted isometric tension recording, the arterial segments were mounted in an organ bath containing Ringer-Locke solution (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.0 mM

MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 5.6 mM glucose), as described previously (Centeno et al., 2006).

The contractile capacity of every arterial segment was checked by exposure to 50 mM KCl Ringer-Locke solution (NaCl replaced with an equimolar amount of KCl). Carotid arteries contracting less than 1 g were discarded.

Ex vivo functional assay of ACE-inhibitory effect

Every arterial segment was challenged with a single concentration (1 μM) of angiotensin I. After washing out, each arterial segment was subjected to one of the following protocols: (i) control, a second challenge to angiotensin I to check for response reproducibility or (ii) treated, preincubation (20 min) with one of the LFHs < 3 kDa (100 μg/ml) and a second challenge to angiotensin I to check for their effect on angiotensin I-induced contraction (see Figure 1).

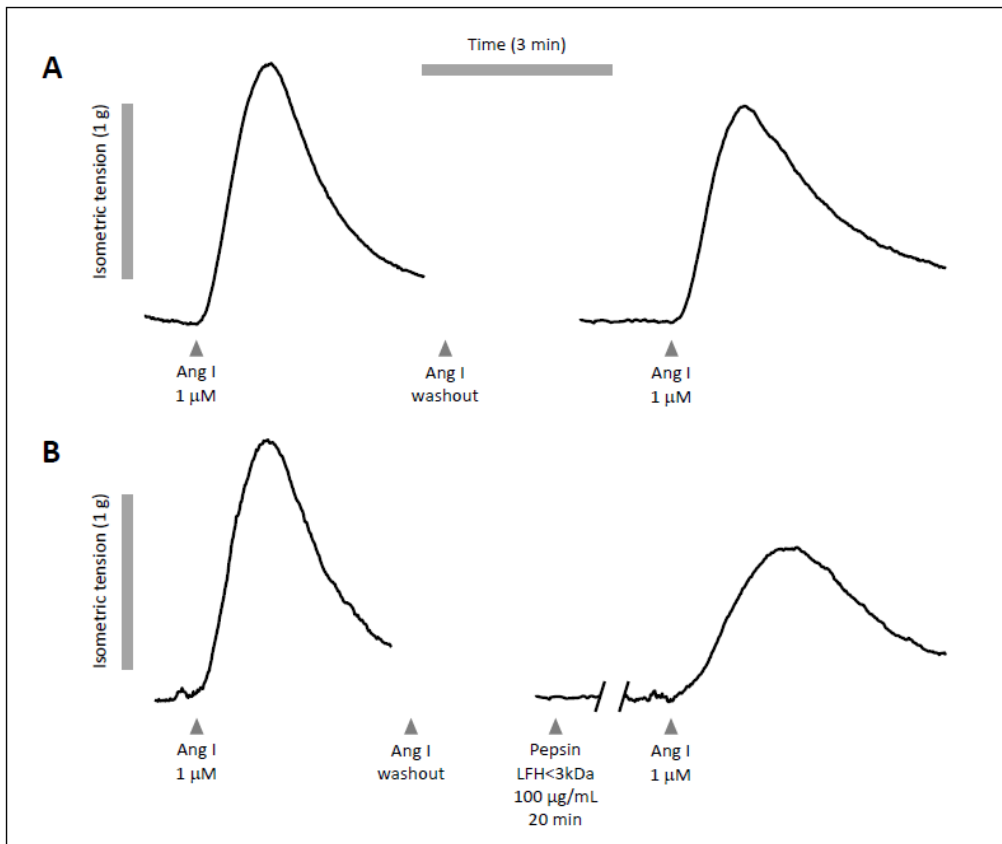


Figure 1. Contraction of carotid artery segments. (A) Reproducible vasoconstriction to angiotensin I. (B) Effect of pepsin lactoferrin hydrolysate with molecular mass lower than 3 kDa (LFH < 3 kDa) on angiotensin I-induced contraction.

***Ex vivo* functional assay of ECE inhibitory effect**

Every arterial segment was challenged with a single concentration (50 mM) of KCl. After washing out, each arterial segment was subjected to one of the following protocols: (i) a challenge to big ET-1 (0.1 μM) to obtain the

control contractile response, or (ii) preincubation (20 min) with one of the LFHs < 3 kDa (100 µg/ml) and a challenge to big ET-1 to check for their effect on big ET-1-induced contraction (see Figure 2).

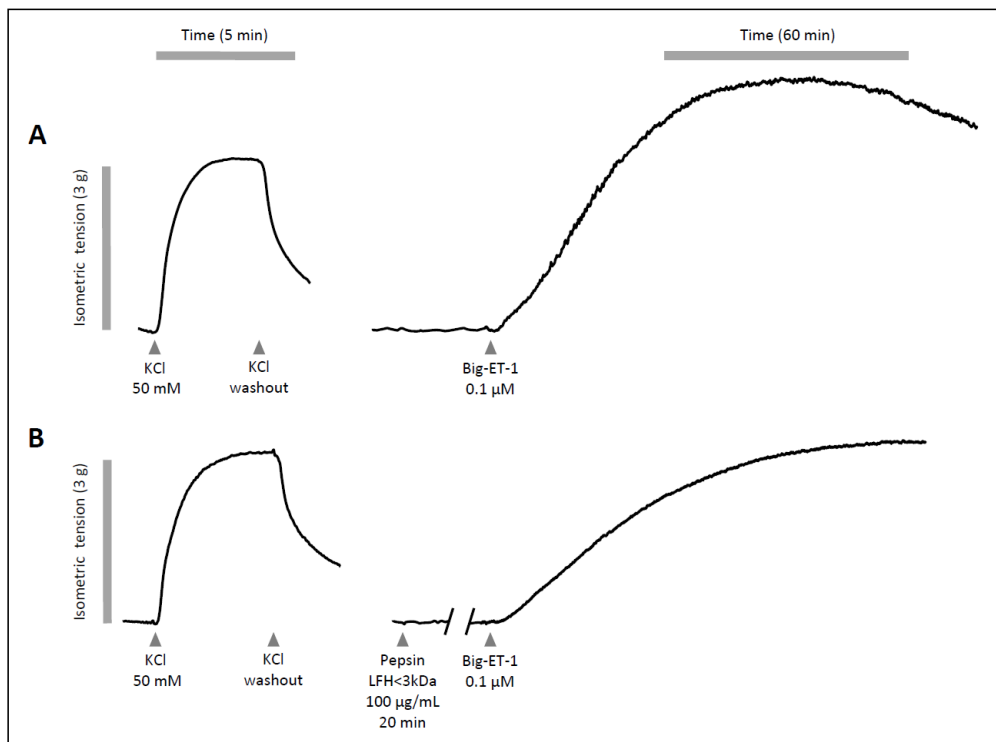


Figure 2. Contraction of carotid artery segments. (A) Vasoconstriction to high-KCl and to big endothelin-1 (big ET-1) in control conditions. (B) Effect of pepsin lactoferrin hydrolysate with molecular mass lower than 3 kDa (LFH < 3 kDa) on big ET-1-induced contraction.

***In vivo* assay of antihypertensive effect**

Twenty male SHR_s weighing 300–350 g were used, together with five male Wistar Kyoto (WKY) rats as the normotensive control (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain). Indirect measurement of systolic blood pressure (SBP) in awake restrained rats was carried out by the non-invasive tail-cuff method using computer-assisted NIPREM 645 equipment (Cibertec, Madrid, Spain) as previously described (Ruiz-Giménez et al., 2010). LFHs < 3 kDa (200 mg/kg) were orally administered by gastric intubation in 1 ml of physiological saline. The SBP was measured before peptide intake (zero time), in addition to, 1, 2, 3, 4 and 24 h after intake. Physiological saline (1 ml) and captopril (50 mg/kg) served as negative and positive controls, respectively. Each value of SBP was obtained by averaging at least three consecutive and successful measurements without disturbance of the signal.

Peptide sequencing by RP-HPLC-MS/MS

RP-HPLC-MS/MS analysis of the proteinase K LFH < 3 kDa was performed on an Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) with a Mediterranea™Sea₁₈ column (150 × 2.1 mm, 5 μm of particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain). The flow rate was 0.2 ml/min and the injection volume 50 μl. Peptides were eluted with a linear gradient of solvent B (acetonitrile with 0.027 % TFA) in A (acetonitrile with 0.037 % TFA) going from 0 to 20 % B over 15 min followed by a 40 min gradient from 20 to 45%. The HPLC system was connected on-line to an Esquire 3000 quadrupole ion trap (Bruker Daltonik GMBH, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source, as previously described (Contreras, Carrón,

Montero, Ramos & Recio, 2009). Data Analysis (version 4.0; Bruker Daltoniks) was used to process and transform spectra to representing mass values. BioTools (version 3.1; Bruker Daltoniks) was used to process the MSn spectra, to perform peptide sequencing and to calculate theoretical masses.

Main peptides identified in the proteinase K LFH < 3 kDa were ordered at >90% purity from GenScript Corporation (Piscataway, NJ) wherein they were synthesized by solid phase methods using N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. Synthetic peptide concentration was based on the dry weight of the peptides. Sequences were tested for their *in vitro* ECE-inhibitory effect.

RESULTS AND DISCUSSION

ACE-inhibitory and antihypertensive effects of lactoferrin hydrolysates

LF was hydrolysed with trypsin or proteinase K and hydrolysates were subjected to ultrafiltration through a 3 kDa cut-off membrane. The resulting permeates (LFHs < 3 kDa) inhibited ACE with IC₅₀ values of 1.3 ± 0.1 µg/ml and 6.9 ± 0.2 µg/ml for proteinase K and trypsin LFHs, respectively. ACE-inhibitory effects of LFHs were comparable to the previously reported value of a pepsin LF permeate (IC₅₀ = 14.3 ± 3.3 µg/ml) which produced a significant blood pressure lowering effect after oral administration at 200 mg/kg to SHRs (Ruiz-Giménez et al., 2012).

To further study trypsin and proteinase K permeates, their antihypertensive effects were evaluated at the same dose that the previously characterized pepsin LFH < 3 kDa (200 mg/kg). SBP, measured by the tail-cuff method in awake SHRs, was 183 ± 2 mm Hg (n = 18). As shown in Figure 3A, together with the lack of effect of oral saline and the antihypertensive effect of captopril (50 mg/kg) for comparison, oral administration of trypsin LFH < 3 kDa did not produce significant changes in SBP of SHRs.

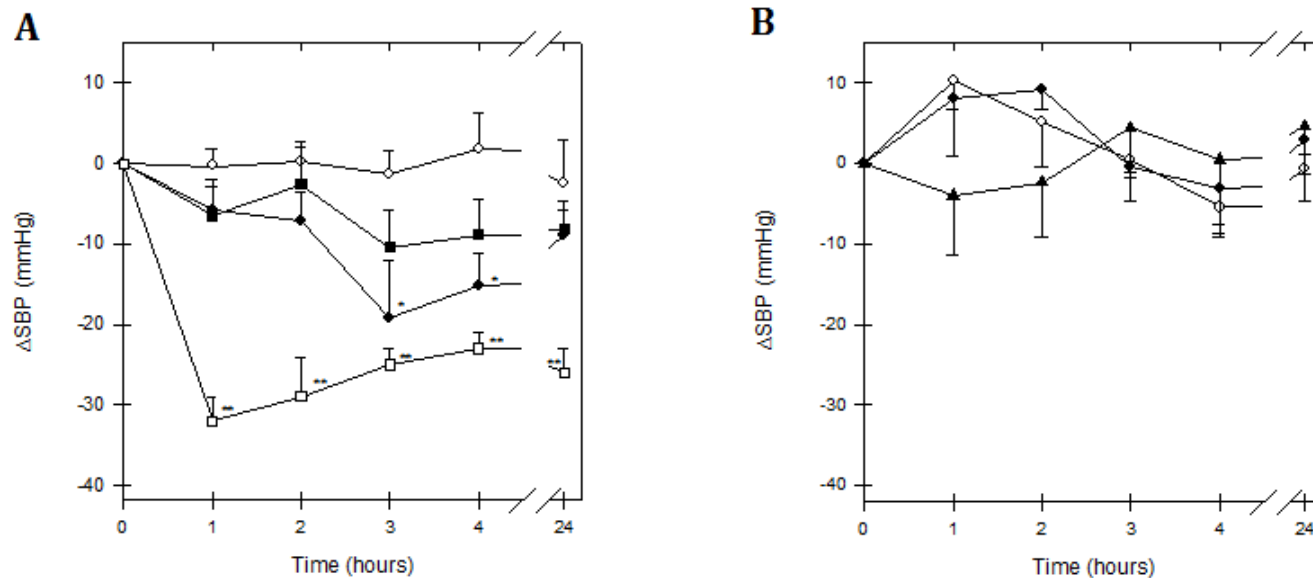


Figure 3. Time course of systolic blood pressure changes (Δ SBP) after oral administration of enzymatic lactoferrin hydrolysates with molecular masses lower than 3 kDa (LFHs < 3 kDa). (A) Effect of physiological saline (\circ), captopril (\square , 50 mg/kg), proteinase K LFH < 3 kDa (\bullet , 200 mg/kg) and trypsin LFH < 3 kDa (\blacksquare , 200 mg/kg) on SHR rats. (B) Effect of physiological saline (\circ), proteinase K LFH < 3 kDa (\bullet , 400 mg/kg) and pepsin LFH < 3 kDa (\blacktriangle , 400 mg/kg) on WKY rats. Pressure changes from baseline are expressed in absolute values (mm Hg) and data are mean \pm SEM from at least 4 determinations, * $P < 0.05$ versus control group, ** $P < 0.01$ versus control group (one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison tests).

By contrast, proteinase K LFH < 3 kDa significantly reduced SBP at 3 (-19 ± 7 mm Hg) and 4 h (-15 ± 4 mm Hg) post administration, although the effect was not maintained up to 24 h post administration as observed previously for pepsin LFH < 3 kDa (Ruiz-Giménez et al., 2012). Interestingly, the antihypertensive proteinase K LFH < 3 kDa and also that generated by pepsin had no effects in the SBP of the normotensive control WKY rat strain. WKY rats showed SBP of 109 ± 5 mm Hg (n = 6) and oral administration of LFHs < 3 kDa at the same dose administered to SHR and also at a higher dose (400 mg/kg) did not show significant hypotensive effects. Figure 3B shows the lack of effects of saline and both LFHs < 3 kDa after oral administration at a dose of 400 mg/kg. These results may suggest that the effects of both LFHs are specific to the hypertensive state and it could be expected a lack of arterial blood pressure effects in normotensive human subjects.

The antihypertensive effects of the LFHs < 3 kDa in SHR did not correlate with their *in vitro* ACE effects as outlined by other authors for food-derived peptides (Li, Le, Shi & Shrestha, 2004; Vermeirssen, van Camp & Verstraete, 2004). Abubakar et al. (1998) described digests of whey protein which showed strong ACE-inhibitory activity but no antihypertensive effect in SHR and conversely digests with weak ACE-inhibitory activity but a strong decreasing effect of SBP. We have also described the lack of antihypertensive effect in SHR of *in vitro* ACE-inhibitory lactoferricin B-derived peptides (Ruiz-Giménez et al., 2010). The low bioavailability of *in vitro* ACE-inhibitory peptides following oral administration may be the cause for the lack of antihypertensive effect *in vivo* and, on the contrary, peptide degradation or fragmentation during gastrointestinal digestion or vascular circulation may result in more potent ACE-inhibitory activities (Vermeirssen et al., 2004). It has been suggested that some milk derived peptides do not act directly as

acute ACE inhibitors *in vivo* but through other pathways (Fuglsang, Nilsson & Nyborg, 2003). Another explanation is linked to the dual action of ACE which apart of converting angiotensin I in angiotensin II, inactivates bradykinin, a potent vasodilator that stimulates NO release and prostacyclin production in the endothelium (Rousseau-Ralliard et al., 2010).

***Ex vivo* inhibitory effects of lactoferrin hydrolysates on ACE-dependent vasoconstriction**

To add functional evidence for the ACE-inhibitory effect underlying the antihypertensive effect of proteinase K LFH < 3 kDa, *ex vivo* experiments using isolated rabbit carotid arteries were carried out. Pepsin LFH < 3 kDa was also included in the study to further characterize its potential mechanism of action. We have previously reported that angiotensin I induces ACE-dependent vasoconstriction in the rabbit isolated carotid artery, as supported by the inhibition of angiotensin I-induced, but not angiotensin II-induced contractions with the ACE inhibitor captopril (Centeno et al., 2006). In the present study, challenge of the arterial segments with depolarizing solution (KCl 50 mM) induced contraction averaging 3921 ± 224 mg ($n = 41$). Angiotensin I (1 μ M) induced phasic, transient contractions almost completely reproducible (83 ± 6 %, $n = 13$) in two consecutive challenges to the same arterial segment (Figure 2A). The inhibitory effects of pepsin and proteinase K LFHs < 3 kDa on ACE-mediated, angiotensin I-induced vasoconstriction were assessed as shown in the representative recording of Figure 2B. In a previous work, we reported significant inhibition on angiotensin I-induced vasoconstriction by a non-ultrafiltered pepsin LFH although it was only achieved at a concentration of 1350 μ g/ml (Ruiz-Giménez et al., 2007). Here,

as summarized in Table 1, pepsin LFH < 3 kDa induced significant inhibition when compared to that of control (29% response reduction over the control conditions) at a concentration of 100 µg/ml pointing out that the *ex vivo* ACE-inhibitory effect may be mainly attributable to peptide components with molecular masses lower than 3 kDa. By contrast, proteinase K LFH < 3 kDa did not show any significant effect on ACE-dependent vasoconstriction.

Table 1. Effects of proteinase K and pepsin lactoferrin hydrolysates with molecular masses lower than 3 kDa (LFHs < 3 kDa) on arterial contractions induced by angiotensin I (ACE dependent vasoconstriction) and by big ET-1 (ECE dependent vasoconstriction).

LFH < 3 kDa (100 µg/ml)	Angiotensin-I (1µM) Contraction (%) ^a	big ET-1 (0.1 µM) Contraction (%) ^b
Control	83 ± 6 (13)	146 ± 13 (19)
Proteinase K	79 ± 5 (13)	115 ± 4* (18)
Pepsin	59 ± 4* (15)	101 ± 7** (18)

^aSecond contraction response to angiotensin I expressed as the percentage of the first contraction in the same arterial segment.

^bContraction response to big ET-1 expressed as percentage of previous KCl-induced contraction.

Data are mean ± SEM from n arterial segments. *Significantly different from control, P<0.05. **Significantly different from control, P<0.01. One-way ANOVA followed by Dunnet's multiple comparison tests.

We have described inhibitory effects on ACE dependent vasoconstriction (response reductions over the control conditions up to 30 %) for lactoferricinB-derived peptides (Ruiz-Giménez et al., 2010) and also for the

peptide sequences RPYL and LIWKL (response reductions of 14 and 22%, respectively) identified in the pepsin LFH < 3 kDa (Ruiz-Giménez et al., 2012).

Similar results to those obtained here with proteinase K LFH < 3 kDa were described for trypsin hydrolysates from casein, which induced inhibition of ACE but failed to modify angiotensin I-induced aortic ring vasoconstriction (Rousseau-Ralliard et al., 2010). Although proteinase K LFH < 3 kDa inhibited ACE *in vitro* and showed a moderate *in vivo* effect, *ex vivo* results suggest a mechanism for the antihypertensive effect other than ACE-dependent vasoconstriction. By contrast, the antihypertensive effect of pepsin LFH < 3 kDa may be due to *in vivo* ACE inhibition and subsequent reduction of angiotensin I-induced vascular tone.

Inhibitory effects of lactoferrin hydrolysates on ECE activity and ECE-dependent vasoconstriction

In order to investigate the potential effects of proteinase K and pepsin LFHs on the endothelin system, *in vitro* assays of ECE-inhibitory activity and functional *ex vivo* assays of inhibitory effect on ECE-dependent vasoconstriction were carried out. With respect to *in vitro* assays, both hydrolysates showed significant ECE-inhibitory effects in a concentration-dependent manner, as summarized in Table 2.

Table 2. Effects of proteinase K and pepsin lactoferrin hydrolysates with molecular masses lower than 3 kDa (LFHs < 3 kDa) and selected proteinase K LF-derived peptides on endothelin-converting enzyme (ECE) activity.

	Concentration ^a	ECE inhibition ^b
Proteinase K LFH < 3 kDa	500	98 ± 1**
	100	92 ± 0**
	10	71 ± 2**
Pepsin LFH < 3 kDa	500	61 ± 1**
	100	31 ± 1**
	10	7 ± 4
GILRPY	300	52 ± 4**
	100	36 ± 7**
	30	13 ± 1*
REPYFGY	300	40 ± 4**
	100	29 ± 2**
	30	23 ± 3**

^aConcentration of LFHs < 3 kDa (µg/ml) and peptides (µM) in the assay. ^bInhibition of ECE activity (%) expressed as mean ± SEM of at least three replicates.

*Significant inhibition respect to control, P<0.05; ** Significant inhibition respect to control, P<0.01 (Student's t-test on un-shown absolute values of ECE activity).

At the maximum concentration tested (500 µg/ml) proteinase K LFH < 3 kDa practically abolished (98% inhibition) big ET-1 conversion, while pepsin LFH < 3 kDa induced inhibition of ECE activity by approximately 60%. Only bonito and beef protein digests have been reported to exert 40-45 % ECE inhibition (Okitsu et al., 1995).

To add functional evidence for the ECE-inhibitory effect underlying antihypertensive effects of proteinase K and pepsin LFH < 3 kDa, both hydrolysates were evaluated for ECE inhibition in vascular tissue using an *ex vivo* assay. We have previously reported that big ET-1 induces ECE-dependent vasoconstriction in the rabbit isolated carotid artery, as supported by the inhibition of big ET-1-induced, but not ET-1-induced contractions with the ECE inhibitor phosphoramidon (Fernández-Musoles et al., 2010). In the present study, challenge of arterial segments with a depolarizing solution (50 mM KCl) induced contraction averaging 3212 ± 179 mg (n= 55). Big ET-1 (0.1 μ M) induced slow contraction with maximum effect reached at 80 ± 5 min and amounting to 146 ± 13 % relative to previous response to KCl (n= 19) (Figure 3A). The inhibitory effects of LFHs on ECE-mediated, big ET-1-induced vasoconstriction were assessed as shown in the representative recording of Figure 3B. As summarized in Table 1, both hydrolysates induced inhibition when compared to control vasoconstriction, with significant reductions in the magnitude of the contraction. In a previous report, we also found inhibition of ECE-mediated vasoconstriction by several LfcinB-derived peptides when assayed at 30 μ M. Moreover we found a good positive correlation between the inhibitory effects of LfcinB-derived peptides observed *in vitro* on ECE activity and inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction (Fernández-Musoles et al., 2010). Here, in contrast to *in vitro* assays of inhibitory effect, pepsin LFH < 3 kDa induced higher inhibition of vasoconstriction than that produced by the proteinase K LFH < 3 kDa. This apparent discrepancy could be related to methodological aspects since the *in vitro* assay was carried out with recombinant human ECE-1, while rabbit arteries were used in the *ex vivo* test. Also enzymatic pathways involved in ET-1 production by isolated vessels are more complex than the simple *in vitro* reaction. In fact several enzymes

apart from ECE have been described to produce ET-1 from big ET-1 in rabbit aorta (Tirapelli, Fecteau, Honore, Legros, Gobeil & D'Orleans-Juste, 2006). Further studies are needed to elucidate this discrepancy.

Results from ACE and ECE inhibition in vascular tissue show the inhibitory ability of pepsin LFH < 3 kDa on both enzymes, suggesting dual ACE and ECE inhibition as mechanisms involved in the antihypertensive effect observed in SHR. On the contrary, ECE inhibition seems to be the mechanism involved in the moderate antihypertensive effect of proteinase K LFH < 3 kDa. Recently, the antihypertensive effects in SHR of flaxseed protein-derived arginine-containing peptides have been explained by the increase of arginine concentration with the concomitant increase in endogenous NO levels (Udenigwe, Adebisi, Doyen, Li, Bazinet & Aluko, 2012). These peptides also exhibited moderate *in vitro* inhibitory activity against ACE and a weak renin-inhibitory activity.

Identification of major peptides from proteinase K LFH < 3 kDa and potential bioactivity of released peptides

Analysis of proteinase K LFH < 3 kDa by HPLC-MS/MS allowed the identification of 37 peptides (Table 3).

Table 3. Identification of peptides contained in the proteinase K lactoferrin hydrolysate with molecular mass lower than 3 kDa (LFH < 3 kDa).

Observed mass ^a	Theoretical mass	Protein fragment	Identified sequence
785.5	785.47	f(28-35)	KLGAPSIT
1399.8	1399.76	f(66-77)	EAGRDPYKLRPV
1199.8	1199.68	f(68-77)	GRDPYKLRPV
983.6	983.48	f(83-91)	GTKESPQTH
825.5	825.40	f(85-91)	KESPQTH
877.6	877.50	f(97-104)	VVKKGSNF
717.5	717.42	f(130-135)	GILRPY ^b
830.6	830.50	f(130-136)	GILRPYL
930.5	930.42	f(186-192)	REPYFGY ^b
731.4	731.31	f(200-207)	QDGAGDVA
969.5	969.52	f(208-215)	FVKETTVF
799.5	799.41	f(216-222)	ENLPEKA
670.5	670.37	f(217-222)	NLPEKA
695.3	695.29	f(223-227)	DRDQY
824.4	824.33	f(223-228)	DRDQYE
937.5	937.41	f(223-229)	DRDQYEL
1050.6	1050.50	f(223-230)	DRDQYELL
443.4	443.29	f(255-258)	VVAR
1160.7	1160.57	f(259-268)	SVDGKEDLIW
1185.8	1185.61	f(290-300)	GSPPGQRDLLF
944.6	944.51	f(293-300)	PGQRDLLF
471.3	471.28	f(309-312)	RIPS
698.5	698.44	f(309-314)	RIPSKV
971.6	971.54	f(309-317)	RIPSKVDSA

759.5	759.42	f(329-334)	KNLRET
801.5	801.43	f(335-341)	AEEVKAR
718.4	718.33	f(443-448)	NEGLTW
643.4	643.34	f(468-473)	NIPMGL
654.4	654.33	f(492-498)	APGADPK
774.5	774.34	f(534-541)	AEDVGDVA
630.5	630.35	f(560-564)	WAKNL
728.5	728.42	f(578-583)	RKPVTE
799.6	799.46	f(578-584)	RKPVTEA
486.2	486.26	f(652-656)	GGRPT
778.5	778.36	f(652-658)	GGRPTYE
1070.5	1070.47	f(652-660)	GGRPTYEEY
873.5	873.38	f(657-663)	YEEYLG T

^aCalculated monoisotopic mass. ^bChemically synthesized peptides are labelled in bold.

Proteinase K exhibits specificity for peptide bonds adjacent to the carboxylic group of aliphatic and aromatic amino acids (Ebeling, Henrich, Klockow, Metz, Orth & Lang, 1974). We have identified different peptides having at the C-terminus these residues such as alanine (A), valine (V), leucine (L), tyrosine (Y), phenylalanine (F) and tryptophan (W). The presence of some of these amino acids in ultimate position fulfil the rule proposed by Cheung, Wang, Ondetti, Sabo and Cushman (1980) about residues being preferred for ACE inhibitors and substrates. These sequences could explain the *in vitro* ACE-inhibitory activity of proteinase K LFH < 3kDa ($IC_{50} = 1.3 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$) although as we have shown here the hydrolysate did not show inhibition of ACE-related vasoactive effects. Few LF-derived peptides with ACE-inhibitory and antihypertensive effects have been isolated from enzymatic digests.

Peptide sequences RPYL [f(133-136)], LIWKL [f(266-270)], LNNSRAP [f(232-238)] and LRPVAA [f(74-79)] isolated from pepsin LFHs were shown as having antihypertensive properties (Ruiz-Giménez et al., 2012; Lee, Cheng, Enomoto & Nakamura, 2006). None of these previous peptide sequences were identified in the present study. Only the peptide RPYL has been identified as part of the sequences GILRPY and GILRPYL found in the proteinase K LFH < 3 kDa.

In contrast to ACE inhibitors, there is no information available about the relationship between amino acid sequence and ECE inhibitory effects. For the LfcinB-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction we could not establish these relationships taken into account *in vitro* and *ex vivo* data (Fernández-Musoles et al., 2010). None of these LfcinB-derived sequences were identified in the proteinase K LFH < 3 kDa. With the aim of identifying those peptide sequences able to inhibit ECE, two of the most abundant peptides identified in the proteinase K LFH < 3 kDa, fragments f(130-135) [GILRPY] and f(186-192) [REPYFGY], were chemically synthesized and their *in vitro* ECE-inhibitory activity was tested. As summarized in Table 2, both peptides showed significant ECE-inhibitory effects at the three concentrations assayed, with a maximum inhibition of 52% and 40 % for GILRPY and REPYFGY, respectively. Results at 30 μ M are in the low range of inhibition described for LfcinB-derived peptides which showed significant ECE-inhibitory effects ranging from 19 % to 86 % (Fernández-Musoles et al., 2010). In endothelial cells, the presence of 1 mM lactokinin provoked a 29 % reduction of ET-1 release (Maes et al., 2004). Whether only the two main sequences identified are responsible for the observed ECE inhibiting and antihypertensive effects of proteinase K LFH < 3 kDa requires further characterization studies.

CONCLUSIONS

Bovine LF is a source of antihypertensive peptides which can be released by controlled enzymatic hydrolysis. We have shown that LFHs of molecular mass lower than 3 kDa exert antihypertensive effects in SHR rats suggesting their potential application as constituents of functional foods in the treatment of hypertension. Moreover, these hydrolysates do not show hypotensive effects in normotensive rats. Data reported here demonstrate that pepsin LFH is a dual vasopeptidase (ACE/ECE) inhibitor with antivasoconstrictor effects whereas ECE would be the functional target of proteinase K LFH. Future efforts will be directed to establish the long-term effects of LFHs on the arterial blood pressure in SHR rats and clarify their *in vivo* ACE- and ECE-inhibitory effects.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants AGL2007-64672/ALI and AGL2010-21009 from 'Ministerio de Educación y Ciencia - FEDER', Consolider Ingenio 2010, Fun-C-Food, CSD2007-00063, and RETICS RD06/0026/0006 from 'Instituto de Salud Carlos III'. R. Fernández-Musoles is recipient of a fellowship from 'Ministerio de Educación y Ciencia' (BES-2008-004472). We thank S. Ruiz-Piquer for her technical assistance.

REFERENCES

Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., & Itoh, T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81, 3131-3138.

Battistini, B., Ayach, B., Molez, S., Blouin, A., & Jeng, A. Y. (2002). Effects of benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, combined with CGS 35066, a selective endothelin-converting enzyme inhibitor, on arterial blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science (London)*, 103 (Supplement 48), 363S-366S.

Battistini, B., Daull, P., & Jeng, A. Y. (2005). CGS 35601, a triple inhibitor of angiotensin converting enzyme, neutral endopeptidase and endothelin converting enzyme. *Cardiovascular Drug Review*, 23, 317-30.

Campbell, D. J. (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35, 784-791.

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

Centeno, J. M., Burguete, M. C., Castelló-Ruiz, M., Enrique, M., Vallés, S., Salom, J. B., Torregrosa, G., Marcos, J. F., Alborch, E., & Manzanares, P. (2006). Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5323-5329.

Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme: importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.

Contreras, M. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal* 19, 566-573.

Ebeling, W., Henrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry*, 47, 91-97.

Fernández-Musoles, R., López-Díez, J. J., Torregrosa, G., Vallés, S., Alborch, E., Manzanares, P., & Salom, J. B. (2010). Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction. *Peptides*, 31, 1926-1933.

Fuglsang, A., Nilsson, D., & Nyborg, N. C. (2003). Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 18, 407-412.

Gifford, J. L., Hunter, H. N., & Vogel, H. J. (2005). Lactoferricin, a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2588-2598.

Lee, N-Y., Cheng, J-T., Enomoto, T., & Nakamura, I. (2006). The antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide containing in bovine lactoferrin. *Chinese Journal of Physiology*, 49, 67-73.

Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H., & Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, 24, 469-486.

Liu, X., Zhang, M., Zhang, C., & Liu, C. (2012). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*, 134, 2134-2140.

Maes, W., van Camp, J., Vermeirssen, V., Hemeryck, M., Ketelslegers, J. M., Schrezenmeir, J., van Oostveldt, P., & Huyghebaert, A. (2004). Influence of the

lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118, 105-109.

Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., de Pascual-Teresa, S., Reverón, I., Muñoz, R., & Recio, I. (2012). Food-derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 8600-8605.

Okitsu, M., Morita, A., Kakitani, M., Okada, M., & Yokogoshi, H. (1995). Inhibition of the endothelin-converting enzyme by pepsin digests of food proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 325-326.

Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y., & Yang, Y. (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from *in vitro* digestion hydrolysates of hen egg white lysozyme. *Food Chemistry*, 135, 1245-1252.

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

Rousseau-Ralliard, D., Goirand, F., Tardivel, S., Lucas, A., Algaron, F., Mollé, D., Robert, V., Auchère, D., Boudier, J.-F., Gaillard, J.-L., Monnet, V., Tauzin, J., & Grynberg, A. (2010). Inhibitory effect of α S1- and α S2-casein hydrolysates on angiotensin I-converting enzyme in human endothelial cells *in vitro*, rat aortic tissue *ex vivo*, and renovascular hypertensive rats *in vivo*. *Journal of Dairy Science*, 93, 2906-2921.

Ruiz-Giménez, P., Burguete, M. C., Castelló-Ruiz, M., Marcos, F., Salom, J. B., Vallés, S., Torregrosa, G., Alborch, E., & Manzanares, P. (2007). Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on ACE-dependent vasoconstriction. *International Dairy Journal*, 17, 1212-1215.

Ruiz-Giménez, P., Ibáñez, A., Salom, J. B., Marcos, J. F., López-Díez, J. J., Vallés, S., Torregrosa, G., Alborch, E., & Manzanares, P. (2010). Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6721-6727.

Ruiz-Giménez, P., Salom, J. B., Marcos, J. F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Torregrosa, G., Alborch, E., & Manzanares, P. (2012). Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: identification of novel active peptides. *Food Chemistry*, 131, 266-273.

Sentandreu, M. A., & Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546-554.

Schiffrin, E. L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology*, 43, 19-29.

Tirapelli, C. R., Fecteau, M. H., Honore, J. C., Legros, E., Gobeil, F., & D'Orleans-Juste, P. (2006). Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta. *British Journal of Pharmacology*, 148, 527-35.

Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Antioxidant and angiotensin converting enzyme inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high Fischer ratio peptide mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4762-4768.

Udenigwe, C. C., Adebisi, A. P., Doyen, A., Li, H., Bazinet, L., & Aluko, R. E. (2012). Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chemistry*, 132, 468-475.

Udenigwe, C. C., Lin, Y-S., Hou, W-C., & Aluko, R. E. (2009). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *Journal of Functional Foods*, 1, 199-207.

Vastag, Z., Popovic, L., Popovic, S., Krimer, V., & Pericin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316-1321.

Vermeirssen, V., van Camp, J., & Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, 92, 357-366.

Williams, B. (2009). The changing face of hypertension treatment: treatment strategies from the 2007 ESH/ESC hypertension Guidelines. *Journal of Hypertension*, 27 (Supplement 3), S19-S26.

***In vivo* angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats**

Fernández-Musoles R., Manzanares P., Burguete M. C., Alborch E. y Salom J. B.

Food Research International 54 (2013) 627-632

ABSTRACT

We evaluated the effect of long-term intake of a bovine lactoferrin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa) on the progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats and its *in vivo* mechanism of action. Male spontaneously hypertensive rats received tap water (negative control), captopril (positive control, 76 mg/kg/day), LFH<3 kDa (285 mg/kg/day), or LFH<3 kDa (782 mg/kg/day). Twice a week, systolic blood pressure, body weight and liquid intake were measured. Blood components of the renin-angiotensin system were determined. Systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats receiving water increased along the 24-day follow-up period, while systolic blood pressure around or slightly below baseline was maintained in both LFH<3 kDa treated groups. The antihypertensive effects appeared earlier in the high-dose than in the low-dose group. There were no differences in body weight gain between the groups but liquid intake increased in rats treated with high-dose LFH<3 kDa. There were reductions of circulating angiotensin I-converting enzyme activity, angiotensin II and aldosterone levels, as well as a compensatory increase of renin activity after LFH<3 kDa intake. Our results support angiotensin I-converting enzyme inhibition as *in vivo* mechanism for the antihypertensive effect of long-term oral administration of LFH<3 kDa to spontaneously hypertensive rats and its potential application as a nutraceutical approach for hypertension treatment.

Keywords: Bovine lactoferrin, milk protein hydrolysate, antihypertensive peptides, renin-angiotensin system, *in vivo* ACE inhibition, spontaneously hypertensive rat

INTRODUCTION

The renin-angiotensin system (RAS) is one of the main targets for the treatment of hypertension. Its inhibition at three possible levels, angiotensin I-converting enzyme (ACE), upstream renin activity or downstream angiotensin receptors, is the pharmacological basis for commonly used antihypertensive drugs (Fragasso, Maranta, Montanaro, Salerno, Torlasco, & Margonato, 2012). ACE inhibition is also the most aimed target for antihypertensive food-derived peptides developed as an alternative to drugs (Hong, Ming, Yi, Zhanxia, Yongquan, & Chi, 2008). However, the well established *in vitro* inhibitory effect of those peptides on ACE activity contrasts with the limited *in vivo* evidence available for the mechanism of action underlying their blood pressure modulating effect. In fact increasing evidence is being provided that different mechanisms, other than ACE inhibition, are involved in the antihypertensive effect exerted by many of the food-derived peptides (Hernández-Ledesma, Contreras, & Recio, 2011).

Milk is the main source of antihypertensive ACE-inhibitory peptides reported to date, and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats (SHRs) of mainly casein-derived peptides have been reported during the last two decades (Martínez-Maqueda, Miralles, Recio, & Hernández-Ledesma, 2012). In contrast to casein, there was much less information about the potential of milk whey proteins as sources of antihypertensive peptides when some years ago we focused on the whey protein lactoferrin (LF) (González-Chávez, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2009). We have shown that peptides derived from different regions of LF sequence, including some derived from the well-known antimicrobial LF-derived peptide lactoferricin B (LfcinB) (Wakabayashi, Takase, & Tomita, 2003), had inhibitory effects on *in vitro* ACE

activity and *ex vivo* angiotensin I-induced ACE-dependent vasoconstriction and were orally effective antihypertensive peptides in SHR (Centeno et al., 2006; Ruiz-Giménez et al., 2010, 2012). Moreover we have also described the inhibitory effects of a LF pepsin hydrolysate (LFH) on ACE activity and ACE-dependent vasoconstriction (Ruiz-Giménez et al., 2007) and showed orally antihypertensive effect of the ultrafiltered hydrolysate (LFH<3 kDa) in SHR after short-term treatment (Ruiz-Giménez et al., 2012). By contrast LFH<3 kDa did not modify the arterial blood pressure of normotensive Wistar-Kyoto rats (Fernández-Musoles et al., 2013), suggesting the potential application of the hydrolysate as constituent of functional foods in the treatment of hypertension. However, the antihypertensive effect of long-term administration of LFH<3 kDa has not yet been investigated and, although its ACE inhibitory effect has been shown *in vitro*, the *in vivo* mechanism of action for the antihypertensive effect of LFH<3 kDa remains unclear. In fact we have shown that LFH<3 kDa acted as dual vasopeptidase inhibitor since, in addition to ACE, it inhibits endothelin-converting enzyme (ECE), a key enzyme of the endothelin system also involved in vascular tone and blood pressure regulation (Fernández-Musoles et al., 2013).

The main objective of the present study was to evaluate the effect of long-term intake of LFH<3 kDa on the progression of hypertension in SHR, and to assess the *in vivo* effect of LFH<3 kDa on ACE by determining blood ACE and renin activities as well as angiotensin II and aldosterone levels. Secondary objectives were to analyze the effects of LFH<3 kDa on body weight and liquid intake.

MATERIALS AND METHODS

Lactoferrin hydrolysis and ultrafiltration of the hydrolysate

Bovine LF (FrieslandCampina Domo, Zwolle, The Netherlands) was dissolved in distilled water at 5% (w/vol; pH 3) and hydrolysed using porcine pepsin (3 % w/w, 2540 units/mg solid; Sigma-Aldrich Química, Tres Cantos, Madrid, Spain) at 37°C for 4 h, as described previously (Ruiz-Giménez et al., 2007). LF hydrolysate (LFH) was subjected to ultrafiltration through a VivaFlow 50 crossflow cassette with 3 kDa cut-off polyethersulfone membrane (Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, France), and the resulting permeate (LFH<3 kDa) was freeze-dried and kept at room temperature until use. LFH<3 kDa was subjected to determinations of: (1) protein content by the bicinchoninic acid method (BCA; Sigma-Aldrich Química) using bovine serum albumin as standard; (2) ACE-inhibitory potency (IC₅₀) using the *in vitro* assay described by Sentandreu and Toldrá (2006) as previously reported (Ruiz-Giménez et al., 2012); (3) glucose content using the D-glucose enzymatic UV-method (R-Biofarm AG, Darmstadt, Germany); and (4) reducing sugar content, expressed as glucose equivalents, using the Nelson-Somogyi colorimetric method (Somogyi, 1952).

In vivo assay of antihypertensive effect

Experimental procedures were conducted in accordance with the Spanish legislation on 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' and the study was approved by the 'Ethics Committee for Animal Welfare' of the Hospital La Fe to be carried out in its accredited animal research facility.

Male seven-week old spontaneously hypertensive rats (SHRs) were supplied by Charles River España (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain). Rats were housed in temperature-controlled rooms (23°C) with 12 h light/dark cycles, and consumed tap water and standard diet ad libitum. A two-week period of acclimatization was allowed to recover from the stress associated with transportation (Obernier & Baldwin, 2006). Then, the rats were subjected to a second two-week period of habituation to the blood pressure measuring equipment in which twice a week body weight measurement was initiated, and to a third two-week period in which measurements of liquid intake and blood pressure were carried out to obtain basal values before starting the different treatments. So, the rats were thirteen-week old when randomly divided in the different treatment groups. A first group of twelve rats was randomly divided in three drinking treatment subgroups receiving during 24 days: tap water (negative control, n=4); captopril (Sigma-Aldrich Química, 76 mg/kg/day, positive control, n=4); or LFH<3 kDa (285 mg/kg/day, n=4). A second group of eight rats was divided in two treatment subgroups receiving during 18 days: tap water (negative control, n=4); or LFH<3 kDa (782 mg/kg/day, n=4). Intended treatment doses were estimated taking into account the short-term effects of single oral administration of captopril and LFH<3 kDa to SHRs (Ruiz-Giménez et al., 2012). Liquid intake was recorded along the treatments twice a week and used to post hoc calculation of actual average treatment doses from the concentrations in drinking water and the volumes drunk.

Indirect measurement of systolic blood pressure (SBP) in awake restrained rats was carried out twice a week by the non-invasive tail-cuff method using computer-assisted Non-Invasive Blood Pressure equipment (LE5001 unit with LE5160R cuff & transducer, Panlab Harvard Apparatus, Cornellá, Barcelona,

Spain). This method has been validated with direct intra-arterial measurements (Ibrahim, Berk, & Hughes, 2006). Before the measurements, rats were kept at 37°C during 15 min to make the pulsations of the tail artery detectable. Each determination of SBP was obtained by averaging three consecutive and successful measurements without disturbance of the signal. Changes in SBP were calculated as the absolute difference (in mmHg) with respect to the basal values of measurements obtained just before starting the treatments.

Determination of blood components of the renin-angiotensin system

At the end of the treatments, rats were anaesthetized by intraperitoneal injection of 5 mg/kg diazepam (Valium, Roche Farma, Madrid, Spain) and 100 mg/kg ketamine (Ketolar, Parke-Davis, Alcobendas, Madrid, Spain). Blood samples were collected from the abdominal aorta to obtain both serum and plasma which were kept frozen at -80°C until the determination of renin and ACE activities, as well as angiotensin II and aldosterone levels.

Quantitative *in vitro* determination of renin activity was carried out by using the GammaCoat® Plasma Renin Activity ¹²⁵I RIA Kit (DiaSorin, Stillwater, Minnesota, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, it involves an initial incubation of plasma to generate angiotensin I, followed by quantitation of generated angiotensin I by a competitive binding radioimmunoassay using [¹²⁵I] angiotensin I tracer and a rabbit antibody against angiotensin I immobilized onto coated tubes.

Direct quantitative *in vitro* determination of ACE activity was carried out by using the Bühlmann ACE colorimetric kit (Bühlmann Laboratories,

Schönenbuch, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Briefly, it is a kinetic enzymatic assay in which ACE catalyses the cleavage of the synthetic substrate (FAPGG) into an amino acid derivative and a dipeptide. The kinetic of this cleavage reaction is measured by recording the decrease in absorbance at 340 nm.

Quantitative *in vitro* measurement of angiotensin II was carried out by using the AssayMax Angiotensin II ELISA kit (AssayPro, Saint Charles, Missouri, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, this assay employs a quantitative sandwich enzyme immunoassay technique in which a polyclonal antibody specific for angiotensin II is pre-coated onto a microplate. The angiotensin II in standards and samples is sandwiched by the immobilized antibody and biotinylated polyclonal antibody specific for angiotensin II, which is recognized by a streptavidin-peroxidase conjugate. A peroxidase enzyme substrate is added and intensity of developed color is measured.

Quantitative *in vitro* measurement of aldosterone was carried out by using the Coat-A-Count Aldosterone ¹²⁵I RIA kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, it is a solid-phase radioimmunoassay, based on aldosterone-specific antibody immobilized to the wall of the assay tube. ¹²⁵I-labelled aldosterone competes for a fixed time with aldosterone in the sample for antibody sites.

Statistics

Data are mean \pm SEM. Either Student's unpaired t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Student-Newman-Keuls multiple comparisons test were used to compare variables. Correlation

analysis followed by linearity runs test were used for assessing two variable relationships. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

The ultrafiltered lactoferrin hydrolysate

LFH<3 kDa obtained after the hydrolysis and ultrafiltration procedures had an average protein content of 32.8 ± 6.7 mg/mL and showed an *in vitro* ACE-inhibitory potency (IC_{50}) of 9.4 ± 1.2 μ g/mL (Fig. 1). The LFH<3 kDa solution given to the SHR (4 mg protein/mL) had a reducing sugars content, expressed as glucose equivalents, of 15.3 ± 1.0 μ g/mL, and specific glucose levels below the detection limit of the assay (0.4 μ g/mL).

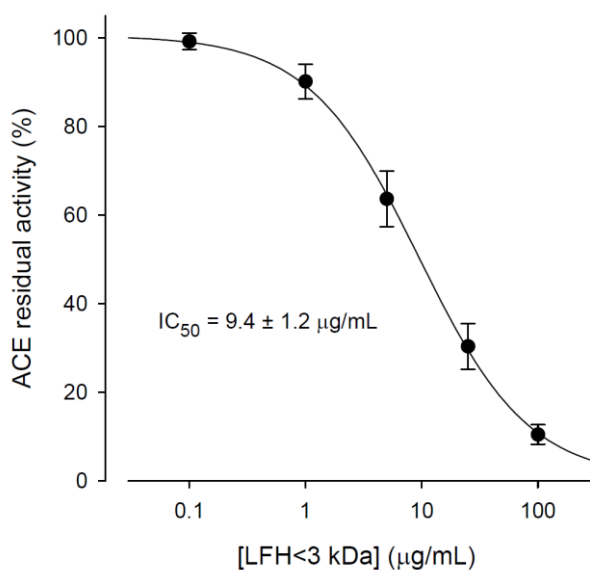


Figure 1. Effect of increasing concentrations of bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa) on *in vitro* angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity. Data are mean \pm SEM from 4-6 determinations.

Effects on systolic blood pressure

Baseline SBP, measured by the tail-cuff method in thirteen-week old SHR, was 222 ± 2 mmHg (n=20). Fig. 2 shows the SBP time-course in SHRs subjected to the different treatments. SBP of SHRs from negative control groups receiving tap water gradually increased along the follow-up period, while SBP of rats receiving LFH<3 kDa or captopril remained around or below baseline. SBP of SHRs from the positive control group receiving captopril (76 mg/kg/day) was significantly lower than in tap water rats during the whole follow-up period (Fig. 2A). SBP of SHRs receiving LFH<3 kDa (285 mg/kg/day) was significantly lower than in tap water rats from day 11 to the end of the follow-up period at day 24, and was significantly higher than in captopril treated rats in most time points from day 4 to the end of the follow-up period (Fig. 2A). SBP of SHRs receiving LFH<3 kDa (782 mg/kg/day) was significantly lower than in tap water rats from day 4 to the end of the follow-up period at day 18 (Fig. 2B).

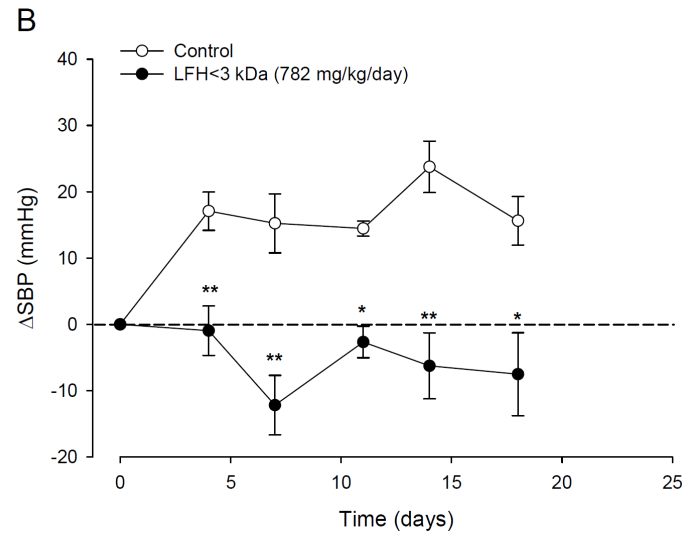
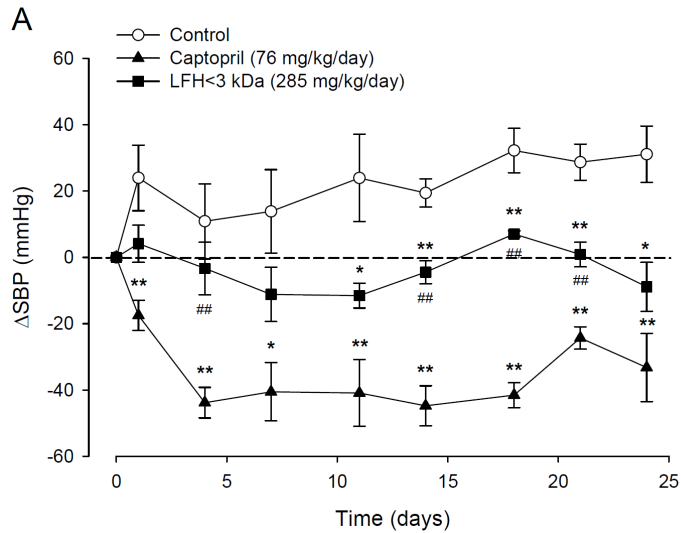


Figure 2. Time-course of changes from baseline in systolic blood pressure (Δ SBP) of spontaneously hypertensive rats (SHRs) during long-term oral treatment with bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa). (A) Baseline SBP = 226 ± 3 mmHg, $n=12$. Control for vehicle (tap water, $n = 4$), captopril positive control (76 mg/kg/day, $n = 4$) and low-dose LFH<3 kDa (285 mg/kg/day, $n = 4$). (B) Baseline SBP = 215 ± 1 mmHg, $n=8$. Control for vehicle (tap water, $n = 4$) and high-dose LFH<3 kDa (782 mg/kg/day, $n = 4$). Data are mean \pm SEM from 'n' rats. * $P < 0.05$ versus control; ** $P < 0.01$ versus control; ### $P < 0.01$ versus captopril.

Effects on body weight gain and liquid intake

The body weight of SHRs increased throughout the whole experimental period, from day 21 before starting treatments to the end of treatments. Just before starting the treatments, average weight of thirteen-week old rats was 274 ± 3 g (n=20). There were no significant differences in body weight gain between SHRs treated with LFH<3 kDa (285 mg/kg/day), LFH<3 kDa (782 mg/kg/day) or captopril (76 mg/kg/day, positive control), and negative control SHRs drinking tap water (Fig. 3).

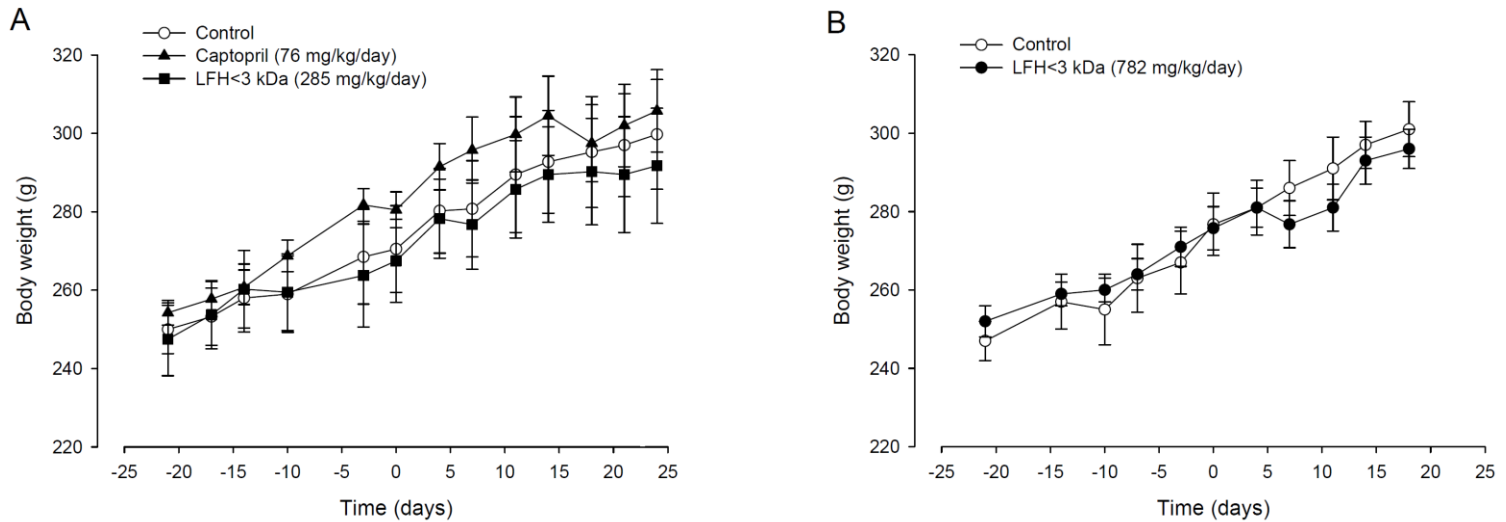


Figure 3. Body weight gain of spontaneously hypertensive rats (SHRs) before and after initiation (time 0) of long-term oral treatment with bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa). (A) Control for vehicle (tap water, n = 4), captopril positive control (76 mg/kg/day, n = 4) and low-dose LFH<3 kDa (285 mg/kg/day, n = 4). (B) Control for vehicle (tap water, n = 4) and high-dose LFH<3 kDa (782 mg/kg/day, n = 4). Data are mean \pm SEM from 'n' rats. No significant differences were found.

With regard to liquid intake, it was not significantly different in SHR treated with LFH<3 kDa (285 mg/kg/day) when compared to SHR drinking tap water. However, liquid intake was significantly increased in SHR treated with captopril (76 mg/kg/day), and to a significantly higher extent in SHR treated with LFH<3 kDa (782 mg/kg/day) (Fig. 4).

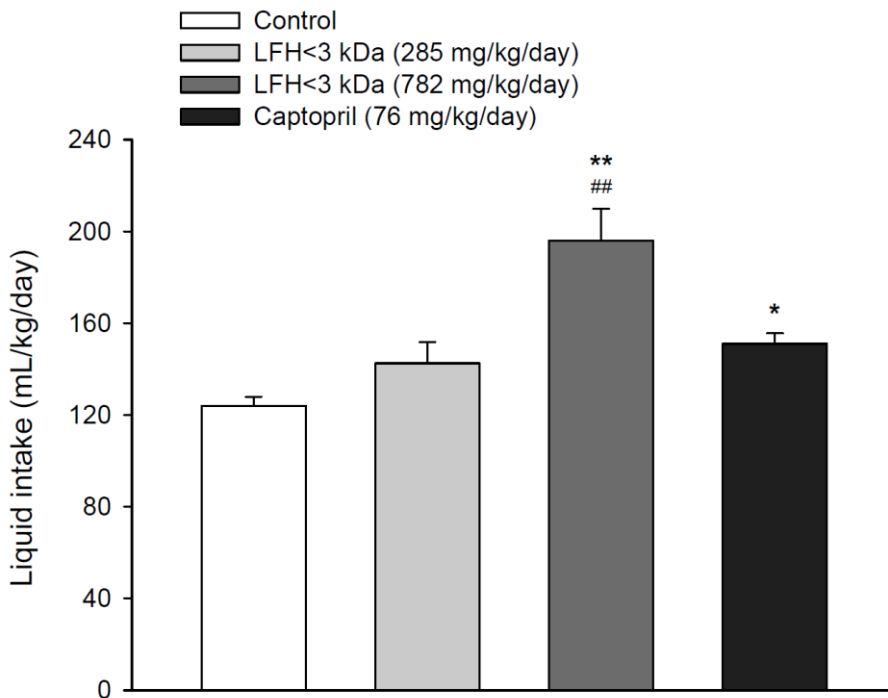


Figure 4. Liquid intake by spontaneously hypertensive rats (SHRs) during long-term oral treatment with bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa). Control for vehicle (tap water, n = 8), low-dose LFH<3 kDa (285 mg/kg/day, n = 4), high-dose LFH<3 kDa (782 mg/kg/day, n = 4) and captopril positive control (76 mg/kg/day, n = 4). Data are mean \pm SEM from 'n' rats. * P < 0.05 versus control; **P < 0.01 versus control; ##P < 0.01 versus captopril.

Effects on blood components of the renin-angiotensin system

Serum ACE activity in SHRs drinking tap water was 106.5 ± 4.8 U/L. As shown in Fig. 5A, ACE activity was significantly reduced in SHRs treated with LFH<3 kDa. SHRs treated with captopril (positive control) showed ACE activity significantly lower than both SHRs drinking tap water and SHRs treated with LFH<3 kDa. On the other hand, plasma renin activity in SHRs drinking tap water was 1.71 ± 0.12 ng/mL/h. Opposite to ACE activity, Fig. 5A shows how renin activity was significantly increased in SHRs treated with LFH<3 kDa. SHRs treated with captopril (positive control) showed renin activity significantly higher than both SHRs drinking tap water and SHRs treated with LFH<3 kDa.

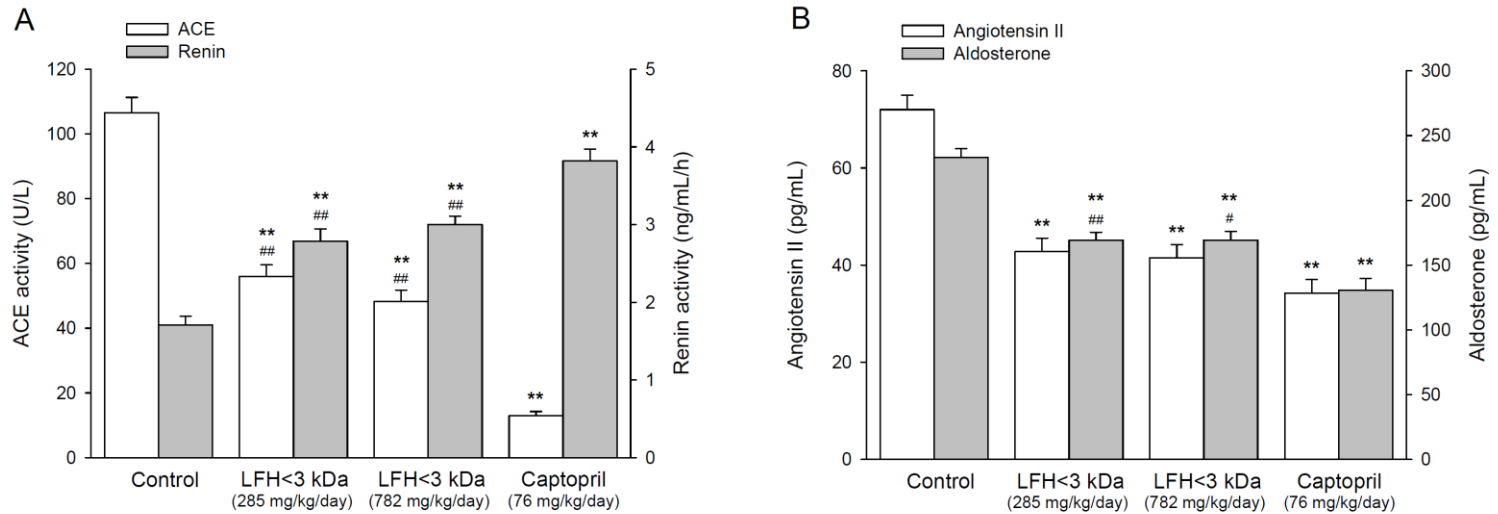


Figure 5. Levels of blood components of the renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats (SHRs) at the end of long-term oral treatment with bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa). (A) Serum angiotensin I-converting enzyme (ACE) and plasma renin activities. (B) Serum angiotensin II and plasma aldosterone levels. Control for vehicle (tap water, n = 8), low-dose LFH<3 kDa (285 mg/kg/day, n = 4), high-dose LFH<3 kDa (782 mg/kg/day, n = 4) and captopril positive control (76 mg/kg/day, n = 4). Data are mean \pm SEM from 'n' rats. **P < 0.01 versus control; #P < 0.05 versus captopril; ##P < 0.01 versus captopril.

All SHRs taken together, there was a significant negative linear correlation between ACE activity and renin activity values (Fig. 6). Moreover, SHRs drinking tap water showed serum angiotensin II level of 72.0 ± 3.0 pg/mL and plasma aldosterone level of 233.1 ± 6.8 pg/mL. As shown in Fig. 5B, both angiotensin II and aldosterone levels were significantly reduced in SHRs treated with LFH<3 kDa as well as in SHRs treated with captopril.

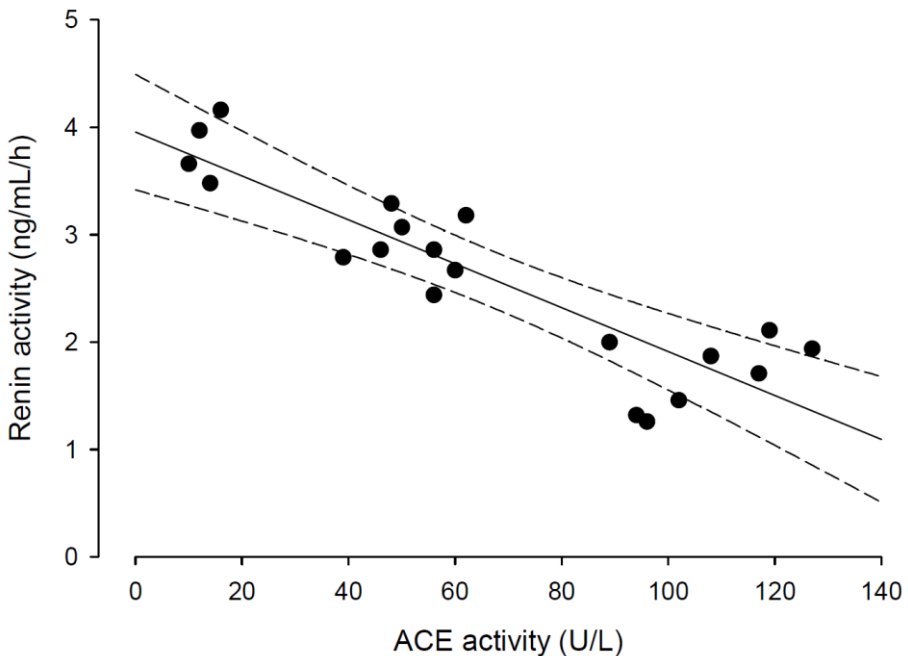


Figure 6. Relationship between blood angiotensin I-converting enzyme (ACE) and renin activities of spontaneously hypertensive rats (SHRs, $n = 20$) at the end of long-term oral treatment with bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH<3 kDa, 285-782 mg/kg/day), tap water (control for vehicle) or captopril (76 mg/kg/day, positive control). Dashed lines are 99% confidence intervals for solid regression line. A negative linear correlation was found, with correlation coefficient ($r = -0.8905$) significantly different than zero ($P < 0.01$) and no significant departure from linearity.

DISCUSSION

SHR strain, a rat model which develops hypertension at an early age, is commonly used to study the efficacy of antihypertensive treatments. SHRs were used in our study at an age range in which hypertension is still in progress, not fully established (Kokubo, Uemura, Matsubara, & Murohara, 2005; Xiao et al., 2010). The main finding of this study is that long-term oral administration to SHRs of LFH<3 kDa, a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides, attenuated and even reversed progression of hypertension, reduced circulating ACE activity, reduced angiotensin II and aldosterone levels, and increased renin activity, thus supporting ACE inhibition as an *in vivo* mechanism for the antihypertensive effect of LFH<3 kDa.

Ultrafiltration of crude protein hydrolysates to obtain fractions enriched in low molecular weight peptides is a common strategy used to increase *in vitro* ACE-inhibitory potency and thus potential antihypertensive effect (Mullaly, Meisel, & FitzGerald, 1997). In our study, we have used an ultrafiltered LFH fraction of peptides with molecular masses lower than 3 kDa. In previous studies LFH<3 kDa increased 60 times its *in vitro* ACE-inhibitory potency and showed up acute antihypertensive effects that lacked the whole unfractionated hydrolysate (Ruiz-Giménez et al., 2007; Ruiz-Giménez et al., 2012). The potency of the LFH<3 kDa samples used here to inhibit *in vitro* ACE activity ($IC_{50} = 9.4 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) was similar to that of previously used samples ($IC_{50} = 14.3 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$), which indicates a quite reproducible process for LF pepsin hydrolysis and subsequent ultrafiltration. We have previously shown that single-dose oral administration of LFH<3 kDa to SHRs induced acute reductions of SBP which were maintained up to 24 h post-administration.

LFH<3 kDa was further fractionated and 38 peptides, contained in the active fractions, were identified. Based on the peptide abundance, a total of 11 peptides were chemically synthesized and their ACE inhibitory effect tested. Three of them, identified as sequences LIWKL, RPYL and LNNSRAP, showed inhibitory effects on ACE and acute antihypertensive effects in SHR (Ruiz-Giménez et al., 2012), which could at least in part contribute to the long-term antihypertensive effects of the hydrolysate. In the present study LFH<3 kDa dose in the high-dose treatment was approximately 2.7 times that in the low-dose treatment, resulting in earlier but not larger antihypertensive effects, as has been reported for other protein hydrolysates administered to SHR at two different dosages (Shiozaki et al., 2010; Yang, Yang, Chen, Tzeng, & Han, 2004; Zhou, Xue, & Wang, 2010). Therefore, our present results are in line with acute effects of LFH<3 kDa and support its antihypertensive efficacy after chronic administration.

The antihypertensive effects of protein hydrolysates have usually been assessed on the basis of their *in vitro* ability to inhibit ACE. The *in silico* molecular mechanisms of the binding of milk protein derived antihypertensive peptides with the ACE catalytic site have been recently elucidated (Pan, Guo, Zhao, & Cao, 2011). However, the ACE-inhibitory effect of protein hydrolysates has not usually been confirmed *in vivo*. As part of the homeostatic mechanism responsible for the maintenance of normal blood pressure and electrolyte balance, ACE is a key component of the RAS whose main function is to cleave angiotensin I to angiotensin II and degrade bradykinin. Therefore, *in vivo* ACE-inhibitory effect can be assessed by measuring tissue membrane-anchored or soluble, circulating ACE activities, and confirmed by measuring circulating levels of angiotensin II (Coates, 2003). Our present results show that serum ACE activity is reduced in SHR after

long-term treatment with LFH<3 kDa. Moreover inhibition of ACE was confirmed in LFH<3 kDa treated SHR by the reduction in angiotensin II level as well as in the level of aldosterone, the adrenal endocrine component downstream angiotensin II in the renin-angiotensin axis (Carey & Siragy, 2003). Other long-term administered antihypertensive protein hydrolysates have shown *in vivo* ACE-inhibitory effects evidenced by reduction of blood ACE activity (Yang et al., 2004; Yoshii, Tachi, Ohba, Sakamura, Takeyama, & Itani, 2001) or tissue ACE activity (Nakano et al., 2006; Shiozaki et al., 2010; Wang, Wang, Cheng, Zhou, Tang, & Mao, 2012). In contrast, other studies have failed to show *in vivo* ACE inhibition and suggest alternative mechanisms for chronic antihypertensive effects of protein hydrolysates (Li et al., 2011; Sánchez et al., 2011).

In addition to ACE activity inhibition, our results also show an increase of plasma renin activity in SHR after long-term treatment with LFH<3 kDa. ACE inhibition induces a compensatory rise of plasma renin activity owing to the reduction of negative feedback by angiotensin II (Brunner, Nussberger, & Waeber, 1993), as evidenced in our results showing a negative correlation between blood ACE activity and renin activity levels. This renin increase further supports ACE inhibition as the antihypertensive mechanism of LFH<3 kDa, as has been previously reported for the antihypertensive effects after long-term treatment of SHR with ACE inhibiting fermented milk products (Sipola, Finckenberg, Korpela, Vapaatalo, & Nurminen, 2002).

Another interesting finding of this study was the dipsogenic effect of LFH<3 kDa because ACE inhibitors are dipsogenic challenges (Fitzsimons, 1998). Other studies measuring liquid consumption during long-term treatment with antihypertensive protein hydrolysates have reported a similar dipsogenic

effect (Miguel, López-Fandiño, Ramos, & Aleixandre, 2006) or no effect on liquid intake (Sánchez et al., 2011; Yoshii et al., 2001). In our study, *in vivo* ACE-inhibitory effect of LFH<3 kDa could account at least in part for its dipsogenic effect. However, dipsogenic effect of LFH<3 kDa was more than expected from its ACE-inhibitory effect when compared to captopril. Dipsogenic effect of glucose has been reported in SHR (Di Nicolantonio, 2004). Bovine LF is a glycoprotein which carbohydrate moieties are high-mannose and complex type glycans consisting of mannose, fucose, galactose, N-acetylgalactosamine, and N-acetylglucosamine (Wei, Nishimura, & Yoshida, 2000). Therefore, LFH<3 kDa is reasonably expected not to contain glucose, as we determined with the specific enzymatic assay. With regard to total reducing sugars, their content in LFH<3 kDa (15 µg/mL glucose equivalents) was negligible when compared to glucose concentration reported to have dipsogenic effect (50 mg/mL) (Di Nicolantonio, 2004). On the other hand, although peptides add flavor to protein hydrolysates like LFH<3 kDa, it has been reported that SHR show appetite for volume expanding tonic osmolytes rather than an exaggerated hedonic drive (Di Nicolantonio, 2004). This could have contributed to the increased intake of osmotically active high-dose LFH<3 kDa.

In conclusion, long-term oral administration to SHR of LFH<3 kDa, a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides, attenuated and even reversed progression of hypertension. The *in vitro* ACE-inhibitory effect of LFH<3 kDa resulted in blood reductions of ACE activity, angiotensin II and aldosterone levels, as well as a compensatory increase of renin activity in SHR, thus supporting ACE inhibition as *in vivo* mechanism for the antihypertensive effects of LFH<3 kDa. In the context of health-promoting functional foods, our study points to the potential

application of LFH<3 kDa as a nutraceutical in the treatment of hypertension, provided food-grade production of the hydrolysate is attained and its efficacy as well as safety are assessed in clinical trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants AGL2010-21009 from 'Ministerio de Educación y Ciencia - FEDER', Consolider Ingenio 2010, Fun-C-Food, CSD2007-00063, and network RETICS RENEVAS - RD06/0026/0006 from 'Instituto de Salud Carlos III'. R. Fernández-Musoles is recipient of a fellowship from 'Ministerio de Educación y Ciencia' (BES-2008-004472). The authors thank Dr. Simeón A. Simeón for his advice and technical contribution to determinations of blood components of the renin-angiotensin system, Javier López-Díez for his technical assistance in preparing and analysing LFH<3 kDa, Sonia Ruiz-Piquer for her technical assistance in experiments with rats, and David Hervás for his advice on statistics.

REFERENCES

Brunner, H.R., Nussberger, J., & Waeber, B. (1993). Angiotensin II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, 11, S53-S58.

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

Centeno, J.M., Burguete, M.C., Castelló-Ruiz, M., Enrique, M., Vallés, S., Salom, J.B., et al. (2006). Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5323-5329.

Coates, D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35, 769-773.

Di Nicolantonio, R. (2004). Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions? An hypothesis. *Journal of Hypertension*, 22, 1649-1654.

Fernández-Musoles, R., Salom, J.B., Martínez-Maqueda, D., López-Díez, J.J., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolysates: inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. *Food Chemistry*, 139, 994-1000.

Fitzsimons, J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews*, 78, 583-686.

Fragasso, G., Maranta, F., Montanaro, C., Salerno, A., Torlasco, C., & Margonato, A. (2012). Pathophysiological therapeutic targets in hypertension: a cardiological point of view. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16, 179-193.

González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 301.e1-301.e8.

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

Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29, 1062-1071.

Ibrahim, J., Berk, B.C., & Hughes, A.D. (2006). Comparison of simultaneous measurements of blood pressure by tail-cuff and carotid arterial methods in conscious spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Clinical and Experimental Hypertension*, 28, 57-72.

Kokubo, M., Uemura, A., Matsubara, T., & Murohara, T. (2005). Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertension Research*, 28, 601-609.

Li, H., Prairie, N., Udenigwe, C.C., Adebisi, A.P., Tappia, P.S., Aukema, H.M., et al. (2011). Blood pressure lowering effect of a pea protein hydrolysate in hypertensive rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 9854-9860.

Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernández-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, 3, 350-361.

Miguel, M., López-Fandiño, R., Ramos, M., & Aleixandre, A. (2006). Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 78, 2960-2966.

Mullaly, M.M., Meisel, H., & FitzGerald, R.J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7, 299-303.

Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., et al. (2006). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1118-1126.

Obernier, J. A., & Baldwin, R. L. (2006). Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR Journal*, 47, 364-369.

Pan, D., Guo, H., Zhao, B., & Cao, J. (2011). The molecular mechanisms of interactions between bioactive peptides and angiotensin-converting enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 3898-3904.

Ruiz-Giménez, P., Burguete, M.C., Castelló-Ruiz, M., Marcos, J.F., Salom, J.B., Vallés, S., et al. (2007). Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on angiotensin I-converting enzyme-dependent vasoconstriction. *International Dairy Journal*, 17, 1212-1215.

Ruiz-Giménez, P., Ibáñez, A., Salom, J.B., Marcos, J.F., López-Díez, J.J., Vallés, S., et al. (2010). Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6721-6727.

Ruiz-Giménez, P., Salom, J.B., Marcos, J.F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., et al. (2012). Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry*, 131, 266-273.

Sánchez, D., Kassan, M., Contreras, M.M., Carrón, R., Recio, I., Montero, M.J., et al. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of

hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological Research*, 63, 398-404.

Sentandreu, M.A., & Toldrá, F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546-554.

Shiozaki, K., Shiozaki, M., Masuda, J., Yamauchi, A., Ohwada, S., Nakano, T., et al. (2010). Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fisheries Science*, 76, 865-872.

Sipola, M., Finckenberg, P., Korpela, R., Vapaatalo, H., & Nurminen, M.L. (2002). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69, 103-111.

Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.

Wang, X., Wang, L., Cheng, X., Zhou, J., Tang, X., & Mao, X.Y. (2012). Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 134, 122-126.

Wakabayashi, H., Takase, M., & Tomita, M. (2003). Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1277-1287.

Wei, Z., Nishimura, T., & Yoshida, S. (2000). Presence of a glycan at a potential N-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, 83, 683-689.

Xiao, B., Li, X., Yan, J., Yu, X., Yang, G., Xiao, X., et al. (2010). Overexpression of cytochrome P450 epoxygenases prevents development of hypertension in spontaneously hypertensive rats by enhancing atrial natriuretic peptide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334, 784-794.

Yang, H.Y., Yang, S.C., Chen, J.R., Tzeng, Y.H., & Han, B.C. (2004). Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 92, 507-512.

Yoshii, H., Tachi, N., Ohba, R., Sakamura, O., Takeyama, H., & Itani, T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology*, 128, 27-33.

Zhou, F., Xue, Z., & Wang, J. (2010). Antihypertensive effects of silk fibroin hydrolysate by alcalase and purification of an ACE inhibitory dipeptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6735-6740.

Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: angiotensin receptor blocking effect

Fernández-Musoles R., Castello-Ruiz M., Arce C., Manzanares P., Ivorra M. D. y Salom J. B.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 62 (2014) 173-181

ABSTRACT

Looking for antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition, we assessed whether lactoferrin (LF)-derived peptides can act as receptor blockers to inhibit vasoconstriction induced by angiotensin II or endothelin-1. The lactoferricinB (LfcinB)-derived peptide LfcinB₂₀₋₂₅ (RRWQWR), the low molecular weight LF hydrolysate (LFH<3 kDa), and two peptides identified in LFH<3 kDa (LIWKL and RPYL) were tested in *ex vivo* assays of vasoactive responses. The peptide RPYL was tested in radioligand receptor binding assays. Both LFH<3 kDa and individual peptides inhibited angiotensin II-induced vasoconstriction. RPYL showed the highest *ex vivo* inhibitory effect and also inhibited binding of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II to AT₁ receptors. By contrast, neither LFH<3kDa nor RPYL inhibited endothelin-1 and depolarization-induced vasoconstrictions. In conclusion, LF-derived peptides selectively inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction by blocking angiotensin AT₁ receptors. Therefore, inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction is suggested as a mechanism contributing along with ACE inhibition to the antihypertensive effect of some LF-derived peptides.

Keywords: bovine lactoferrin hydrolysate, lactoferrin-derived peptides, antihypertensive mechanism, renin-angiotensin system, angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin receptor blocker

INTRODUCTION

Hypertension is probably the most important modifiable risk factor for cardiovascular disease, and its management includes not only pharmacological treatment but also life-style changes including physical activity and dietary habits.¹ The increasing perception about the relation between food and health is fostering the development of functional foods providing health benefits beyond basic nutrition.² Some food proteins contain embedded peptides that once released behave as bioactive peptides with different health promoting properties including blood pressure lowering effects.³

The renin angiotensin system (RAS) is one of the main targets for the treatment of hypertension. Its inhibition at three possible levels, angiotensin-converting enzyme (ACE), upstream renin activity or downstream angiotensin receptors, is the pharmacological basis for commonly used antihypertensive drugs.⁴ ACE inhibition is also the most aimed target for antihypertensive food-derived peptides developed as an alternative to drugs.⁵ Although different animal and plant proteins have been used, milk is the main source of antihypertensive ACE-inhibitory peptides reported to date.⁶

In contrast to casein, there was much less information about the potential of milk whey proteins as sources of antihypertensive peptides when some years ago we focused on whey protein lactoferrin (LF)⁷ and its well-known functional domain lactoferricin B (LfcinB).⁸ First, we have shown that a set of peptides derived from LfcinB had inhibitory effects on *in vitro* ACE activity and *ex vivo* angiotensin I-induced ACE-dependent vasoconstriction,⁹ and were orally effective antihypertensive peptides in spontaneously hypertensive rats (SHRs).¹⁰ With regard to the parent protein, we have reported the inhibitory

effects of a LF pepsin hydrolysate (LFH) on ACE activity and ACE-dependent vasoconstriction.¹¹ Then, we have recently described that the ultrafiltered hydrolysate (LFH<3 kDa) showed increased inhibitory effect on ACE activity and orally antihypertensive effect in SHR after both acute¹² and chronic¹³ administration. Finally, we have isolated and identified novel non-LfcinB-derived peptides with ACE-inhibitory and antihypertensive properties, which could contribute to the antihypertensive effects of LFH<3 kDa.¹²

The search for *in vitro* ACE inhibition is the most common strategy in the selection of potential antihypertensive peptides derived from food proteins.

However, it is difficult to establish a direct relationship between ACE-inhibitory effect *in vitro* and antihypertensive effect *in vivo*. On one hand, the *in vitro* ACE-inhibitory potency of food-derived peptides is around 1000 times lower than that of ACE-inhibitory drugs like captopril, but there are no substantial differences when their antihypertensive effects are compared.¹⁴ On the other hand, there is no correlation between *in vitro* and *in vivo* effects when different individual peptides or protein hydrolysates are compared. To explain these apparent discrepancies one should take into account both bioavailability issues and mechanisms of action other than ACE inhibition when bioactive peptides are assayed *in vivo*.¹⁵ Alternative antihypertensive mechanisms reported for food-derived bioactive peptides include short-term vasoactive mechanisms as well as long-term antioxidant and anti-inflammatory mechanisms.¹⁶

Looking for antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition in milk protein derived bioactive peptides, we have shown that some LfcinB-derived peptides were dual vasopectidase inhibitors. In addition to ACE, they inhibit endothelin-converting enzyme (ECE), a key enzyme of the endothelin system

also involved in vascular tone and blood pressure regulation.¹⁷ We have also reported that orally effective antihypertensive LF hydrolysates may act as dual vasopeptidase (ACE/ECE) or as single ECE inhibitors with different antivasoconstrictor effects depending on the protease used to release bioactive peptides.¹⁸ In the present study, we aimed to assess whether LF derived peptides, in addition to inhibit the converting enzymes of the angiotensin and endothelin systems, can act as receptor blockers to inhibit vasoconstriction induced by angiotensin II or endothelin-1. For this purpose, we included in the study the LfcinB-derived peptide LfcinB₂₀₋₂₅ (RRWQWR), the low molecular weight LF pepsin hydrolysate LFH<3 kDa, and two peptides identified in LFH<3 kDa (LIWKL and RPYL), all of them with proven antihypertensive effects in SHR.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bovine lactoferrin (LF) was provided by FrieslandCampina Domo (Zwolle, The Netherlands). Porcine pepsin, porcine kidney ACE, human endothelin-1 (ET-1), captopril, valsartan and protease inhibitor cocktail were purchased from Sigma-Aldrich Química (Tres Cantos, Madrid, Spain). Angiotensin II was supplied by Calbiochem Co. (La Jolla, CA) and fluorescent ACE substrate o-aminobenzoylglycyl-p-nitrophenylalanylproline was from Bachem Feinchemikalien (Bubendorf, Switzerland). [¹²⁵I]-(¹Sar¹-Ile⁸)-Angiotensin II and angiotensin AT₁ receptor (human) membrane preparation were from PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA), where membranes were prepared from transfected Chinese hamster ovary cells (cell line CHO-K1).

Peptides (LfcinB₂₀₋₂₅, LIWKL and RPYL) were ordered at >95% purity from GenScript Corp. (Piscataway, NJ) wherein they were synthesized by solid phase methods using N-(9-fluorenyl) methoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. LfcinB₂₀₋₂₅ was acetylated at the N-terminus and amidated at the C-terminus, because such modified peptide was used in our previous studies showing its vasoactive⁹ and antihypertensive¹⁰ effects. Actual peptide purities of supplied batches were 99.8% for LfcinB₂₀₋₂₅, 97.7% for LIWKL and 99.5% for RPYL. Stock solutions of each peptide were prepared at 5 mM concentration in MilliQ water (Millipore Corp., Bedford, MA) and stored at -20°C. LfcinB₂₀₋₂₅ (RRWQWR) and LIWKL concentrations were determined on the basis of the extinction coefficient of W residues by measuring the absorbance at 280 nm ($\epsilon_{280} = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for W residue), while RPYL concentration was based on the dry weight of the peptide.

A low molecular weight fraction of an LF hydrolysate obtained by enzymatic treatment with pepsin (LFH<3 kDa) was prepared as described previously,^{11,12} and the resulting permeate was freeze-dried and kept at room temperature until use. LFH<3 kDa was subjected to determination of protein content by the bicinchoninic acid method (BCA; Sigma-Aldrich Química) using BSA as standard and to *in vitro* assay of ACE-inhibitory potency (IC₅₀) using the method described by Sentandreu and Toldrá¹⁹ as previously reported.¹²

Animal welfare

Rabbits were housed in temperature-controlled rooms (23°C) with 12 h light/dark cycles and consumed tap water and standard diet ad libitum. Euthanasia was carried out in accordance with the Spanish legislation on 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes'. The study was approved by the 'Ethics Committee for Animal Welfare' of the Hospital 'La Fe' to be carried out in its accredited animal research facility (ES462500001001).

Isolation of rabbit carotid arteries and preparation of membrane microsomal fraction

Thirty male New Zealand White rabbits (Technology Transferring Center, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain), weighing 2.5–3 kg, were killed by injection of 25 mg/kg sodium thiopental and 1.5 ml of 10 mM KCl solution through the ear vein. A midline throat incision provided access to both common carotid arteries, which were dissected free and cut into four 4 mm-long segments each one for the *ex vivo* functional assays in organ bath. On

the other hand, the membrane microsomal fraction from carotid arteries was obtained for radioligand binding assays according to Faber et al.²⁰ with some modifications. Briefly, frozen tissue was pulverized in liquid N₂, and homogenized (500 µL for 100 mg of tissue) in 4°C buffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, and 100 mM KCl, pH 7.4) plus protease inhibitor cocktail (1% v/v) with an Ultra-Turrax T8 homogenizer (IKA-Werke, Staufen Germany) at maximal speed (5 x 10 s). All procedures specified below were carried out at 4°C. The homogenate was subjected to 3 strokes at 4 watts in a Microson XL ultrasonic cell disruptor (Misonix, Farmingdale, NY), treated with 0.6 M KCl for 20 min to remove major contractile proteins, centrifuged at 1,000g for 10 min, the supernatant centrifuged at 10,000g for 10 min, and again the supernatant ultracentrifuged at 110,000g for 1 h. The final pellet was resuspended in storage buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10% sucrose, pH 7.4, protease inhibitor cocktail) and kept at -80°C until used. The concentration of membrane protein was determined by the bicinchoninic acid method.

***Ex vivo* functional assays of vasoactive responses**

The arterial segments were mounted in an organ bath containing Ringer-Locke solution (120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, and 5.6 mM glucose) for computer-assisted isometric tension recording, as described previously.⁹ The contractile capacity of every arterial segment was checked by exposure to 50 mM KCl Ringer-Locke solution (NaCl replaced with an equimolar amount of KCl). Carotid arteries contracting less than 1 g were discarded.

To assess effects on angiotensin receptor-mediated vasoconstriction, every arterial segment was challenged with angiotensin II (1 μ M). After washing out, each arterial segment was subjected to one of the following protocols: (i) control, a second challenge to angiotensin II to check for response reproducibility or (ii) treated, preincubation (20 min) with LFH<3 kDa (100 μ g/mL), one of the LF-derived peptides (20 μ M), the ACE-inhibitor drug captopril (0.1 μ M) or the angiotensin II AT₁ receptor blocker drug valsartan (10 nM), and a second challenge to angiotensin II to check for their effect on angiotensin II-induced contraction. Concentration-dependent effects were assessed for the LF-derived peptide RPYL (20-200 μ M) and valsartan (10-100 nM).

To assess effects on endothelin receptor-mediated vasoconstriction, every arterial segment was challenged with KCl (50 mM). After washing out, each arterial segment was subjected to one of the following protocols: (i) a challenge with endothelin-1 (10 nM) to obtain the control contractile response, or (ii) treated, preincubation (20 min) with LFH<3 kDa (100 μ g/mL), the LF-derived peptide RPYL (20 μ M) or the angiotensin II AT₁ receptor blocker drug valsartan (0.1 μ M), and a challenge with endothelin-1 to check for their effect on endothelin-1-induced contraction.

Finally, some arterial segments were subjected to two successive challenges to 50 mM KCl with or without LFH<3 kDa (100 μ g/mL), the LF-derived peptide RPYL (20 μ M) or valsartan (0.1 μ M) in between to check for non specific effects of the treatments on arterial contractile capacity.

Radioligand receptor binding assays

Competition binding assays were carried out with both a membrane preparation containing human angiotensin AT₁ receptor and a membrane microsomal fraction from rabbit carotid artery. The human receptor membrane preparation (0.6 µg protein) was incubated at 27°C for 60 min in a total volume of 200 µL assay buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) with [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II (0.03 nM) and various concentrations of unlabelled competitors. Experiments were terminated by rapid vacuum filtration through Whatman GF/C fibreglass filters (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) presoaked in 0.5% BSA using a Brandel cell harvester (M24R, Valley Research Iberica, Madrid, Spain). The filters were then washed five times with 1 ml of ice-cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), and the filter-bound radioactivity was measured in a gamma counter (2480 WIZARD, PerkinElmer, Waltham, MA). Non-specific binding was determined in the presence of 1 µM unlabelled valsartan. Specific binding is defined as total binding minus non-specific binding. For the rabbit carotid artery membrane preparation, 40 µg protein and [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II (0.06 nM) were used instead. A full competition binding assay curve (1 pM - 1 µM) was carried out for valsartan, and selected concentrations of RPYL were assayed according to the vasoactive responses in the *ex vivo* functional assays.

Statistical analyses

Values are expressed as the mean ± SEM. Unpaired Student's t-test was used to assess differences between two groups. Analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test or Dunnett's test was used for

multiple comparisons among more than two groups. P-values less than 0.05 were considered significant. The calculation of IC₅₀ values was performed by nonlinear regression analysis. GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) was used.

RESULTS

Lactoferrin-derived peptides inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction

Challenge of rabbit carotid arterial segments with a depolarizing solution (50 mM KCl) induced phasic contraction followed by active tone maintained until KCl wash-out. Average active tone amounted to 3424 ± 106 mg in all viable arterial segments included in the study ($n = 200$).

Angiotensin II ($1 \mu\text{M}$) induced phasic, transient contractions that were almost completely reproducible in two consecutive challenges to the same arterial segment (Figure 1A). Average contractile response to the second challenge was 82 ± 2 % of the first response ($n = 30$).

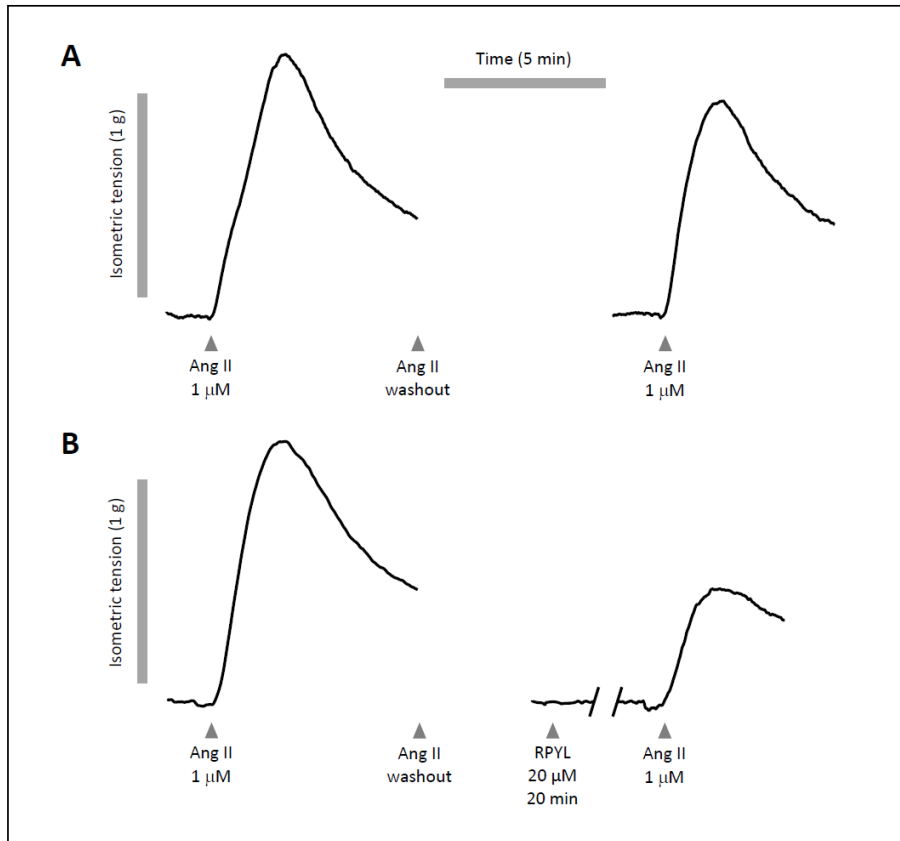


Figure 1. Typical vasoconstrictor effects of angiotensin II (Ang II) in carotid artery segments isolated from New Zealand White rabbits. (A) Successive vasoconstrictions to Ang II in control conditions. (B) Effect of the LF-derived peptide RPYL on Ang II-induced vasoconstriction.

The inhibitory effects of the different treatments on angiotensin II-induced vasoconstriction were assessed as shown for RPYL in the representative recording of Figure 1B. LfcinB₂₀₋₂₅ (20 μM), LFH<3 kDa (100 μg/mL), LIWKL (20 μM) and RPYL (20 μM) produced significant inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction when compared to control vasoconstriction (Figure 2A).

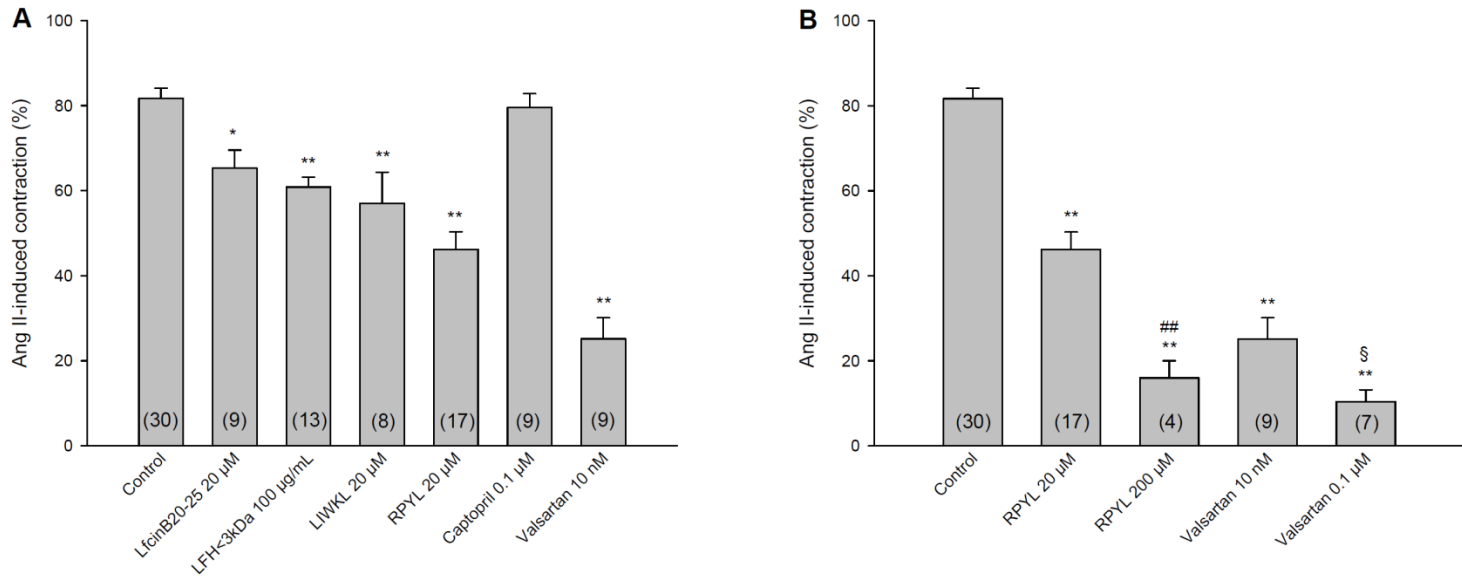


Figure 2. Inhibitory effects of lactoferrin-derived peptides on angiotensin II (Ang II)-induced vasoconstriction in carotid artery segments isolated from New Zealand White rabbits. (A) LfcinB₂₀₋₂₅, LFH<3 kDa, the LF-derived peptides LIWKL and RPYL, the ACE-inhibitor captopril, and the Ang II AT₁ receptor blocker valsartan were applied before the second addition of Ang II (1 μ M). (B) Concentration-dependent inhibitory effects of RPYL and valsartan on Ang II-induced vasoconstriction. Vasoconstrictor responses are expressed as a percentage of previous Ang II-induced contraction. Data are the mean \pm SEM from (n) arterial segments. *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with Ang II alone (control), respectively. ## P < 0.01 compared with RPYL (20 μ M), and § P < 0.05 compared with valsartan (10 nM).

The degree of inhibition ranged from 21 % response reduction over the control conditions for the weakest LfcinB₂₀₋₂₅ to 44 % response reduction for the strongest RPYL. Figure 2A also shows the lack of effect of the ACE-inhibitor captopril (0.1 μ M) on angiotensin II-induced vasoconstriction and the significant inhibitory effect of the angiotensin II AT₁ receptor blocker valsartan (10 nM). Finally, concentration-dependent inhibitory effects on the contractile response to angiotensin II were shown for RPYL (20-200 μ M) as well as for valsartan (10-100 nM) (Figure 2B).

Lactoferrin-derived peptide RPYL inhibits binding of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-angiotensin II to AT₁ receptors

The competitive angiotensin II AT₁ receptor blocker valsartan (1 pM - 1 μ M) induced concentration-dependent inhibition of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II (0.03 nM) specific binding to human angiotensin AT₁ receptors (Figure 3A) with a calculated IC₅₀ value of 0.79 ± 0.15 nM (n = 6). The peptide RPYL (3-300 μ M) also induced significant concentration-dependent inhibition of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II specific binding to human angiotensin AT₁ receptors (Figure 3B), amounting to 62 % binding inhibition at the highest RPYL concentration assayed (300 μ M). On the other hand, RPYL (100 μ M) also significantly reduced to 38.2 ± 5.0 % (n = 3, P < 0.01) specific binding of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II (0.06 nM) to rabbit carotid artery angiotensin AT₁ receptors.

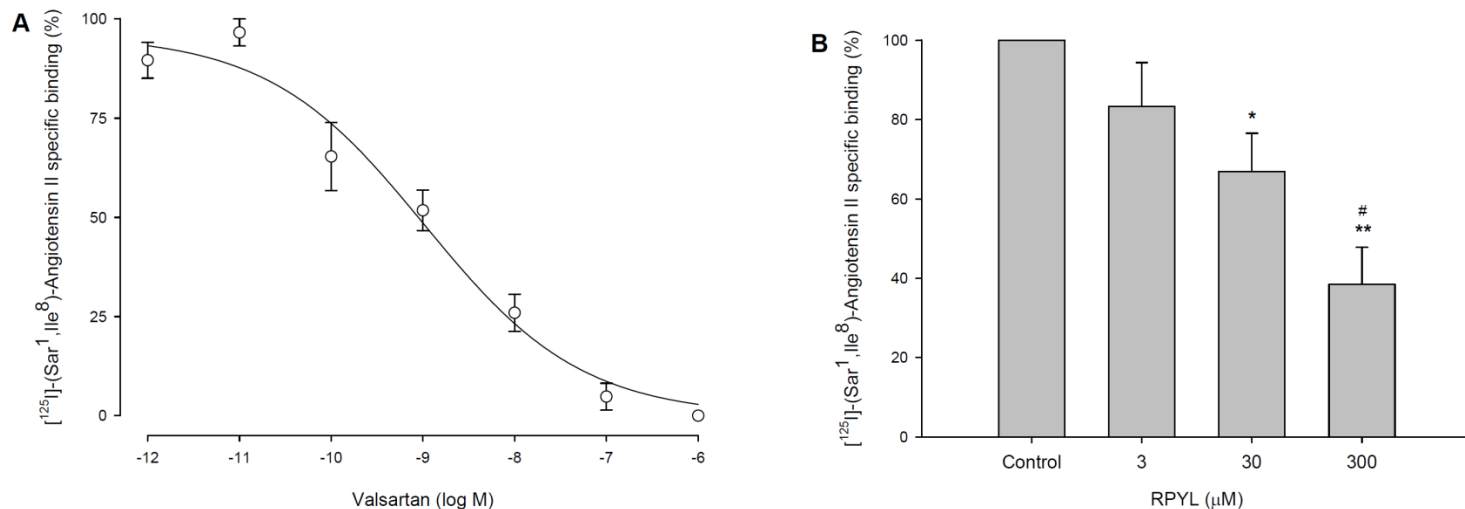


Figure 3. Inhibition of [¹²⁵I]-(Sar¹,Ile⁸)-Angiotensin II specific binding to a membrane preparation from CHO-K1 cells expressing the human angiotensin AT₁ receptor. Non-specific binding was 29.3 ± 2.9%, mean ± SEM from nine independent experiments (each performed in duplicate or triplicate). (A) Sigmoidal curve for concentration-dependent inhibitory effects of the angiotensin II AT₁ receptor blocker valsartan. Data are the mean ± SEM from six independent experiments (each performed in duplicate or triplicate). (B) Concentration-dependent inhibitory effects of the LF-derived peptide RPYL. Data are the mean ± SEM from at least three independent experiments (each performed in duplicate or triplicate). *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with [¹²⁵I]-(Sar¹,Ile⁸)-Angiotensin II alone (control), respectively. # P < 0.05 compared with RPYL (30 μM).

Lactoferrin-derived peptides do not inhibit endothelin-1 and depolarization-induced vasoconstrictions

Endothelin-1 (10 nM) induced slow contraction (Figure 4A) with maximum effect amounting to 108 ± 5 % relative to previous response to KCl, reached at 67 ± 6 min, with mean slope of 61 ± 7 mg/min ($n = 16$). The effects of the different treatments on endothelin-1-induced vasoconstriction were assessed as shown for LFH<3 kDa in the representative recording of Figure 4B.

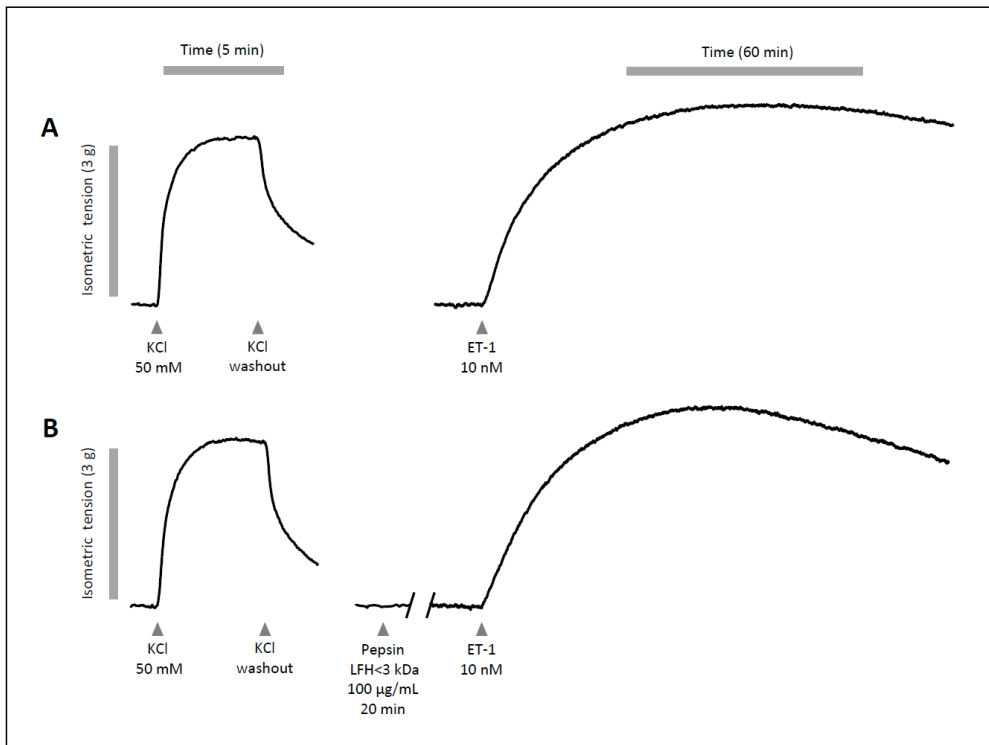


Figure 4. Typical vasoconstrictor effects of endothelin-1 (ET-1) in carotid artery segments isolated from New Zealand White rabbits. (A) Vasoconstriction to high-KCl and to ET-1 in control conditions. (B) Effect of LFH<3 kDa on ET-1-induced vasoconstriction.

LFH<3 kDa (100 µg/mL), the peptide RPYL (20 µM) or valsartan (0.1 µM) did not induce significant modification of the contractile response to endothelin-1 (Table 1).

Table 1. Vasoconstrictor responses of carotid artery segments isolated from New Zealand White rabbits to endothelin-1 and KCl-induced depolarization, in control conditions and after treatment with LFH<3 kDa, the LF-derived peptide RPYL, the angiotensin II AT₁ receptor blocker valsartan, and the selective ET_A endothelin receptor antagonist BQ-123.

	Endothelin-1 (10 nM)	KCl (50 mM)
Control	124 ± 2 (3)	117 ± 2 (8)
LFH<3 kDa (100 µg/mL)	113 ± 6 (9)	113 ± 2 (8)
Control	106 ± 11 (7)	109 ± 2 (7)
RPYL (20 µM)	93 ± 5 (8)	109 ± 3 (7)
Control	103 ± 3 (6)	124 ± 8 (4)
Valsartan (0.1 µM)	109 ± 3 (16)	128 ± 5 (12)
Control	123 ± 7 (12)	
BQ-123 (1 µM) a	49 ± 3 (8)**	n.d.

Vasoconstrictor responses are expressed as a percentage of previous KCl-induced contraction. Data are the mean ± SEM from (n) arterial segments (n.d., not determined). aTaken from Fernández-Musoles et al.¹⁷

**Significantly different from control, P < 0.01. Unpaired Student's t-test.

Finally, the effects of some treatments inhibiting angiotensin II-induced vasoconstriction were assayed also against KCl-induced vasoconstriction. In control conditions, the second vasoconstriction to KCl-induced depolarization was 116 ± 2 % of the first response in the same arterial segment (n = 19), and

the responses to KCl were not significantly different after incubation with LFH<3 kDa (100 µg/mL), RPYL (20 µM) or valsartan (0.1 µM) (Table 1).

DISCUSSION

We have found that some lactoferrin (LF)-derived antihypertensive peptides inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction due to their blocking effect on angiotensin AT₁ receptors. This effect is selective for angiotensin AT₁ receptors as endothelin-1-induced, ET_A receptor-mediated vasoconstriction is not inhibited, and no unspecific effects on depolarization-induced vasoconstriction are shown.

We have previously reported that the low molecular weight LF hydrolysate included in this study (LFH<3 kDa) shows antihypertensive effects in SHR. Single-dose LFH<3 kDa induces acute blood pressure reduction in SHR,¹² and long-term intake attenuates progression of hypertension.¹³ LFH<3 kDa inhibits both *in vitro* ACE activity¹² and ACE-dependent angiotensin I-induced vasoconstriction.¹⁸ The ACE inhibitory effect of LFH<3 kDa has been confirmed as an *in vivo* mechanism for the antihypertensive effect.¹³ The present results point to inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction as a potential mechanism also contributing along with ACE inhibition to the antihypertensive effect of the hydrolysate. We have also previously shown that individual peptides embedded in different regions of the LF sequence, either derived from the lactoferricin B domain (LfcinB) or identified in LFH<3 kDa, are ACE inhibitors and have antihypertensive effects when acutely administered to SHR.^{9,10,12} The present study shows that LfcinB₂₀₋₂₅ also has a slight inhibitory effect on angiotensin II-induced vasoconstriction. On the other hand, the inhibitory effects of individual peptides like LIWKL and to a higher extent RPYL on angiotensin II-induced vasoconstriction would contribute at least in part to the inhibitory effect of the whole hydrolysate LFH<3 kDa.

The mechanism involved in the inhibitory effects of LF-derived peptides on angiotensin II-induced vasoconstriction has been further investigated using the most effective peptide RPYL. Our results show that the inhibitory effect of RPYL on angiotensin II-induced vasoconstriction was concentration-dependent. Moreover, RPYL displaced the binding of [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II to human angiotensin AT₁ receptors also in a concentration-dependent manner. These human recombinant receptors, expressed in transfected Chinese hamster ovary cells, are commonly used for AT₁ receptor binding assays both in whole cells²¹ and membrane preparations.²² Finally, the inhibitory effect of RPYL on [¹²⁵I]-(Sar¹, Ile⁸)-Angiotensin II specific binding was confirmed in membranes from rabbit carotid artery, the native tissue used in vasoconstriction experiments. All these results support an angiotensin AT₁ receptor-blocking mechanism for the inhibitory effect of RPYL on angiotensin II-induced vasoconstriction. Angiotensin receptor blocker (ARB) drugs are a series of chemically related imidazol derivatives used in the clinical setting for hypertension treatment because of their ability to bind to angiotensin AT₁ receptors, thereby inhibiting vasoconstriction and other cellular actions of angiotensin II.^{23,24} Valsartan, a member of this drug family²⁵ has been used in our study as positive control both in vasoconstriction and binding experiments. Taking into account the concentrations used, RPYL was much less potent than valsartan in both experimental settings.

The inhibitory effects of food-derived antihypertensive peptides on angiotensin II-induced vasoconstriction have not been extensively studied, and when done no inhibition has been found. Others have reported the lack of effect of the milk-derived tripeptide IPP²⁶ and the sardine muscle-derived dipeptide VY²⁷ on angiotensin II-induced vasoconstriction. In a previous study with rationally designed heptapeptides, we found that the ACE inhibitor

antihypertensive heptapeptide PACEI50 (RKWHFLW) did not modify angiotensin II-induced vasoconstriction.²⁸ With regard to LF-derived peptides, the crude LF pepsin hydrolysate before ultrafiltration (LFH) did not inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction, did not modify blood pressure in SHR, and showed much less inhibitory potency on ACE than LFH<3 kDa,^{11,12} thus indicating that the antihypertensive effects of the LF hydrolysate are due to the bioactive properties of its low molecular weight peptides like LIWKL and RPYL.

To the best of our knowledge, the present study for the first time shows the ability of antihypertensive bioactive peptides to inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction by an angiotensin AT₁ receptor blocking mechanism. With regard to non peptide substances, inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction has been reported to underlie the antihypertensive effects of compounds like nitro-oleic acid, a NO-derived fatty acid,²⁹ and especially plant extracts used in folk medicine.³⁰⁻³⁴ Moreover, proanthocyanidins and alkaloids from some plant extracts are angiotensin AT₁ receptor binding compounds.^{21,35,36} On the other hand, inhibitory effects on renin activity, the rate limiting enzyme upstream the RAS,³⁷ have been reported for hemp seed protein hydrolysates,³⁸ flaxseed protein hydrolysate fractions³⁹ and peptides from pea protein hydrolysates,⁴⁰ as well as for peptides from a protein hydrolysate of the macroalga *Palmaria palmate*.⁴¹ In most of these cases, inhibitory effects were observed on both renin and ACE activities.³⁸⁻⁴⁰ Therefore, bioactive peptides with antihypertensive potential can be multifunctional peptides inhibiting more than one of the RAS steps: generation of angiotensin I from angiotensinogen by renin, generation of vasoactive angiotensin II from angiotensin I by ACE, or activation of the AT₁ receptor by angiotensin II.³⁷

The endothelin system, similar to the RAS, is another peptidic system with an increasingly recognized role in blood pressure regulation and hypertension pathophysiology.⁴² Of particular relevance in the cardiovascular system, endothelin-1 has powerful vasoconstrictor and pressor properties. The gene product preproendothelin-1 is cleaved by a furin-like endopeptidase to form a biologically inactive intermediate termed big endothelin-1. Next, big ET-1 is cleaved by an endothelin-converting enzyme (ECE) to form endothelin-1, which binds to vascular ET_A receptors to induce vasoconstriction.⁴³ Both AT₁ and ET_A receptors belong to the class 1 of G protein-coupled receptors,⁴⁴ and dual action AT₁ and ET_A receptor antagonists reduce blood pressure in experimental hypertension.⁴⁵ Moreover, angiotensin AT₁ receptor binding alkaloids from the root of *Bocconia frutescens* also show weaker binding to endothelin ET_A receptors.³⁵ Our results show that neither LFH<3 kDa nor RPYL, the peptide with the highest inhibitory effect on angiotensin II-induced vasoconstriction, modified the vasoconstriction induced by endothelin-1, thus supporting the selective effects of LF-derived peptides on the AT₁ receptor. In a previous study, we reported that LfcinB-derived peptides hinder endothelin-1 generation by inhibiting ECE activity but do not act on downstream ET_A receptors or intracellular signal transduction mechanisms leading to vasoconstriction.¹⁷

Some considerations have to be made regarding availability of LF-derived peptides both in the present experiments and in *in vivo* circumstances. Peptidases are present in the wall of blood vessels, both in the endothelial layer and in the smooth muscle.⁴⁶ In addition to ACE⁹ and ECE¹⁷ activities previously shown in the isolated rabbit carotid artery used in our *ex vivo* assays, some other vascular peptidases hydrolyze endogenous vasoactive peptides thus interfering with their biological effects.^{47,48} A possible hydrolytic

effect of vascular peptidases on LF-derived peptides during their incubation with the carotid arteries cannot be dismissed. Furthermore, depending on the acid base nature of their amino acid residues, peptide-peptide ionic interactions can occur to form quite stable non covalent complexes.⁴⁹ In our study, interaction between LF-derived peptides and angiotensin II to form peptide complexes unable to bind to AT₁ receptors has not been assessed. The influence of such mechanism on availability of LF-derived peptides and their inhibitory effects on angiotensin II-induced contraction cannot be discarded. Finally, bioavailability of peptides after oral administration is needed to guarantee bioactivity.¹⁴ The few bioavailability studies performed *in vivo* show the detection of VPP and IPP in plasma in picomolar to nanomolar concentrations⁵⁰ with elimination half-lives of about 2 min.⁵¹ The low bioavailability found for most natural peptides raises questions as to whether those peptides lower blood pressure only via an ACE-inhibiting mechanism in blood vessels. Although plasma levels of the peptides were not measured in our studies reporting the antihypertensive effects of orally administered LfcinB₂₀₋₂₅,¹⁰ LIWKL and RPYL,¹² we showed RPYL to be particularly resistant to simulated gastrointestinal digestion.¹² Moreover, RPYL and the other LF-derived peptides add their inhibitory effects on angiotensin II effects to ACE inhibition.

In conclusion, LF-derived peptides released from different regions of the protein inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction by blocking angiotensin AT₁ receptors. The lack of effects on endothelin-1-induced, ET_A receptor-mediated vasoconstriction as well as on depolarization-induced vasoconstriction points to a selective effect of the peptides. Therefore, inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction is suggested as a potential

mechanism also contributing along with ACE inhibition to the antihypertensive effect of some LF-derived peptides.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Javier López-Díez and Sonia Ruiz-Piquer for their technical assistance.

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants AGL2010-21009 from 'Ministerio de Educación y Ciencia - FEDER', Consolider Ingenio 2010, Fun-C-Food, CSD2007-00063, and network RETICS INVICTUS – RD12/0014/0004 from 'Instituto de Salud Carlos III'. R. Fernández-Musoles is recipient of a fellowship from 'Ministerio de Educación y Ciencia' (BES-2008-004472).

REFERENCES

Ruilope, L.M. Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* 2011, 9, 267-275.

Roberfroid, M.B. Global view on functional foods: European perspectives. *Br. J. Nutr.* 2002, 88 (suppl 8), S133-S138.

Hartmann, R.; Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007, 18, 163-169.

Fragasso, G.; Maranta, F.; Montanaro, C.; Salerno, A.; Torlasco, C.; Margonato, A. Pathophysiologic therapeutic targets in hypertension: a cardiological point of view. *Expert Opin. Ther. Targets* 2012, 16, 179-193.

Hong, F.; Ming, L.; Yi, S.; Zhanxia, L.; Yongquan, W.; Chi, L. The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides* 2008, 29, 1062-1071.

Hernández-Ledesma, B.; del Mar Contreras, M.; Recio, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2011, 165, 23-35.

González-Chávez, S.A.; Arévalo-Gallegos, S.; Rascón-Cruz, Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, 33, 301.e1-301.e8.

Wakabayashi, H.; Takase, M.; Tomita, M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1277-1287.

Centeno, J.M.; Burguete, M.C.; Castelló-Ruiz, M.; Enrique, M.; Vallés, S.; Salom, J.B.; Torregrosa, G.; Marcos, J.F.; Alborch, E.; Manzanares, P. Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5323-5329.

Ruiz-Giménez, P.; Ibáñez, A.; Salom, J.B.; Marcos, J.F.; López-Díez, J.J.; Vallés, S.; Torregrosa, G.; Alborch, E.; Manzanares, P. Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 6721-6727.

Ruiz-Giménez, P.; Burguete, M.C.; Castello-Ruiz, M.; Marcos, J.F.; Salom, J.B.; Vallés, S.; Torregrosa, G.; Alborch, E.; Manzanares, P. Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on angiotensin I-converting enzyme-dependent vasoconstriction. *Int. Dairy J.* 2007, 17, 1212-1215.

Ruiz-Giménez, P.; Salom, J.B.; Marcos, J.F.; Valles, S.; Martínez-Maqueda, D.; Recio, I.; Torregrosa, G.; Alborch, E.; Manzanares, P. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chem.* 2012, 131, 266-273.

Fernández-Musoles, R.; Manzanares, P.; Burguete, M.C.; Alborch, E.; Salom, J.B. In vivo angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Res. Int.* 2013, 54, 627-632.

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

Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I.; Hernández-Ledesma, B. Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct.* 2012, 3, 350-361.

Marques, C.; Amorim, M.M.; Pereira, J.O.; Pintado, M.E.; Moura, D.; Calhau, C.; Pinheiro, H. Bioactive peptides: are there more antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition? *Curr. Pharm. Des.* 2012, 18, 4706-4713.

Fernández-Musoles, R.; López-Díez, J.J.; Torregrosa, G.; Vallés, S.; Alborch, E.; Manzanares, P.; Salom, J.B. Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction. *Peptides* 2010, 31, 1926-1933.

Fernández-Musoles, R.; Salom, J.B.; Martínez-Maqueda, D.; López-Díez, J.J.; Recio, I.; Manzanares, P. Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolysates: inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes. *Food Chem.* 2013, 139, 994-1000.

Sentandreu, M.A.; Toldrá, F. A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chem.* 2006, 97, 546-554.

Faber, J.E.; Yang, N.; Xin, X. Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001, 298, 441-452.

Caballero-George C.; Vanderheyden, P.M.; De Bruyne, T.; Shahat, A.A.; Van den Heuvel, H.; Solis, P.N.; Gupta, M.P.; Claeys, M.; Pieters, L.; Vauquelin, G.; Vlietinck AJ. *In vitro* inhibition of [³H]-angiotensin II binding on the human AT₁ receptor by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia* bark. *Planta Med.* 2002, 68, 1066-1071.

Zhang, J.; Wang, J.L.; Zhou, Z.M.; Li, Z.H.; Xue, W.Z.; Xu, D.; Hao, L.P.; Han, X.F.; Fei, F.; Liu, T.; Liang, A.H. Design, synthesis and biological activity of 6-substituted carbamoyl benzimidazoles as new nonpeptidic angiotensin II AT₁ receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20, 4208-4216.

Taylor, A.A.; Siragy, H.; Nesbitt, S. Angiotensin receptor blockers: pharmacology, efficacy, and safety. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 2011, 13, 677-686.

Sica, D.A. Angiotensin receptor blockers: new considerations in their mechanism of action. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)* 2006, 8, 381-385.

Criscione, L.; de Gasparo, M.; Bühlmayer, P.; Whitebread, S.; Ramjoué, H.P.; Wood, J. Pharmacological profile of valsartan: a potent, orally active, nonpeptide antagonist of the angiotensin II AT₁-receptor subtype. *Br. J. Pharmacol.* 1993, 110, 761-771.

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. Physiol. Pharmacol.* 2001, 52, 745-754.

Vercruysse, L.; Morel, N.; Van Camp, J.; Szust, J.; Smagghe, G. Antihypertensive mechanism of the dipeptide Val-Tyr in rat aorta. *Peptides* 2008, 29, 261-267.

Ruiz-Giménez, P.; Marcos, J.F.; Torregrosa, G.; Lahoz, A.; Fernández-Musoles, R.; Valles, S.; Alborch, E.; Manzanares, P.; Salom, J.B. Novel antihypertensive hexa- and heptapeptides with ACE-inhibiting properties: from the *in vitro* ACE assay to the spontaneously hypertensive rat. *Peptides* 2011, 32, 1431-1438.

Zhang, J.; Villacorta, L.; Chang, L.; Fan, Z.; Hamblin, M.; Zhu, T.; Chen, C.S.; Cole, M.P.; Schopfer, F.J.; Deng, C.X.; Garcia-Barrio, M.T.; Feng, Y.H.; Freeman, B.A.; Chen, Y.E. Nitro-oleic acid inhibits angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* 2010, 107, 540-548.

Poh, T.F.; Ng, H.K.; Hoe, S.Z.; Lam, S.K. *Gynura procumbens* causes vasodilation by inhibiting angiotensin II and enhancing bradykinin actions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2013, 61, 378-384.

Xue, B.; Li, J.; Chai, Q.; Liu, Z.; Chen, L. Effect of total flavonoid fraction of *Astragalus complanatus* R. Brown on angiotensin II-induced portal-vein contraction in hypertensive rats. *Phytomedicine* 2008, 15, 759-762.

Lau, Y.S.; Kwan, C.Y.; Ku, T.C.; Hsieh, W.T.; Wang, H.D.; Nishibe, S.; Dharmani, M.; Mustafa, M.R. *Apocynum venetum* leaf extract, an antihypertensive herb, inhibits rat aortic contraction induced by angiotensin II: a nitric oxide and superoxide connection. *J. Ethnopharmacol.* 2012, 143, 565-571.

Kono, R.; Okuno, Y.; Nakamura, M.; Inada, K.; Tokuda, A.; Yamashita, M.; Hidaka, R.; Utsunomiya, H. Peach (*Prunus persica*) extract inhibits angiotensin II-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells. *Food Chem.* 2013, 139, 371-376.

Guerrero, E.I.; Morán-Pinzón, J.A.; Ortíz, L.G.; Olmedo, D.; del Olmo, E.; López-Pérez, J.L.; San Feliciano, A.; Gupta, M.P. Vasoactive effects of different fractions from two

Panamanians plants used in Amerindian traditional medicine. J. Ethnopharmacol. 2010, 131, 497-501.

Caballero-George, C.; Vanderheyden, P.M.; Apers, S.; Van den Heuvel, H.; Solis, P.N.; Gupta, M.P.; Claeys, M.; Pieters, L.; Vauquelin, G.; Vlietinck, A.J. Inhibitory activity on binding of specific ligands to the human angiotensin II AT₁ and endothelin 1 ET_A receptors: bioactive benzo[c]phenanthridine alkaloids from the root of *Bocconia frutescens*. *Planta Med.* 2002, 68, 770-775.

Caballero-George, C.; Vanderheyden, P.M.; Solis, P.N.; Gupta, M.P.; Pieters, L.; Vauquelin, G.; Vlietinck, A. *In vitro* effect of sanguinarine alkaloid on binding of [³H]candesartan to the human angiotensin AT₁ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 2003, 458, 257-262.

Herichova, I.; Szantoova, K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr. Regul.* 2013, 47, 39-52.

Girgih, A.T.; Udenigwe, C.C.; Abayomi, H.L.; Adebisi, P.; Aluko, R.E. Kinetics of enzyme inhibition and antihypertensive effects of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2011, 88, 1767-1774.

Udenigwe, C.C.; Lin, Y.S.; Houc, W.C.; Aluko, R.E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *J. Func. Foods* 2009, 1, 199-207.

Li, H.; Aluko, R.E. Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 11471-11476.

Fitzgerald, C.; Mora-Soler, L.; Gallagher, E.; O'Connor, P.; Prieto, J.; Soler-Vila, A.; Hayes, M. Isolation and characterization of bioactive pro-peptides with *in vitro* renin inhibitory activities from the macroalga *Palmaria palmata*. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 7421-7427.

Schiffrin, E.L. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 2005, 43, 19-29.

Kedzierski, R.M.; Yanagisawa, M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41, 851-876.

Foord, S.M.; Bonner, T.I.; Neubig, R.R.; Rosser, E.M.; Pin, J.P.; Davenport, A.P.; Spedding, M.; Harmar, A.J. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol. Rev.* 2005, 57, 279-288.

Kowala, M.C.; Murugesan, N.; Tellew, J.; Carlson, K.; Monshizadegan, H.; Ryan, C.; Gu, Z.; Kane, B.; Fadnis, L.; Baska, R.A.; Beyer, S.; Arthur, S.; Dickinson, K.; Zhang, D.; Perrone, M.; Ferrer, P.; Giancarli, M.; Baumann, J.; Bird, E.; Panchal, B.; Yang, Y.; Trippodo, N.; Barrish, J.; Macor, J.E. Novel dual action AT₁ and ET_A receptor antagonists reduce blood pressure in experimental hypertension. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 309, 275-284.

Palmieri, F.E.; Bausback, H.H.; Ward, P.E. Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth muscle aminopeptidase M. *Biochem. Pharmacol.* 1989, 38, 173-180.

Ryan, J.W. Peptidase enzymes of the pulmonary vascular surface. *Am. J. Physiol.* 1989, 257, L53-L60.

Rouissi, N.; Nantel, F.; Drapeau, G.; Rhaleb, N.E.; Dion, S.; Regoli, D. Inhibitors of peptidases: how they influence the biological activities of substance P, neurokinins, kinins and angiotensins in isolated vessels. *Pharmacology.* 1990, 40, 185-195.

Woods, A.S.; Huestis, M.A. A study of peptide-peptide interaction by matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001, 12, 88-96.

Foltz, M.; Meynen, E.E.; Bianco, V.; Van Platerink, C.; Koning, T.M.; Kloek, J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *J. Nutr.* 2007, 137, 953-958.

Van der Pijl, P.C.; Kies, A.K.; Ten Have, G.A.; Duchateau, G.S.; Deutz, N.E. Pharmacokinetics of proline-rich tripeptides in the pig. *Peptides*. 2008, 29, 2196-2202.

DISCUSIÓN GENERAL

Hasta la fecha, ECA ha sido la diana más estudiada en la búsqueda de péptidos inhibidores con efectos antihipertensivos derivados principalmente de proteínas lácteas (Martinez-Maqueda y cols., 2012) pero también de otras fuentes animales o vegetales (Iwaniak y cols., 2014). Sin embargo, el sistema endotelina ha ido cobrando importancia en la regulación de la presión arterial y en la fisiopatología de la hipertensión (Schiffrin, 2005), impulsando el desarrollo de fármacos antihipertensivos a través de la inhibición de ECE o el antagonismo de los receptores de endotelina (Trapani y cols., 2000, Battistini y cols., 2002, Prasad y cols., 2009).

En la presente tesis se ha profundizado en el mecanismo de acción de un hidrolizado de LF obtenido con pepsina y compuesto por péptidos de tamaño molecular inferior a 3 kDa (pHLF), cuyos efectos de inhibición *in vitro* de la actividad de ECA y antihipertensivo en animales de experimentación fueron caracterizados en trabajos previos de nuestro laboratorio (Ruiz-Giménez y cols., 2012). Para abordar la posible participación de otros sistemas en el efecto antihipertensivo mostrado por este hidrolizado, en este caso el sistema endotelina, se necesitó poner a punto un método capaz de evaluar *in vitro* y *ex vivo* el efecto inhibitor sobre ECE y/o los receptores de ET-1. El método se validó con un set de 8 péptidos derivados de LfcinB de secuencia relacionada, cuyo efecto sobre ECA se conocía con anterioridad (Ruiz-Giménez y cols., 2010), con el objetivo de obtener datos sobre la existencia de una posible relación entre la secuencia peptídica y la función ejercida.

El nuevo método se aplicó al pHLF, lo que permitió señalar su capacidad de actuación a través de los sistemas RAS y endotelina, lo que contribuiría a su efecto antihipertensivo *in vivo*. Por otra parte, también se aplicó a hidrolizados

de LF obtenidos con otras proteasas (tripsina y proteinasa K) y a las secuencias más abundantes identificadas en los mismos.

En este contexto, el pHLF, que resultó ser el más prometedor de todos los hidrolizados testados, fue escogido para abordar en mayor profundidad un estudio de sus efectos sobre el sistema RAS. Para ello, se estudió el potencial antihipertensor del hidrolizado a dos niveles: primero, el efecto inhibitorio *in vivo* sobre la renina y ECA, que participan en la transformación del precursor angiotensinógeno en el vasopresor ang-II, y segundo, el efecto sobre la interacción ang-II-receptores AT₁, a través de los cuales se desencadena la respuesta vasoconstrictora.

1. Relevancia del sistema endotelina en el efecto antihipertensivo de los péptidos derivados de LF

El efecto antihipertensivo de pHLF puede atribuirse, al menos en parte, a la inhibición de ECA, enzima principal del sistema RAS (Ruiz-Gimenez y cols., 2007). En esta tesis planteamos profundizar en el estudio de los mecanismos a través de los cuales dicho hidrolizado genera su efecto antihipertensivo, contemplando la posibilidad de que hubieran otros mecanismos responsables que pudieran actuar de forma conjunta con la inhibición de ECA. Es por ello que se evaluó el potencial del pHLF sobre el sistema endotelina, otro de los sistemas de regulación de la presión arterial, hasta la fecha menos estudiado que el sistema RAS, pero con una importancia creciente. Para ello fue necesaria la puesta a punto de un método de evaluación del efecto de péptidos bioactivos sobre el sistema endotelina en condiciones representativas de la respuesta real en un organismo vivo.

El método desarrollado combina un test *in vitro* para evaluar el efecto de inhibición sobre la actividad enzimática ECE y un test funcional *ex vivo* para evaluar el efecto sobre la vasoconstricción arterial mediada por ECE y promovida por la interacción de ET-1 con los receptores específicos ET_A.

Respecto al test *in vitro*, se utilizó un sustrato sintético, SPF V, cuya hidrólisis libera un fragmento con propiedades fluorescentes (Gokhale y Cowan, 2006). Dado que SPF V no es un sustrato específico de ECE, pudiendo actuar también como sustrato de NEP y otras enzimas relacionadas (Johnson, 2000), se utilizó también big ET-1, el sustrato natural específico y selectivo de ECE. Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo con ocho péptidos derivados de LfcinB, cuya inhibición *in vitro* de ECA y su efecto antihipertensivo había sido previamente caracterizado (Ruiz-Giménez y cols., 2010). Usando el sustrato artificial SPF V, cuatro de ellos (LfcinB₁₇₋₃₁, LfcinB₂₀₋₂₅, LfcinB₁₈₋₂₅ y LfcinB₁₇₋₂₂) no inhibieron la actividad ECE, mientras que los 4 péptidos restantes (LfcinB₁₇₋₃₂, LfcinB₁₉₋₂₅, LfcinB₁₇₋₂₅ y LfcinB₁₇₋₂₄) indujeron una inhibición significativa de la actividad de ECE, aunque ninguna secuencia provocó una inhibición superior al 50%. Con respecto al sustrato natural big ET-1, los ocho péptidos derivados de LfcinB inhibieron ECE, con actividades residuales que oscilaron desde el 81% para LfcinB₂₀₋₂₅ al 14% para LfcinB₁₇₋₂₅, es decir, provocaron inhibición enzimática con porcentajes desde un 19% a un 86%, respectivamente.

Estos resultados revelaron que ambos métodos no estaban dando la misma información acerca del potencial de inhibición de ECE de los péptidos ensayados. La inhibición de ECE, excepto para LfcinB₁₇₋₂₄, fue significativamente más alta cuando se utilizó big ET-1. Además, se realizó un análisis de correlación enfrentando las actividades residuales de ECE

calculadas con cada método y se observó que no presentaban una buena correspondencia, con un coeficiente de Pearson de 0.5168 que no supera el test de correlación, $P > 0.05$. Por tanto, la mayor inhibición de ECE empleando big ET-1, el hecho de que es el sustrato natural y la falta de correlación con los efectos de inhibición obtenidos con el sustrato sintético, indican que el método que emplea el sustrato SPF V no es el más adecuado para evaluar el efecto de péptidos bioactivos sobre el sistema endotelina.

Los estudios *ex vivo* con arterias aisladas en baño de órganos registran efectos vasoactivos y de ese modo aportan evidencia funcional de la capacidad de los péptidos inhibidores de ECE para inhibir la vasoconstricción ECE-dependiente. En primer lugar, la validez de los ensayos *ex vivo* para evaluar la capacidad de los péptidos de inhibir la vasoconstricción generada por big ET-1 en la arteria carótida de conejo, se demostró utilizando un inhibidor de ECE, el fosforamidón, que inhibió de manera concentración-dependiente la contracción arterial inducida por big ET-1. Cuando estos ensayos se aplicaron a los péptidos derivados de LfcinB, seis produjeron inhibición de la vasoconstricción dependiente de ECE. De los dos restantes, LfcinB₁₇₋₂₄ no mostró inhibición alguna y LfcinB₂₀₋₂₅ aumentó la vasoconstricción inducida por big ET-1. Curiosamente, la mayoría de los péptidos inhibieron la vasoconstricción en mayor grado que el fosforamidón, lo que podría deberse a las concentraciones empleadas, 1 y 10 μM para el fosforamidón y 30 μM para los péptidos, sumado al hecho de que el fosforamidón es un inhibidor no selectivo de metaloproteasas (Ikegawa y cols., 1990) y probablemente la afinidad por ECE sea menor. Además, la ECE vascular se localiza tanto en el endotelio como en el músculo liso, por lo que podría haber diferencias funcionales de actividad según su localización (Zimmermann y cols., 2002).

Los efectos de inhibición de los péptidos sobre la actividad ECE empleando el sustrato natural big ET-1, mostraron una correlación positiva respecto a los efectos de inhibición sobre la vasoconstricción inducida por big ET-1, expresada tanto en términos de Emax como de pendiente media. Esta comparación confirmó que el método *in vitro* adecuado para evaluar los efectos de inhibición sobre el sistema endotelina era el que empleaba big ET-1. Es más, dada la correlación, podría emplearse el método *in vitro* con big ET-1 para sustituir de manera eficaz los ensayos *ex vivo* en arterias, lo que supone una reducción del uso de animales, tiempo y coste económico.

Cabe destacar que LfcinB₁₇₋₂₄ no mostró inhibición de la vasoconstricción ECE-dependiente y que LfcinB₂₀₋₂₅ incrementó la vasoconstricción, en contraste con lo observado en los ensayos *in vitro*. Aunque esta aparente discrepancia merece una investigación más profunda, habría que tener en cuenta dos aspectos metodológicos. En primer lugar, en el test *in vitro* se empleó ECE-1 recombinante de origen humano, mientras que en el ensayo *ex vivo*, ECE es de conejo. En la literatura se han descrito cuatro isoformas de ECE-1 (Schweizer y cols., 1997, Valdenaire y cols., 1999) que presentan diferentes niveles de conservación con las secuencias de las proteínas murinas y bovinas correspondientes (Lindenau y cols., 2006). Aunque no se han identificado diferentes isoformas de ECE-1 en conejo, no se pueden descartar diferencias entre la isoforma vascular de conejo y la isoforma humana empleada *in vitro*. En segundo lugar, a diferencia de la reacción *in vitro*, donde ECE cataliza la producción de ET-1 a partir de su precursor big ET-1, las rutas enzimáticas implicadas en la generación de ET-1 en vasos aislados puede ser más compleja. En aorta de conejo, se conoce la ruta principal en la cual ECE produce ET-1 a partir de big ET-1; no obstante, se ha descrito una ruta alternativa con dos pasos enzimáticos donde una quimasa hidroliza big ET-1

resultando el intermediario ET-1(1-31) que, posteriormente, es transformado por NEP en ET-1 (Tirapelli y cols., 2006).

Estos resultados nos han permitido completar la caracterización de los efectos vasoactivos de péptidos derivados de LfcinB, cuya inhibición de la vasoconstricción ECA-dependiente ya se había descrito (Ruiz-Giménez y cols., 2010). Esta tesis ha revelado diferencias importantes cuando se comparan los efectos de inhibición *ex vivo* sobre ambas endopeptidasas. Respecto a la inhibición de la vasoconstricción ECE-dependiente, LfcinB₁₉₋₂₅ fue el inhibidor más efectivo, con un 66% de reducción de la contracción inducida por big ET-1, mientras que esta secuencia no fue efectiva sobre la contracción inducida por ang-I. Por otra parte, LfcinB₁₇₋₂₄ y LfcinB₂₀₋₂₅, los inhibidores más efectivos sobre la vasoconstricción ECA-dependiente (30% de reducción), no inhibieron la contracción inducida por big ET-1. Por el contrario, los 5 péptidos restantes (LfcinB₁₇₋₂₅, LfcinB₁₇₋₃₁, LfcinB₁₇₋₃₂, LfcinB₁₈₋₂₅ y LfcinB₁₇₋₂₂.) pueden ser considerados inhibidores duales de vasopectidasas, es decir, que son capaces de inhibir ECA y ECE. En este sentido, el péptido ALPMHIR, derivado de la proteína láctea β -lactoglobulina, se describió como un inhibidor de ECA capaz también de inhibir la liberación de ET-1 en células endoteliales (Maes y cols., 2004).

El ensayo de inhibición *in vitro* y *ex vivo* empleando big ET-1, también se puede aplicar a muestras más complejas como son los hidrolizados de LF obtenidos con pepsina y proteinasa K. Ambos hidrolizados mostraron inhibición significativa de la actividad ECE, observándose un efecto concentración-dependiente. A la máxima concentración ensayada, 500 μ g/mL, el HLF < 3 kDa obtenido con proteinasa K, prácticamente abolió (98% de inhibición) la conversión de big ET-1 en ET-1, mientras que el pHLF mostró

una inhibición de la actividad ECE de aproximadamente el 60%. Hasta la fecha, únicamente se habían descrito digeridos proteicos de atún y de carne de res, con un efecto inhibitor de la actividad ECE del 40-45 % (Okitsu y cols., 1995). Respecto a la capacidad de inhibición de ECE en tejido vascular *ex vivo*, los dos hidrolizados inhibieron significativamente (31% y 21 % respectivamente) la vasoconstricción mediada por ECE e inducida por big ET-1. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con los péptidos derivados de LfcinB sobre el sistema endotelina, donde en general se manifestó una buena correlación entre los efectos de inhibición *in vitro* y *ex vivo*, en el caso de los hidrolizados, el pHLF indujo una mayor inhibición de la vasoconstricción que el HLF < 3 kDa obtenido con proteinasa K, a pesar de que en los test *in vitro*, fue este último el que mostró mayor eficacia. Dos de los péptidos mayoritarios identificados en el HLF obtenido con proteinasa K (GILRPY y REPYFGY) también mostraron efecto inhibitor *in vitro* de ECE de manera concentración-dependiente, lo que sugiere que, al menos en parte, podrían ser los responsables del efecto del hidrolizado. La capacidad inhibitoria de ambos péptidos se encuentran dentro del rango de inhibición determinado para los péptidos derivados de LfcinB.

Establecida la capacidad de los péptidos derivados de LF de inhibir la vasoconstricción mediada por ECE, nos planteamos comprobar si la generación de dicho efecto, en principio propuesto a través de la inhibición de la enzima, se producía también a través de algún mecanismo que implicara la participación de los receptores ET_A. Para ello, en los ensayos *ex vivo* se sustituyó el sustrato enzimático big ET-1 por su producto de reacción ET-1, el cual para inducir la vasoconstricción de la arteria debe unirse a los receptores ET_A (Kedzierski y Yanagisawa, 2001). La validez de estos ensayos se comprobó con el fármaco BQ-123, antagonista de los receptores ET_A, que inhibió de manera concentración-dependiente la vasoconstricción inducida

por ET-1. Por el contrario, ni el fosforamidón ni los péptidos LfcinB₁₉₋₂₅ y RPYL, ni tampoco el pHLF modificaron la vasoconstricción inducida por ET-1, por lo que puede descartarse su actuación a través de los receptores ET_A o a través de mecanismos intracelulares de transducción de la señal que conduzcan a la vasoconstricción.

Finalmente, no hay información disponible respecto a la relación secuencia-función de péptidos inhibidores de ECE, en contraste con la descrita para péptidos inhibidores de ECA. Sin embargo, basándonos en nuestros propios resultados *in vitro*, observamos que la elongación de la secuencia LfcinB₁₇₋₂₅ en su extremo C-terminal (LfcinB₁₇₋₃₁ y LfcinB₁₇₋₃₂) no tuvo efecto alguno en la inhibición de ECE. Por otra parte, la eliminación del residuo de arginina en el extremo C-terminal de LfcinB₁₇₋₂₅ (LfcinB₁₇₋₂₄) así como elongaciones en el extremo N-terminal (LfcinB₁₈₋₂₅, LfcinB₁₉₋₂₅ y LfcinB₂₀₋₂₅) disminuyeron la inhibición de ECE. No obstante, los resultados *ex vivo* no confirmaron estas observaciones, probablemente debido a las diferencias metodológicas comentadas anteriormente entre los ensayos *in vitro* y *ex vivo*, por lo que no se puede establecer una relación secuencia función clara.

2. Efecto antihipertensivo de hidrolizados enzimáticos de LF

Uno de los objetivos planteados en esta tesis fue la obtención de nuevos hidrolizados de LF con efecto antihipertensivo, así como profundizar en la caracterización del pHLF, cuya capacidad de inhibir ECA *in vitro* (IC₅₀ = 14.3 ± 3.3 µg/mL) y su efecto antihipertensivo tras administración aguda en SHR ya se había descrito (Ruiz-Giménez y cols., 2012).

Con el objetivo de obtener hidrolizados de LF con distinto perfil peptídico que pHLF, se generaron hidrolizados con tripsina, otra proteasa gástrica frecuentemente utilizada para obtener hidrolizados antihipertensivos, y con proteinasa K, enzima de origen microbiano con una especificidad de sustrato bastante amplia. Ambos ultrafiltrados (< 3 kDa) inhibieron ECA con unos valores IC₅₀ de 1.3 ± 0.1 µg/mL para proteinasa K y 6.9 ± 0.2 µg/mL para tripsina, ligeramente inferiores al valor de IC₅₀ descrito para pHLF, por lo que era razonable pensar que también podrían provocar un efecto antihipertensivo en SHR. Sin embargo, cuando se evaluaron sus efectos sobre SHRs, en las mismas condiciones que previamente se utilizaron con pHLF, sólo se observó efecto antihipertensivo con el HLF < 3 kDa obtenido con proteinasa K, el cual redujo significativamente la PAS a las 3 h (-19 ± 7 mmHg) y 4 h (-15 ± 4 mmHg) tras la administración, aunque el efecto no se mantuvo hasta las 24 h, tal y como se observó para pHLF (Ruiz-Giménez y cols., 2012).

Estos resultados indican que los efectos antihipertensivos de los HLFs < 3 kDa no se correlacionaron con sus efectos *in vitro* sobre la actividad ECA, tal y como ya se había descrito para ciertos péptidos derivados de alimentos (Li y cols., 2004, Vermeirssen y cols., 2004a) y también para los péptidos derivados de LfcinB (Ruiz-Giménez y cols., 2010). En concordancia con nuestros resultados se han descrito digeridos de proteínas del suero lácteo con una fuerte inhibición de la actividad ECA pero ningún efecto antihipertensivo en ratas SHR, y en sentido inverso, digeridos con una débil inhibición de ECA pero que produjeron un fuerte descenso de la PAS en SHR (Abubakar y cols., 1998). Como ya se ha comentado en la introducción, este comportamiento se justifica por la escasa biodisponibilidad de los péptidos que incluso podrían degradarse o fragmentarse durante la digestión gastrointestinal o durante la circulación vascular, liberando péptidos con una actividad ECA más potente

(Vermeirssen y cols., 2004a). Otra posible explicación a estas observaciones va ligada al efecto dual que produce ECA, ya que no sólo transforma la ang-I en ang-II, sino que inactiva la bradiquinina, un potente vasodilatador, que estimula la liberación de óxido nítrico y la producción de prostaciclina en el endotelio, ambas acciones con efecto hipotensor (Rousseau-Ralliard y cols., 2010). Además, se ha sugerido que algunos péptidos derivados de la leche no actúan directamente como inhibidores de ECA *in vivo*, sino a través de otras rutas, mediante las cuales ejercerían su efecto hipotensor (Udenigwe y Mohan, 2014, Majumder y Wu, 2015). En esta tesis hemos demostrado la relevancia del sistema endotelina en el efecto antihipertensivo de los hidrolizados de LF.

De especial importancia es el hecho de que los hidrolizados obtenidos con proteinasa K y pepsina no produjeron ningún efecto sobre la PAS de ratas normotensas WKY: la administración oral de ambos hidrolizados a 200 mg/kg, e incluso a una dosis superior de 400 mg/kg, no indujo efecto hipotensor significativo. Estos resultados sugieren que los efectos de ambos hidrolizados se presentan únicamente durante el estado hipertensivo. En el caso de que este efecto diferencial se mantuviera en humanos, sería un valor añadido para estos hidrolizados, ya que mostrarían efectos sobre pacientes hipertensos sin que tuvieran efectos sobre sujetos normotensos.

Para confirmar la participación de ECA en el mecanismo que subyace bajo el efecto antihipertensivo de los hidrolizados obtenidos con pepsina y proteinasa K, se evaluaron sus actividades sobre la vasoconstricción arterial *ex vivo* dependiente de ECA. La validez de estos ensayos ya fue demostrada en estudios previos realizados por nuestro grupo (Centeno y cols., 2006), comprobándose que ang-I induce la vasoconstricción mediada por ECA de arterias aisladas de carótida de conejo, la cual es inhibida de manera

concentración-dependiente por la adición del fármaco inhibidor de ECA captopril, cuyo efecto sobre la contracción inducida por ang-II es nulo (Centeno y cols., 2006). En los experimentos *ex vivo*, el pHLF indujo una inhibición significativa, reduciendo la vasoconstricción ECA-dependiente un 29% a una concentración de 100 µg/mL. En un trabajo anterior se describió que un HLF con pepsina no ultrafiltrado inhibió el 40% de la vasoconstricción inducida por ang-I, a una concentración de 1350 µg/mL (Ruiz-Gimenez y cols., 2007), más de 10 veces superior a la empleada para el HLF ultrafiltrado, lo que indica que el efecto antivasoconstrictor podría ser principalmente atribuible a componentes peptídicos con masas moleculares menores a 3 kDa, hecho que ha sido descrito con anterioridad (Mullally y cols., 1997). Por el contrario, el HLF < 3 kDa generado con proteinasa K no mostró ningún efecto sobre la vasoconstricción dependiente de ECA. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la inhibición de ECA y ECE en tejido vascular, se ha evidenciado la capacidad del pHLF de actuar sobre ambas enzimas, apuntando a la inhibición dual de ECA y ECE como el mecanismo implicado en el efecto antihipertensivo observado en ratas SHR. En cambio, la inhibición exclusivamente de ECE parece ser el mecanismo implicado en el moderado efecto antihipertensivo mostrado por el HLF < 3 kDa generado con proteinasa K.

Esta tesis ha puesto de manifiesto la capacidad tanto de la pepsina como de la proteinasa K para generar hidrolizados de LF con efecto antihipertensivo en SHR. La identificación de los péptidos mayoritarios presentes en el hidrolizado de proteinasa K ha demostrado, como era de esperar, el perfil peptídico diferente de ambos hidrolizados. Ninguna de las secuencias identificadas en pLFH < 3kDa (Ruiz-Giménez y cols., 2012) se ha identificado en el hidrolizado obtenido con proteinasa K, donde tampoco aparece ningún péptido derivado

de LfcinB. Muchos de los 37 péptidos identificados en el hidrolizado de proteinasa K poseen en el extremo C-terminal aminoácidos alifáticos y aromáticos tales como alanina, valina, leucina, tirosina, fenilalanina y triptófano, cuya presencia favorece la inhibición de ECA (Cheung y cols., 1980). Las dos secuencias mayoritarias presentes en el hidrolizado de proteinasa K cuya inhibición *in vitro* de ECE hemos demostrado en este trabajo fueron GILRPY y REPYFGY. Sin lugar a dudas, sería necesaria una caracterización más detallada para poder asignar tanto la capacidad inhibitoria de ECE como el efecto antihipertensivo del hidrolizado de proteinasa K a secuencias concretas.

3. Relevancia del sistema RAS en el efecto antihipertensivo de pHLF

Inhibición *in vivo* de ECA

A pesar de los numerosos estudios que demuestran que hidrolizados y péptidos derivados de proteínas alimentarias inhiben ECA *in vitro*, en la mayoría de los casos no se ha abordado la inhibición de la enzima *in vivo*. Como parte del mecanismo homeostático responsable del mantenimiento de la presión sanguínea normal y del balance electrolítico, ECA es un componente clave del sistema RAS, cuya función principal es el corte de la ang-I para producir ang-II y degradar la bradiquinina. Por tanto, el efecto de inhibición de ECA *in vivo* puede ser evaluado midiendo la actividad de la ECA, tanto anclada a membranas tisulares como libre en el torrente circulatorio, y confirmado midiendo los niveles de ang-II circulante (Coates, 2003). En esta tesis se ha determinado el efecto del pHLF tras su administración crónica a SHR sobre las enzimas del sistema RAS. Para ello, se emplearon ratas SHR en

un rango de edad en el que la hipertensión se encontraba todavía en desarrollo (Kokubo y cols., 2005, Xiao y cols., 2010), a las cuales se les administraron dosis mantenidas del hidrolizado (782 mg/kg/día y 285 mg/kg/día) durante varias semanas, midiendo la presión arterial sistemáticamente y cuantificando en plasma diferentes componentes del sistema RAS.

Este estudio ha demostrado que la administración crónica oral a ratas SHR del pHLF atenuó e incluso revirtió la progresión de la hipertensión. Además, nuestros resultados mostraron que la actividad de la ECA sérica se redujo en las ratas SHR tras la administración crónica del hidrolizado. Esta inhibición de ECA se confirmó por la reducción de los niveles circulantes de ang-II y también de aldosterona, hormona esteroidea cuya secreción adrenal endocrina aumenta en presencia de ang-II (Carey y Siragy, 2003b). Algunos estudios de administración crónica de hidrolizados proteicos antihipertensivos han mostrado efectos de inhibición de ECA *in vivo*, aunque únicamente evidenciados por la reducción de la actividad de ECA en sangre (Yoshii y cols., 2001, Yang y cols., 2004), o la actividad ECA tisular (Nakano y cols., 2006, Shiozaki y cols., 2010, Wang y cols., 2012). Por el contrario, otros estudios no han logrado mostrar inhibición de ECA *in vivo* y se sugirieron mecanismos alternativos para explicar el efecto antihipertensivo crónico de los hidrolizados de proteínas. Por ejemplo, la reducción a nivel renal de la expresión del gen que codifica la renina, lo que provocó un descenso de los niveles de ang-II o el aumento de la expresión a nivel proteico de la eNOS en aorta y arterias mesentéricas, lo que se tradujo en una mejora de la relajación endotelial (Li y cols., 2011, Sanchez y cols., 2011). Adicionalmente a la inhibición de la actividad ECA, nuestros resultados también mostraron un incremento de la actividad de la renina plasmática, lo que se explica por el

hecho de que la inhibición de ECA induce un aumento compensatorio de la actividad de la renina debido a la reducción del efecto feedback negativo que ejerce la ang-II (Brunner y cols., 1993). Este aumento de la renina refuerza la inhibición de ECA como el mecanismo de acción del pHLF, tal y como algunos autores habían sugerido anteriormente para productos lácteos fermentados con efecto antihipertensivo crónico en ratas SHR (Sipola y cols., 2002a). Sin embargo, en determinados estudios se ha descrito el efecto contrario, es decir, que la inhibición de la renina conduce a un efecto hipotensor, como por ejemplo en hidrolizados de proteínas de la semilla de cáñamo (Girgih y cols., 2011), fracciones de hidrolizados de proteínas de linaza (Udenigwe y cols., 2009), péptidos de hidrolizados de guisante (Li y Aluko, 2010) y péptidos de hidrolizados de proteínas de la macroalga *Palmaria palmate* (Fitzgerald y cols., 2012). En muchos de estos casos, los efectos de inhibición se observaron tanto sobre la actividad de la renina como de la ECA (Udenigwe y cols., 2009, Li y Aluko, 2010, Girgih y cols., 2011).

Por último, comentar que la inhibición *in vivo* de la ECA tras la administración del pHLF se confirmó de forma indirecta por el aumento de la ingesta de líquido (efecto dipsogénico). Se ha asociado un aumento de la sed con la administración de sustancias inhibitoras de la ECA (Fitzsimons, 1998), aunque el efecto presentado por el hidrolizado fue superior al esperado cuando se comparó con el captopril.

Inhibición de la vasoconstricción mediada por los receptores de ang-II

Una vez demostrada la capacidad del pHLF para inhibir la principal enzima del sistema RAS, se evaluó su capacidad para inhibir la vasoconstricción

mediada por los receptores de ang-II. La inhibición del sistema RAS al nivel de los receptores AT₁ es también una de las dianas de los tratamientos antihipertensivos. Este efecto lo causan los fármacos bloqueantes de los receptores de angiotensina, por ejemplo el valsartan, debido a su habilidad para unirse a los receptores y consecuentemente inhibir la vasoconstricción y otros efectos celulares causados por ang-II (Sica, 2006, Taylor y cols., 2011).

Los ensayos funcionales *ex vivo* se validaron utilizando como control positivo el valsartan, que inhibió de manera concentración-dependiente la vasoconstricción inducida por ang-II, que en cambio no se vio afectada por el inhibidor de ECA captopril. Además de evaluar el hidrolizado, se incluyeron en el estudio las secuencias RPYL y LIWKL identificadas en el mismo (Ruiz-Giménez y cols., 2012), y además LfcinB₂₀₋₂₅ como péptido representativo de los derivados de LfcinB (Ruiz-Giménez y cols., 2010).

Los resultados demuestran que tanto el hidrolizado como las secuencias peptídicas fueron capaces de inhibir la vasoconstricción mediada por los receptores AT₁, lo que sugiere que este mecanismo de acción contribuiría junto con la inhibición de ECA a su efecto antihipertensivo. En el caso del hidrolizado, el efecto sobre la vasoconstricción inducida por ang-II podría deberse, al menos en parte, a las secuencias LIWKL y RPYL.

Además de los ensayos *ex vivo*, en esta tesis, como aproximación novedosa en el caso de péptidos antihipertensivos derivados de alimentos, se han realizado estudios de unión ligando-receptor. Nuestros resultados demuestran que en los estudios de unión competitiva, donde la ang-II radiomarcada y RPYL competían por la unión con los receptores AT₁, RPYL desplazó la unión de [125I]-(Sar1,Ile8)-angiotensina II con los receptores AT₁ de forma concentración dependiente. Además de utilizar receptores de origen

humano, el efecto de inhibición de RPYL sobre la unión específica de [125I]-(Sar1,Ile8)-angiotensina II se confirmó empleando membranas de arteria carótida de conejo, el tejido nativo utilizado en todos los ensayos de vasoconstricción realizados en nuestros trabajos. Los resultados obtenidos señalaron al bloqueo directo de los receptores AT₁ como el mecanismo de inhibición ejercido por RPYL en los experimentos *ex vivo* de vasoconstricción inducida por ang-II, y por tanto, es razonable pensar que éste podría ser también un mecanismo de acción responsable al menos en parte del efecto antihipertensivo observado en ratas SHR.

Hasta la fecha, los efectos de inhibición de péptidos antihipertensivos derivados de alimentos sobre la vasoconstricción inducida por ang-II no habían sido descritos, lo que pone de manifiesto la relevancia de nuestros resultados. Sin embargo, otros autores sí han confirmado la falta de efecto del tripéptido IPP (Sipola y cols., 2001) derivado de la leche y del dipéptido VY (Vercruyssen y cols., 2008) derivado del músculo de sardina sobre la vasoconstricción inducida por ang-II, de forma similar a lo que nosotros observamos con el heptapéptido inhibidor de ECA PACEI50 (RKWHFLW) (Ruiz-Giménez y cols., 2011). Por trabajos previos de nuestro grupo, sabíamos que el pHLF crudo, sin ultrafiltrar, no inhibió la vasoconstricción inducida por ang-II (Ruiz-Gimenez y cols., 2007). Por tanto, los resultados de esta tesis indican que la capacidad de unión a receptores AT₁ se deben a la fracción peptídica de bajo peso molecular, al igual que en el caso de la vasoconstricción ECA-dependiente. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder asignar este efecto a las secuencias LIWKL y sobre todo a RPYL.

Una conclusión relevante de esta tesis sería por tanto el efecto selectivo de los péptidos derivados de LF sobre los receptores AT₁, dado que ni el

hidrolizado ni RPYL modificaron la vasoconstricción inducida por ET-1, pero si la inducida por ang-II. En principio estos resultados parecen indicar que el bloqueo de los receptores ET_A no contribuiría al efecto antihipertensivo de estos péptidos.

4. Biodisponibilidad

Finalmente, algunas consideraciones respecto a la biodisponibilidad de los péptidos e hidrolizados tanto en los experimentos *ex vivo* como en las situaciones *in vivo*. En términos generales, las peptidasas se encuentran presentes en las paredes de los vasos sanguíneos, tanto en la capa endotelial como en el músculo liso (Palmieri y cols., 1989). Aparte de las actividades ECA (Centeno y cols., 2006) y ECE descritas en nuestros experimentos *ex vivo* con las carótida de conejo aisladas, otras peptidasas vasculares pueden hidrolizar péptidos vasoactivos endógenos, interfiriendo en su efecto biológico (Ryan, 1989, Rouissi y cols., 1990), por lo que no puede ser descartado un posible efecto hidrolítico sobre los péptidos derivados de LF durante su incubación con las arterias.

Por otra parte, la biodisponibilidad de los péptidos tras su administración oral es necesaria para garantizar su bioactividad (Vermeirssen y cols., 2004a). Los pocos estudios de biodisponibilidad *in vivo* muestran la detección de VPP e IPP en plasma en concentraciones de pico a nanomolar (Foltz y cols., 2007) con un tiempo de vida media de 2 minutos (van der Pijl y cols., 2008). Como ya se ha comentado, esta biodisponibilidad tan pequeña encontrada para la mayoría de péptidos naturales sirvió de base para sugerir la posible participación de otros mecanismos distintos de la inhibición de ECA en la

disminución de la presión sanguínea, tal y como hemos demostrado en esta tesis para los péptidos derivados de LF. En nuestro trabajo no hemos abordado en profundidad estudios de biodisponibilidad. Sin embargo, datos previos sugieren que, en general, los péptidos derivados de LF son susceptibles, en mayor o menor medida, a la degradación gastrointestinal, aunque hay que destacar que RPYL fue particularmente resistente en simulaciones de digestión (Ruiz-Giménez y cols., 2010, Ruiz-Giménez y cols., 2012). También hemos descrito que el péptido LfcinB₂₀₋₂₅ no era transportado a través de una monocapa de Caco-2, aunque sí se observó que se transportaban sus dos fragmentos mayoritarios (RWQ y WQ) (Fernández-Musoles y cols., 2013). Sin lugar a dudas, determinar cuál es realmente el péptido o fragmento responsable de los efectos antihipertensivos observados y la concentración necesaria para alcanzarlo sigue siendo una cuestión de gran relevancia en la caracterización de péptidos bioactivos.

5. Consideraciones finales

En esta tesis se ha demostrado el potencial de los péptidos derivados de LF en el control de la hipertensión. Estos péptidos pueden liberarse de la proteína parental mediante hidrólisis enzimática, de modo que utilizando distintas proteasas se pueden obtener diferentes perfiles peptídicos que determinarán las dianas moleculares de los hidrolizados y secuencias peptídicas.

Las diferentes aproximaciones experimentales que se han abordado en esta tesis, que han incluido ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, han permitido poner de manifiesto principalmente la relevancia del sistema RAS pero también del

sistema endotelina como dianas de los péptidos antihipertensivos derivados de LF. Por lo que se refiere al sistema RAS, la inhibición de la ECA, pero también el bloqueo de los receptores AT₁, son los principales mecanismos de acción que explican el efecto antihipertensivo. Sin embargo, en el sistema endotelina, sería la inhibición de su principal enzima, ECE, y no el bloqueo de los receptores el principal mecanismo implicado. Un resultado interesante es la capacidad de algunos péptidos e hidrolizados para actuar como inhibidores duales de vasopeptidasas, ya que son capaces de inhibir ACE y ECE. Sin lugar a dudas, resulta imprescindible profundizar en el estudio de la inhibición *in vivo* de ECE, para poder determinar la relevancia real del sistema endotelina.

Considerando todo lo expuesto en esta memoria, es evidente que el hidrolizado de LF obtenido con pepsina podría funcionar como un agente antihipertensivo oral. Dentro del campo de la alimentación funcional, remarcar que no se pretende que este tipo de hidrolizados puedan sustituir a los fármacos, sino que su empleo sería de tipo preventivo o en estados iniciales de la hipertensión, ejerciendo su efecto en un marco temporal de medio a largo plazo y administrados a dosis bajas. Otra ventaja de los hidrolizados de LF sería que, tanto desde el punto de vista de la industria como del consumidor, su incorporación en alimentos sería una alternativa más natural que el empleo de péptidos individuales. Además, en estos momentos, la utilización de péptidos individuales, debido fundamentalmente a su coste, sería más factible en la industria farmacéutica que en la alimentaria. En este sentido, la producción biotecnológica de péptidos de pequeño tamaño representa en estos momentos un cuello de botella.

Por lo que se refiere al mecanismo de acción del pHLF, destacar que recientemente se ha demostrado en un modelo *in vitro* empleando células

endoteliales, que el hidrolizado es capaz de incrementar la producción de óxido nítrico y modificar la expresión de genes relacionados con la hipertensión, diferentes a los del sistema RAS y endotelina (García-Tejedor et al 2015). En su conjunto, se han puesto de manifiesto diferentes mecanismos a través de los cuales los péptidos derivados de LF podrían ejercer su efecto antihipertensivo (Manzanares et al., 2015), lo que aumenta el gran valor de la LF como fuente de péptidos multifuncionales con efecto antihipertensivo.

Finalmente, destacar dos aspectos importantes que no se han abordado en esta tesis. En primer lugar hay que recordar la importancia de los estudios de biodisponibilidad, la identificación del fragmento activo responsable del efecto antihipertensivo y capaz de alcanzar la diana molecular en el organismo, así como evaluar las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción. En segundo lugar, desde el punto de vista de la aplicación de los péptidos derivados de LF como agentes antihipertensivos orales, los ensayos clínicos serán sin lugar a dudas imprescindibles.

CONCLUSIONES

1. La proteólisis enzimática de lactoferrina (LF) es un método eficaz para generar hidrolizados con efectos antihipertensivos tras administración oral. No obstante, la elección del enzima es determinante para obtener un hidrolizado con un perfil peptídico capaz de mostrar efecto antihipertensivo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Tanto la enzima gástrica pepsina como la microbiana proteinasa K generaron hidrolizados antihipertensivos. Sin embargo, la proteólisis de LF con la enzima pancreática tripsina generó un hidrolizado carente de efecto antihipertensivo.

2. La ausencia de efecto hipotensor, evidenciada al administrar los hidrolizados de LF obtenidos con pepsina o con proteinasa K a ratas Wistar normotensas, refuerza el valor de estos hidrolizados como potenciales tratamientos antihipertensivos.

3. Se ha desarrollado un método *in vitro* para comprobar el efecto inhibidor de los péptidos derivados de LF sobre la enzima convertidora de endotelina (ECE). Este método se ha complementado con otro *ex vivo*, utilizando arterias aisladas de conejo, para comprobar en términos de vasoactividad los efectos de los péptidos tanto sobre la actividad ECE como sobre los receptores para la endotelina-1, ET_A. Ambos métodos mostraron una alta correlación para comprobar los efectos inhibidores sobre la ECE, como se evidenció al validarlos utilizando diferentes péptidos derivados de lactoferrina B (LfcinB).

4. Los hidrolizados de LF obtenidos por la acción de diferentes enzimas proteolíticas, y los péptidos individuales identificados en esos hidrolizados, no tienen un mecanismo de acción estereotipado responsable de sus efectos antihipertensivos. Además, el mecanismo de acción no se limita a la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La combinación de métodos

in vitro, con ACE y ECE, y *ex vivo*, con arterias aisladas, facilita la identificación del mecanismo implicado y la predicción del potencial antihipertensivo.

5. El hidrolizado de LF obtenido con pepsina podría ejercer su efecto antihipertensivo como inhibidor dual de vasopeptidasas, como se ha evidenciado por su capacidad de inhibir *in vitro* las actividades ECA y ECE, y se ha confirmado por su efecto inhibidor *ex vivo* sobre la vasoconstricción ECA-dependiente inducida por angiotensina I, así como sobre la vasoconstricción ECE-dependiente inducida por proendotelina (big ET-1).

6. La caracterización del mecanismo antihipertensivo del hidrolizado de LF obtenido con pepsina se ha completado comprobando su efecto inhibidor de la vasoconstricción ECA-independiente inducida por angiotensina II, bloqueando los receptores AT₁. Se ha evidenciado el efecto inhibidor *ex vivo*, tanto del hidrolizado como de dos de sus péptidos mayoritarios (LIWKL y RPYL), sobre la vasoconstricción, así como la unión de RPYL a los receptores AT₁.

7. El hidrolizado de LF obtenido con proteinasa K podría ejercer su efecto antihipertensivo como inhibidor de la vasopeptidasa ECE, como se ha evidenciado por su capacidad de inhibir *in vitro* la actividad ECE, y se ha confirmado por su efecto inhibidor *ex vivo* sobre la vasoconstricción ECE-dependiente inducida por big ET-1. Además, este hidrolizado contiene péptidos mayoritarios (GILRPY y REPYFGY) con efecto inhibidor de ECE.

8. La inhibición de los receptores para la endotelina-1, ET_A, no parece un mecanismo implicado en el efecto antihipertensivo de los péptidos derivados de LF, al menos para los incluidos en este estudio. La vasoconstricción ECE-independiente inducida por ET-1 no fue modificada por los péptidos

derivados de LfcinB utilizados para validar el método, ni por el hidrolizado de LF obtenido con pepsina o su péptido RPYL.

9. El hidrolizado de LF obtenido con pepsina reduce la progresión de la hipertensión en ratas SHR mediante la inhibición de la ECA, lo cual se evidenció por la reducción de los niveles circulantes de actividad ECA, angiotensina II y aldosterona, así como el incremento compensatorio de actividad renina, tras la administración oral mantenida del hidrolizado en la dieta. Este efecto antihipertensivo crónico y la comprobación *in vivo* del mecanismo de acción refuerzan el potencial del hidrolizado como tratamiento nutracéutico para la hipertensión.

BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y. y Itoh T. (1998). Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, **81**(12):3131-3138.
- Acharya K. R., Sturrock E. D., Riordan J. F. y Ehlers M. R. W. (2003). Ace revisited: A new target for structure-based drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(11):891-902.
- Andersen J. H., Jenssen H. y Gutteberg T. J. (2003). Lactoferrin and lactoferricin inhibit Herpes simplex 1 and 2 infection and exhibit synergy when combined with acyclovir. *Antiviral Research*, **58**(3):209-215.
- Andersen J. H., Jenssen H., Sandvik K. y Gutteberg T. J. (2004). Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *Journal of Medical Virology*, **74**(2):262-271.
- Andersen J. H., Osbakk S. A., Vorland L. H., Traavik T. y Gutteberg T. J. (2001). Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Research*, **51**(2):141-149.
- Attinà T., Camidge R., Newby D. E. y Webb D. J. (2005). Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart*, **91**(6):825-831.
- Balti R., Bougateg A., Sila A., Guillochon D., Dhulster P. y Nedjar-Arroume N. (2015). Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, **170**:519-525.
- Battistini B., Ayach B., Molez S., Blouin A. y Jeng A. Y. (2002). Effects of benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, combined with CGS 35066, a selective endothelin-converting enzyme inhibitor, on arterial blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Clinical Science*, **103**:363S-366S.
- Bejjani S. y Wu J. P. (2013). Transport of IRW, an Ovotransferrin-Derived Antihypertensive Peptide, in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(7):1487-1492.

- Bellamy W., Takase M., Wakabayashi H., Kawase K. y Tomita M. (1992a). Antibacterial Spectrum of Lactoferricin-B, A Potent Bactericidal Peptide Derived from the N-Terminal Region of Bovine Lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology*, **73**(6):472-479.
- Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. y Tomita M. (1992b). Identification of the Bactericidal Domain of Lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1121**(1-2):130-136.
- Bellamy W., Yamauchi K., Wakabayashi H., Takase M., Takakura N., Shimamura S. y Tomita M. (1994). Antifungal Properties of Lactoferricin-B, A Peptide Derived from the N-Terminal Region of Bovine Lactoferrin. *Letters in Applied Microbiology*, **18**(4):230-233.
- Branen J. y Davidson P. M. (2000). Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Letters in Applied Microbiology*, **30**(3):233-237.
- Brede M. y Hein L. (2001). Transgenic mouse models of angiotensin receptor subtype function in the cardiovascular system. *Regulatory Peptides*, **96**:125-132.
- Brunner H. R., Nussberger J. y Waeber B. (1993). Angiotensin-II blockade compared with other pharmacological methods of inhibiting the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, **11**:S53-S58.
- Carey R. M. y Siragy H. M. (2003a). The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **14**(6):274-281.
- Carey R. M. y Siragy H. M. (2003b). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: Potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine Reviews*, **24**(3):261-271.
- Centeno J. M., Burguete M. C., Castello-Ruiz M., Enrique M., Valles S., Salom J. B., Torregrosa G., Marcos J. F., Alborch E. y Manzanares P. (2006). Lactoferricin-related peptides with inhibitory effects on ACE-dependent vasoconstriction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(15):5323-5329.

- Clozel M. y Flores S. (2006). Endothelin receptors as drug targets in chronic cardiovascular diseases: the rationale for dual antagonism. *Drug Development Research*, **67**(11):825-834.
- Coates D. (2003). The angiotensin converting enzyme (ACE). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **35**(6):769-773.
- Contreras M. M., Carrón R., Montero M. J., Ramos M. y Recio I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, **19**(10):566-573.
- Crackower M. A., Sarao R., Oudit G. Y., Yagil C., Koziaradzki I., Scanga S. E., Oliveira-dos-Santos A. J., da Costa J., Zhang L., Pei Y., Scholey J., Ferrario C. M., Manoukian A. S., Chappell M. C., Backx P. H., Yagil Y. y Penninger J. M. (2002). Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**(6891):822-828.
- Cushman D. W. y Cheung H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, **20**(7):1637-1648.
- Cushman D. W., Cheung H. S., Sabo E. F. y Ondetti M. A. 1981. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. Evolution of a New Class of Antihypertensive Drugs. Pages 3-25 in Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. Mechanisms of Action and Clinical Implications P. H. Zola, ed. Urban & Schwarzenberg, Baltimor-Munich.
- Chen G. W., Tsai J. S. y Sun Pan B. (2007). Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, **17**(6):641-647.
- Chen H. L., Yen C. C., Lu C. Y., Yu C. H. y Chen C. M. (2006). Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**(9):3277-3282.

- Cheung H. S., Wang F. L., Ondetti M. A., Sabo E. F. y Cushman D. W. (1980). Binding of Peptide-Substrates and Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme - Importance of the CooH-Terminal Dipeptide Sequence. *Journal of Biological Chemistry*, **255**(2):401-407.
- Chrysant S. G. y Chrysant G. S. (2013). An Update on the Cardiovascular Pleiotropic Effects of Milk and Milk Products. *Journal of Clinical Hypertension*, **15**(7):503-510.
- Das M. y Soffer R. L. (1975). Pulmonary angiotensin-converting enzyme. Structural and catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry*, **250**(17):6762-6768.
- de la Rosa A. P. B., Montoya A. B., Martinez-Cuevas P., Hernandez-Ledesma B., Leon-Galvan M. F., De Leon-Rodriguez A. y Gonzalez C. (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **23**(2):106-111.
- De Lombaert S., Blanchard L., Stamford L. B., Tan J., Wallace E. M., Satoh Y., Fitt J., Hoyer D., Simonsbergen D., Moliterni J., Marcopoulos N., Savage P., Chou M., Trapani A. J. y Jeng A. Y. (2000). Potent and selective non-peptidic inhibitors of endothelin-converting enzyme-1 with sustained duration of action. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**(3):488-504.
- Doyen A., Udenigwe C. C., Mitchell P. L., Marette A., Aluko R. E. y Bazinet L. (2014). Anti-diabetic and antihypertensive activities of two flaxseed protein hydrolysate fractions revealed following their simultaneous separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Food Chemistry*, **145**:66-76.
- Dugan C. E. y Fernandez M. L. (2014). Effects of dairy on metabolic syndrome parameters: a review. *The Yale journal of biology and medicine*, **87**(2).
- EFSA. (2012). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to isoleucine-proline-proline (IPP) and valine-proline-proline (VPP) and maintenance of normal blood pressure (ID 661, 1831, 1832, 2891, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, **10**(6):2715-2737.

- Eliassen L. T., Berge G., Sveinbjornsson B., Svendsen J. S., Vorland L. H. y Rekdal O. (2002). Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Research*, **22**(5):2703-2710.
- Eliassen L. T., Haug B. E., Berge G. y Rekdal O. (2003). Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *Journal of Peptide Science*, **9**(8):510-517.
- Engberink M. F., Schouten E. G., Kok F. J., van Mierlo L. A. J., Brouwer I. A. y Geleijnse J. M. (2008). Lactotripeptides Show No Effect on Human Blood Pressure: Results From a Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Hypertension*, **51**(2):399-405.
- Enrique M., Manzanares P., Yuste M., Martinez M., Valles S. y Marcos J. F. (2009). Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, **26**(3):340-346.
- Enrique M., Marcos J. F., Yuste M., Martinez M., Valles S. y Manzanares P. (2007). Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **118**(3):318-325.
- Enrique M., Marcos J. F., Yuste M., Martinez M., Valles S. y Manzanares P. (2008). Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology*, **127**(3):229-234.
- Faber J. E., Yang N. Y. y Xin X. H. (2001). Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **298**(2):441-452.
- Farnaud S. y Evans R. W. (2003). Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, **40**(7):395-405.
- Fernández-Musoles R., Salom J. B., Castelló-Ruiz M., Contreras M. d. M., Recio I. y Manzanares P. (2013). Bioavailability of antihypertensive lactoferricin B-derived peptides: Transepithelial transport and resistance to intestinal and plasma peptidases. *International Dairy Journal*, **32**:169-174.

- Fields G. B. y Noble R. L. (1990). Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **35**(3):161-214.
- Fitzgerald C., Mora-Soler L., Gallagher E., O'Connor P., Prieto J., Soler-Vila A. y Hayes M. (2012). Isolation and Characterization of Bioactive Pro-Peptides with in Vitro Renin Inhibitory Activities from the Macroalga *Palmaria palmata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**(30):7421-7427.
- FitzGerald R. J., Murray B. A. y Walsh D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, **134**(4):980S-988S.
- Fitzsimons J. T. (1998). Angiotensin, Thirst, and Sodium Appetite. *Physiological Reviews*, **78**:583-686.
- Foltz M., Meynen E. E., Bianco V., van Platerink C., Koning T. M. M. G. y Kloek J. (2007). Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from a Lactotripeptide-Enriched Milk Beverage Are Absorbed Intact into the Circulation. *Journal of Nutrition*, **137**(4):953-958.
- Friedrich S. y Schmieder E. (2013). Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, **14**(3):193-196.
- Fukuroda T., Noguchi K., Tsuchida S., Nishikibe M., Ikemoto F., Okada K. y Yano M. (1990). Inhibition of biological actions of big endothelin-1 by phosphoramidon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **172**(2):390-395.
- Girgih A., Alashi A., He R., Malomo S. y Aluko R. (2014). Preventive and treatment effects of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) meal protein hydrolysate against high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Nutrition*, **53**(5):1237-1246.
- Girgih A. T., Udenigwe C. C., Li H., Adebisi A. P. y Aluko R. E. (2011). Kinetics of Enzyme Inhibition and Antihypertensive Effects of Hemp Seed (*Cannabis sativa* L.) Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **88**(11):1767-1774.

- Gokhale N. y Cowan J. (2006). Metallopeptide-promoted inactivation of angiotensin-converting enzyme and endothelin-converting enzyme 1: toward dual-action therapeutics. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11**(7):937-947.
- Gomez-Ruiz J. A., Ramos M. y Recio I. (2002). Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, **12**(8):697-706.
- Gray G. A. y Webb D. J. (1996). The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, **72**(2):109-148.
- Haynes W. G. y Webb D. J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *The Lancet*, **344**(8926):852-854.
- Haynes W. G. y Webb D. J. (1998). Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens*, **16**(8):1081-1098.
- He R., Alashi A., Malomo S. A., Girgih A. T., Chao D. F., Ju X. R. y Aluko R. E. (2013a). Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*, **141**(1):153-159.
- He R., Malomo S. A., Alashi A., Girgih A. T., Xingrong J. y Aluko R. E. (2013b). Purification and hypotensive activity of rapeseed protein-derived renin and angiotensin converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Functional Foods*, **5**(2):781-789.
- He R., Malomo S. A., Girgih A. T., Ju X. R. y Auko R. E. (2013c). Glycyl-Histidinyl-Serine (GHS), a Novel Rapeseed Protein-Derived Peptide Has Blood Pressure-Lowering Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**(35):8396-8402.
- Hernández-Ledesma B., del Mar Contreras M. y Recio I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, **165**(1):23-35.

- Hernández-Ledesma B., García-Nebot M. J., Fernández-Tomé S., Amigo L. y Recio I. (2014). Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, **38**(2):82-100.
- Hernandez-Ledesma B., Miguel M., Amigo L., Aleixandre M. A. y Recio I. (2007). Effect of simulated gastrointestinal digestion on the anti hypertensive properties of synthetic beta-lactoglobulin peptide sequences. *Journal of Dairy Research*, **74**(3):336-339.
- Ihara M., Noguchi K., Saeki T., Fukuroda T., Tsuchida S., Kimura S., Fukami T., Ishikawa K., Nishikibe M. y Yano M. (1992). Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sciences*, **50**(4):247-255.
- Ikegawa R., Matsumura Y., Tsukahara Y., Takaoka M. y Morimoto S. (1990). Phosphoramidon, a metalloproteinase inhibitor, suppresses the secretion of endothelin-1 from cultured endothelial cells by inhibiting a big endothelin-1 converting enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **171**(2):669-675.
- INE. Instituto Nacional de Estadística (2014). Defunciones según la Causa de Muerte 2012, 1-14.
- Ishikawa K., Ihara M., Noguchi K., Mase T., Mino N., Saeki T., Fukuroda T., Fukami T., Ozaki S., Nagase T., Nishikibe M. y Yano M. (1994). Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(11):4892-4896.
- Iwaniak A., Minkiewicz P. y Darewicz M. (2014). Food-Originating ACE Inhibitors, Including Antihypertensive Peptides, as Preventive Food Components in Blood Pressure Reduction. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **13**(2):114-134.
- Jäkälä P. y Vapaatalo H. (2010). Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals*, **3**:251-272.

- Jiang Z. M., Tian B., Brodkorb A. y Huo G. C. (2010). Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein. *Food Chemistry*, **123**(3):779-786.
- Johnson G. D. (2000). Development of an Internally Quenched Fluorescent Substrate Selective for Endothelin-Converting Enzyme-1. *Analytical Biochemistry*, **286**(1):112-118.
- Juillard V., Guillot A., Le Bars D. y Gripon J. C. (1998). Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(4):1230-1236.
- Kang J. H., Lee M. K., Kim K. L. y Hahm K. S. (1996). Structure-biological activity relationships of 11-residue highly basic peptide segment of bovine lactoferrin. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **48**(4):357-363.
- Karaki H., Doi K., Sugano S., Uchiwa H., Sugai R., Urakami U. y Takemoto S. (1990). Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **96C**:367-371.
- Kedzierski R. M. y Yanagisawa M. (2001). Endothelin system: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**:851-876.
- Kim T. W., Yoo B. W., Lee J. K., Kim J. H., Lee K. T., Chi Y. H. y Lee J. Y. (2012). Synthesis and antihypertensive activity of pyrimidin-4(3H)-one derivatives as losartan analogue for new angiotensin II receptor type 1 (AT(1)) antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**(4):1649-1654.
- Kohan D. E., Rossi N. F., Inscho E. W. y Pollock D. M. (2011). Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin. Vol. 91. No. 1.
- Kokubo M., Uemura A., Matsubara T. y Murohara T. (2005). Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. *Hypertension Research*, **28**(7):601-609.

- Lanzillo J. J. y Fanburg B. L. (1976). Angiotensin I-converting enzyme from Guinea pig lung and serum. A comparison of some kinetic and inhibition properties. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **445**(1):161-168.
- Lee N. Y., Cheng J. T., Enomoto T. y Nakamura I. (2006). The antihypertensive activity of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptide containing in bovine lactoferrin. *Chinese Journal of Physiology*, **49**(2):67-73.
- Levy B. I. (2004). Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-angiotensin system. *Circulation*, **109**:8-13.
- Li G.-H., Le G.-W., Shi Y.-H. y Shrestha S. (2004). Angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*, **24**:469-486.
- Li G. H., Liu H., Shi Y. H. y Le G. W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **37**(2):219-224.
- Li H. y Aluko R. E. (2010). Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(21):11471-11476.
- Li H., Prairie N., Udenigwe C. C., Adebisi A. P., Tappia P. S., Aukema H. M., Jones P. J. H. y Aluko R. E. (2011). Blood Pressure Lowering Effect of a Pea Protein Hydrolysate in Hypertensive Rats and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**:9854-9860.
- Lindenau S., von Langsdorff C., Saxena A., Paul M. y Orzechowski H. D. (2006). Genomic organisation of the mouse gene encoding endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and mRNA expression of ECE-1 isoforms in murine tissues. *Gene*, **373**:109-115.
- Madureira A. R., Tavares T., Gomes A. M. P., Pintado M. E. y Malcata F. X. (2010). Invited review: Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, **93**(2):437-455.

- Maeno M., Yamamoto N. y Takano T. (1996). Identification of an Antihypertensive Peptide from Casein Hydrolysate Produced by a Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, **79**:1316-1321.
- Maes W., Van Camp J., Vermeirssen V., Hemeryck M., Ketelslegers J. M., Schrezenmeir J., Van Oostveldt P. y Huyghebaert A. (2004). Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, **118**(1-2):105-109.
- Majumder K. y Wu J. P. (2015). Molecular Targets of Antihypertensive Peptides: Understanding the Mechanisms of Action Based on the Pathophysiology of Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(1):256-283.
- Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K., Redon J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., Backer G. D., Dominiczak A., Galderisi M., Grobbee D. E., Jaarsma T., Kirchhof P., Laurent S., Manolis A. J., Nilsson P. M., Ruilope L. M., Schmieder R. E., Sirnes P. A., Sleight P., Viigimaa M., Waeber B. y Zannad F. (2013). 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension*, **31**:1281-1357.
- Marques C., Amorim M. M., Pereira J. O., Pintado M. E., Moura D., Calhau C. y Pinheiro H. (2012). Bioactive Peptides - Are There More Antihypertensive Mechanisms Beyond ACE Inhibition? *Current Pharmaceutical Design*, **18**(30):4706-4713.
- Martinez-Maqueda D., Miralles B., Recio I. y Hernandez-Ledesma B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food & Function*, **3**(4):350-361.
- McGregor R. A. y Poppitt S. D. (2013). Milk protein for improved metabolic health: a review of the evidence. *Nutrition & Metabolism*, **10**.
- Metz-Boutigue M. H., Jolles J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J. y Jolles P. (1984). Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, **145**(3):659-676.

- Miguel M., Alvarez Y., Lopez-Fandino R., Alonso M. J. y Salaices M. (2007a). Vasodilator effects of peptides derived from egg white proteins. *Regulatory Peptides*, **140**(3):131-135.
- Miguel M., Gómez-Ruiz J. A., Recio I. y Aleixandre A. (2010). Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, **54**(10):1422-1427.
- Miguel M., Manso M. A., López-Fandiño R., Alonso M. J. y Salaices M. (2007b). Vascular effects and antihypertensive properties of κ -casein macropeptide. *International Dairy Journal*, **17**(12):1473-1477.
- Miguel M., Recio I., Ramos M., Delgado M. A. y Aleixandre M. A. (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal of Dairy Science*, **89**(9):3352-3359.
- Mizuno S., Nishimura S., Matsuura K., Gotou T. y Yamamoto N. (2004). Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *Journal of Dairy Science*, **87**(10):3183-3188.
- Mullally M. M., Meisel H. y FitzGerald R. J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, **7**(5):299-303.
- Muñoz A. y Macos J. F. (2006). Activity and mode of action against fungal phytopathogens of bovine lactoferricin-derived peptides. *Journal of Applied Microbiology*, **101**(6):1199-1207.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. y Takano T. (1995a). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitors from Sour Milk. *Journal of Dairy Science*, **78**(4):777-783.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. y Takano T. (1995b). Antihypertensive Effect of Sour Milk and Peptides Isolated from It That Are Inhibitors to Angiotensin I-Converting Enzyme. *Journal of Dairy Science*, **78**(6):1253-1257.

- Nakano D., Ogura K., Miyakoshi M., Ishii F., Kawanishi H., Kurumazuka D., Kwak C. J., Ikemura K., Takaoka M., Moriguchi S., Iino T., Kusumoto A., Asami S., Shibata H., Kiso Y. y Matsumura Y. (2006). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70**(5):1118-1126.
- Ngo D. H., Kang K. H., Ryu B., Vo T. S., Jung W. K., Byun H. G. y Kim S. K. (2015). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, **174**:37-43.
- Nurminen M.-L., Sipola M., Kaarto H., Pihlanto-Leppälä A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H. y Vapaatalo H. (2000). α -Lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, **66**(16):1535-1543.
- Okitsu M., Morita A., Kakitani M., Okada M. y Yokogoshi H. (1995). Inhibition of the Endothelin-Converting Enzyme by Pepsin Digests of Food Proteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **59**(2):325-326.
- Ondetti M. A. y Cushman D. W. (1977). Design of Specific Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme - New Class of Orally Active Antihypertensive Agents. *Science*, **196**(4288):441-444.
- Ondetti M. A. y Cushman D. W. (1982). Enzymes of the Renin-Angiotensin System and Their Inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, **51**:283-308.
- PAHO. Pan American Health Organization (2013). World Health Day 2013. <http://www.paho.org/hipertension/?lang=en>
- Palmieri F. E., Bausback H. H. y Ward P. E. (1989). Metabolism of vasoactive peptides by vascular endothelium and smooth-muscle aminopeptidase M. *Biochemical Pharmacology*, **38**(1):173-180.
- Paul M., Poyan Mehr A. y Kreutz R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, **86**:747-803.

- Perez M. I. y Musini V. M. (2008). Pharmacological interventions for hypertensive emergencies: a Cochrane systematic review. *Journal of Human Hypertension*, **22**(9):596-607.
- Pierce A., Colavizza D., Benaissa M., Maes P., Tartar A., Montreuil J. y Spik G. (1991). Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *European Journal of Biochemistry*, **196**(1):177-184.
- Prasad V. S., Palaniswamy C. y Frishman W. H. (2009). Endothelin as a Clinical Target in the Treatment of Systemic Hypertension. *Cardiology in Review*, **17**(4).
- Prentice A. M. (2014). Dairy products in global public health. *American Journal of Clinical Nutrition*, **99**(5):1212S-1216S.
- Pripp A. H. (2008). Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food and Nutrition Research*, **52**.
- Puchalska P., Alegre M. L. M. y Lopez M. C. G. (2015). Isolation and Characterization of Peptides with Antihypertensive Activity in Foodstuffs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**(4):521-551.
- Quiros A., Ramos M., Muguera B., Delgado M. A., Miguel M., Alexandre A. y Recio I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, **17**(1):33-41.
- Rouissi N., Nantel F., Drapeau G., Rhaleb N. E., Dion S. y Regoli D. (1990). Inhibitors of peptidases: how they influence the biological-activities of substance-p, neurokinins, kinins and angiotensins in isolated vessels. *Pharmacology*, **40**(4):185-195.
- Rousseau-Ralliard D., Goirand F., Tardivel S., Lucas A., Algaron F., Moll, D., Robert V., AuchŠre D., Boudier F., Gaillard L., Monnet V., Tauzin J. y Grynberg A. (2010). Inhibitory effect of a_{s1} - and a_{s2} -casein hydrolysates on angiotensin I-converting enzyme in human endothelial cells in vitro, rat aortic tissue ex vivo, and renovascular hypertensive rats in vivo. *Journal of Dairy Science*, **93**(7):2906-2921.

- Ruiz-Gimenez P., Burguete M. C., Castello-Ruiz M., Marcos J. F., Salom J. B., Valles S., Torregrosa G., Alborch E. y Manzanares P. (2007). Bovine lactoferrin pepsin hydrolysate exerts inhibitory effect on angiotensin I-converting enzyme-dependent vasoconstriction. *International Dairy Journal*, **17**(10):1212-1215.
- Ruiz-Giménez P., Ibañez A., Salom J. B., Marcos J. F., Lopez-Diez J. J., Valles S., Torregrosa G., Alborch E. y Manzanares P. (2010). Antihypertensive Properties of Lactoferricin B-Derived Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**:6721-6727.
- Ruiz-Giménez P., Marcos J. F., Torregrosa G., Lahoz A., Fernández-Musoles R., Valles S., Alborch E., Manzanares P. y Salom J. B. (2011). Novel antihypertensive hexa- and heptapeptides with ACE-inhibiting properties: From the in vitro ACE assay to the spontaneously hypertensive rat. *Peptides*, **32**:1431-1438.
- Ruiz-Giménez P., Salom J. B., Marcos J. F., Vallés S., Martínez-Maqueda D., Recio I., Torregrosa G., Alborch E. y Manzanares P. (2012). Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: Identification of novel active peptides. *Food Chemistry*, **131**:266-273.
- Ryan J. W. (1989). Peptidase enzymes of the pulmonary vascular surface. *American Journal of Physiology*, **257**(2):L53-L60.
- Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y. y Itoh T. (2000). Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, **83**(7):1434-1440.
- Sanchez D., Kassan M. M., Contreras M., Carrón R., Recio I., Montero M. J. y Sevilla M. A. (2011). Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacological Research*, **63**(5):398-404.
- Schiffrin E. L. (2005). Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology*, **43**:19- 29.
- Schulz H., Dale G. E., Karimi-Nejad Y. y Oefner C. (2009). Structure of human Endothelin-converting Enzyme I Complexed with Phosphoramidon. *Journal of Molecular Biology*, **385**(1):178-187.

- Schweizer A., Valdenaire O., Nelbock P., Deuschle U., Dumas Milne Edwards J. B., Stumpf J. G. y Loffler B. M. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal*, **328**(3):871-877.
- Sentandreu M. A. y Toldra F. (2006). A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, **97**(3):546-554.
- Shiozaki K., Shiozaki M., Masuda J., Yamauchi A., Ohwada S., Nakano T., Yamaguchi T., Saito T., Muramoto K. y Sato M. (2010). Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Fisheries Science*, **76**(5):865-872.
- Sica D. A. (2006). Angiotensin Receptor Blockers: New Considerations in Their Mechanism of Action. *Current Concepts of Pharmacotherapy in Hypertension*, **8**:381-385.
- Sipola M., Finckenberg P., Korpela R., Vapaatalo H. y Nurminen M. L. (2002a). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, **69**(1):103-111.
- Sipola M., Finckenberg P., Santisteban J., Korpela R., Vapaatalo H. y Nurminen M. L. (2001). Long-term intake of milk peptides attenuates development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **52**(4):745-754.
- Sipola M., Finckenberg P., Vapaatalo H., Pihlanto-Leppala A., Korhonen H., Korpela R. y Nurminen M. L. (2002b). alpha-lactorphin and b-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, **71**(11):1245-1253.
- Soffer R. L. (1976). Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annual Review of Biochemistry*, **45**:73-94.
- Steckelings U. M., Kaschina E. y Unger T. (2005). The AT2 receptors: a matter of love and hate. *Peptides*, **26**:1401-1409.

- Stoll D., Steckelings U. M., Paul M., Bottari S. P., Metzger R. y Unger T. (1995). The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of clinical investigation*, **95**:651-657.
- Taylor A. A., Siragy H. y Nesbitt S. (2011). Angiotensin Receptor Blockers: Pharmacology, Efficacy, and Safety. *Journal of Clinical Hypertension*, **13**(9):677-686.
- Tirapelli C. R., Fecteau M. H., Honore J. C., Legros E., Gobeil F. y Orleans-Juste P. (2006). Enzymatic pathways involved in the generation of endothelin-1(1-31) from exogenous big endothelin-1 in the rabbit aorta. *Br.J Pharmacol.*, **148**(4):527-535.
- Tomita M., Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H. y Kawase K. (1991). Potent Antibacterial Peptides Generated by Pepsin Digestion of Bovine Lactoferrin. *Journal of Dairy Science*, **74**(12):4137-4142.
- Tonouchi H., Suzuki M., Uchida M. y Oda M. (2008). Antihypertensive effect of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from enzyme modified cheese. *Journal of Dairy Research*, **75**(3):284-290.
- Trapani A. J., Beil M. E., Bruseo C. W., De Lombaert S. y Jeng A. Y. (2000). Pharmacological properties of CGS 35066, a potent and selective endothelin-converting enzyme inhibitor, in conscious rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **36**:S40-S43.
- Tsai J. S., Chen T. J., Pan B. S., Gong S. D. y Chung M. Y. (2008). Antihypertensive effect of bioactive peptides produced by protease-facilitated lactic acid fermentation of milk. *Food Chemistry*, **106**(2):552-558.
- Turpeinen A. N., Järvenpää, S., Kautiainen, H., Korpela, R., Vapaatalo, H. (2013). Antihypertensive effects of bioactive tripeptides—a random effects meta-analysis. *Annals of Medicine*, **45**(1):51-56.
- Udenigwe C. C., Adebisi A. P., Doyen A., Li H., Bazinet L. y Aluko R. E. (2012a). Low molecular weight flaxseed protein-derived arginine-containing peptides reduced blood pressure of spontaneously hypertensive rats faster than amino acid form of arginine and native flaxseed protein. *Food Chemistry*, **132**(1):468-475.

- Udenigwe C. C., Li H. y Aluko R. E. (2012b). Quantitative structure-activity relationship modeling of renin-inhibiting dipeptides. *Amino Acids*, **42**(4):1379-1386.
- Udenigwe C. C., Lin Y. S., Hou W. C. y Aluko R. E. (2009). Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. *Journal of Functional Foods*, **1**(2):199-207.
- Udenigwe C. C. y Mohan A. (2014). Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *Journal of Functional Foods*, **8**:45-52.
- Valdenaire O., Lepaillieur-Enouf D., Egidy G., Thouard A., Barret A., Vranckx R., Tougard C. y Michel J. B. (1999). A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter - Molecular cloning and characterization. *European Journal of Biochemistry*, **264**(2):341-349.
- van der Kraan M. I. A., van Marle J., Nazmi K., Groenink J., van't Hof W., Veerman E. C. I., Bolscher J. G. M. y Amerongen A. V. N. (2005). Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides*, **26**(9):1537-1542.
- van der Pijl P. C., Kies A. K., Ten Have G. A. M., Duchateau G. S. M. J. y Deutz N. E. P. (2008). Pharmacokinetics of proline-rich tripeptides in the pig. *Peptides*, **29**(12):2196-2202.
- van der Zander K., Bots M. L., Bak A. A. A., Koning M. M. G. y de Leeuw P. W. (2008). Enzymatically hydrolyzed lactotripeptides do not lower blood pressure in mildly hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, **88**(6):1697-1702.
- van Mierlo L. A. J., Arends L. R., T Streppel M., Zeegers M. P. A., Kok F. J., Grobbee D. E. y Geleijnse J. M. (2006). Blood pressure response to calcium supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Human Hypertension*, **20**(8):571-580.
- van Mierlo L. A. J., Koning M. M. G., van der Zander K. y Draijer R. (2009). Lactotripeptides do not lower ambulatory blood pressure in untreated whites:

- results from 2 controlled multicenter crossover studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, **89**(2):617-623.
- Vercruyssen L., Morel N., Van Camp J., Szust J. y Smagghe G. (2008). Antihypertensive mechanism of the dipeptide Val-Tyr in rat aorta. *Peptides*, **29**(2):261-267.
- Vermeirssen V., Van Camp J. y Verstraete W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **51**(1):75-87.
- Vermeirssen V., Van Camp J. y Verstraete W. (2004a). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, **92**(3):357-366.
- Vermeirssen V., van der Bent A., Van Camp J., van Amerongen A. y Verstraete W. (2004b). A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, **86**(3):231-239.
- Wakabayashi H., Abe S., Okutomi T., Tansho S., Kawase K. y Yamaguchi H. (1996). Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiology and Immunology*, **40**(11):821-825.
- Wakabayashi H., Matsumoto H., Hashimoto K., Teraguchi S., Takase M. y Hayasawa H. (1999). N-acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**(5):1267-1269.
- Wakabayashi H., Yamauchi K. y Takase M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal*, **16**(11):1241-1251.
- Wang X., Wang L., Cheng X., Zhou J., Tang X. y Mao X.-Y. (2012). Hypertension-attenuating effect of whey protein hydrolysate on spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, **134**(1):122-126.
- WHO. World Health Organization (2012). Estadísticas sanitarias mundiales 2012, 1-180.

- WHO. World Health Organization (2013a). A global brief on hypertension. *World health day 2013*, 1-39.
- WHO. World Health Organization (2013b). Q&As on hypertension. <http://www.who.int/features/qa/82/en/>
- Williams B. (2009). The changing face of hypertension treatment: treatment strategies from the 2007 ESH/ESC hypertension Guidelines. *Journal of Hypertension*, **27**(3):S19-26.
- Wu J. P., Aluko R. E. y Muir A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, **950**(1-2):125-130.
- Xiao B., Li X. G., Yan J. T., Yu X. F., Yang G. T., Xiao X., Voltz J. W., Zeldin D. C. y Wang D. W. (2010). Overexpression of Cytochrome P450 Epoxygenases Prevents Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats by Enhancing Atrial Natriuretic Peptide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **334**(3):784-794.
- Xu J. Y., Qin L. Q., Wang P. Y., Li W. y Chang C. (2008). Effect of milk tripeptides on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*, **24**(10):933-940.
- Yamamoto N., Maeno M. y Takano T. (1999). Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science*, **82**:1388-1393.
- Yamauchi K., Tomita M., Giehl T. J. y Ellison R. T. (1993). Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, **61**(2):719-728.
- Yang H. Y., Yang S. C., Chen J. R., Tzeng Y. H. y Han B. C. (2004). Soyabean protein hydrolysate prevents the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, **92**(03):507-512.

- Yoshii H., Tachi N., Ohba R., Sakamura O., Takeyama H. y Itani T. (2001). Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, **128**(1):27-33.
- Yu Z. P., Yin Y. G., Zhao W. Z., Chen F. y Liu J. B. (2014). Antihypertensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptide RVPSL on Spontaneously Hypertensive Rats by Regulating Gene Expression of the Renin-Angiotensin System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**(4):912-917.
- Zimmermann M., Jung C. S., Vatter H., Raabe A. y Seifert V. (2002). Effect of Endothelin-Converting Enzyme Inhibitors on big Endothelin-1 Induced Contraction in Isolated rat Basilar Artery. *Acta Neurochirurgica*, **144**(11):1213-1219.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

La tesis presentada es una compilación de los siguientes cuatro artículos originales publicados:

I. **Fernández-Musoles R.**, López-Díez J. J., Torregrosa G., Vallés S., Alborch E., Manzanares P., Salom J. B. (2010). Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction. *Peptides*, 31:1926-1933.

II. **Fernández-Musoles R.**, Salom J. B., Martínez-Maqueda D., López-Díez J. J., Recio I. y Manzanares P. (2013). Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: Inhibition of angiotensin and endothelin-converting enzymes. *Food Chemistry*, 139(1-4):994-1000.

III. **Fernández-Musoles R.**, Manzanares P., Burguete M. C., Alborch E. y Salom J. B. (2013). *In vivo* angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 54(1):627-632.

IV. **Fernández-Musoles R.**, Castello-Ruiz M., Arce C., Manzanares P., Ivorra M. D. y Salom J. B. (2014). Antihypertensive mechanism of lactoferrin-derived peptides: angiotensin receptor blocking effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1):173-181.



Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction

Ricardo Fernández-Musoles^a, José Javier López-Díez^a, Germán Torregrosa^{b,c,d}, Salvador Vallés^a, Enrique Alborch^{b,c,d}, Paloma Manzanera^a, Juan B. Salom^{b,c,d,*}

^a Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Burjassot, Valencia, Spain

^b Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Valencia, Spain

^c Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

^d Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular, IIS-Fundación Investigación Hospital La Fe - Universidad de Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2010

Received in revised form 21 June 2010

Accepted 21 June 2010

Available online 30 June 2010

Keywords:

Lactoferricin B-derived peptide

Bioactive peptide

Hypertension

Vascular tone

Endothelin system

Endothelin-converting enzyme

Vasopeptidase inhibitor

ABSTRACT

Endothelin-converting enzyme (ECE), a key peptidase in the endothelin (ET) system, cleaves inactive big ET-1 to produce active ET-1, which binds to ET_A receptors to exert its vasoconstrictor and pressor effects. ECE inhibition could be beneficial in the treatment of hypertension. In this study, a set of eight lactoferricin B (LfcinB)-derived peptides, previously characterized in our laboratory as angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides, was examined for their inhibitory effects on ECE. In vitro inhibitory effects on ECE activity were assessed using both the synthetic fluorogenic peptide substrate V (FPS V) and the natural substrate big ET-1. To study vasoactive effects, an ex vivo functional assay was developed using isolated rabbit carotid artery segments. With FPS V, only four LfcinB-derived peptides induced inhibition of ECE activity, whereas the eight peptides showed ECE inhibitory effects with big ET-1 as substrate. Regarding the ex vivo assays, six LfcinB-derived peptides showed inhibition of big ET-1-induced, ECE-dependent vasoconstriction. A positive correlation between the inhibitory effects of LfcinB-derived peptides on ECE activity when using big ET-1 and the inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction was shown. ECE-independent vasoconstriction induced by ET-1 was not affected, thus discarding effects of LfcinB-derived peptides on ET_A receptors or intracellular signal transduction mechanisms. In conclusion, a combined in vitro and ex vivo method to assess the effects of potentially antihypertensive peptides on the ET system has been developed and applied to show the inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction of six LfcinB-derived peptides, five of which were dual vasopeptidase (ACE/ECE) inhibitors.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hypertension is usually defined as a chronic elevation of systemic arterial blood pressure above certain threshold values. However, elevated blood pressure is only a manifestation of a progressive disease representing an important health problem. Currently it is estimated that a quarter of the world's adult population is hypertensive, and this number is projected to increase to 30% by 2025 [15]. Progression is strongly associated with functional and structural abnormalities that damage the heart, kidneys, brain, vasculature, and other target organs. The inherent increase in cardiovascular risk leads to premature morbidity and mortality [9]. Prolonged blood pressure lowering through lifestyle

interventions or pharmacological treatments is associated with reductions in the risks of fatal or non-fatal stroke (30–40%) and coronary events (20%), and appears to reduce to a lesser degree the incidences of other complications like heart failure, renal disease and vascular dementia [39]. Unfortunately, blood pressure control to target is still only achieved in 30% of patients [11].

Systemic blood pressure is regulated through nervous and humoral mechanisms acting on vascular tone and blood volume. The renin-angiotensin system (RAS) is the most recognized humoral system for the control of fluid/electrolyte balance and blood pressure, and its dysfunction is involved in the pathophysiology of hypertension [3]. Another peptidic system, the endothelin (ET) system, has also an increasingly recognized role in blood pressure regulation, and an ET-mediated component is thought to be implicated in the vasoactive, inflammatory and hypertrophic processes leading to hypertension and its complications [32]. Moreover, increasing evidence points to different interactions between

* Corresponding author at: Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Ave. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797; fax: +34 961973018. E-mail addresses: salom.jba@gva.es, juan.salom@uv.es (J.B. Salom).



Antihypertensive effects of lactoferrin hydrolyzates: Inhibition of angiotensin- and endothelin-converting enzymes

Ricardo Fernández-Musoles^a, Juan B. Salom^{b,c,d}, Daniel Martínez-Maqueda^e, José Javier López-Díez^a, Isidra Recio^e, Paloma Manzanares^{a,*}

^a Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ave. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^b Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Ave. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

^c Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Ave. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

^d Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular, Fundación Investigación Hospital La Fe – Universidad de Valencia, Valencia, Spain

^e Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2012

Received in revised form 20 December 2012

Accepted 28 December 2012

Available online 16 January 2013

Keywords:

Lactoferrin hydrolyzates
Renin-angiotensin system
Endothelin system
Vasopeptidase inhibitors
ACE-dependent vasoconstriction
ECE-dependent vasoconstriction
Antihypertensive effect

ABSTRACT

The potential of bovine lactoferrin (LF) as a source of antihypertensive peptides acting on the renin-angiotensin system (RAS) and the endothelin (ET) system as dual vasopeptidase inhibitors has been examined. For this purpose enzymatic LF hydrolyzates (LFHs) were generated by trypsin and proteinase K digestions. Permeate fractions with molecular masses lower than 3 kDa (LFH <3 kDa) were orally administered to spontaneously hypertensive rats (SHRs). Although both LFHs <3 kDa showed *in vitro* angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, only proteinase K LFH <3 kDa exerted an *in vivo* antihypertensive effect. The proteinase K LFH <3 kDa and a previously characterized pepsin LFH <3 kDa with ACE-inhibitory and antihypertensive effects were tested in *ex vivo* functional assays as inhibitors of ACE-dependent vasoconstriction. Pepsin LFH <3 kDa but not proteinase K LFH <3 kDa inhibited ACE-dependent vasoconstriction. When tested as inhibitors towards endothelin-converting enzyme (ECE), both LFHs <3 kDa exerted *in vitro* inhibitory effects on ECE activity and inhibited ECE-dependent vasoconstriction. Most abundant peptides in proteinase K LFH <3 kDa were identified by using an ion trap mass spectrometer. Based on peptide abundance, two peptides (GILRPY and REPYFGY) were chemically synthesized and their ECE-inhibitory activity was tested. Both exerted *in vitro* inhibitory effects on ECE activity. In conclusion, orally effective antihypertensive LFHs <3 kDa may act as dual vasopeptidase (ACE/ECE) or as single ECE inhibitors with different antivasoconstrictor effects depending on the protease used to release bioactive peptide sequences.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The renin-angiotensin system (RAS) is the most recognized humoral system for the control of blood pressure, and its dysfunctions are involved in the pathophysiology of hypertension. Briefly, prorenin is converted to active renin by a trypsin-like enzyme. Renin cleaves angiotensinogen to form angiotensin I. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) hydrolyzes both the inactive angiotensin I into vasoconstrictor angiotensin II and the vasodilator bradykinin into an inactive metabolite leading to blood pressure up-regulation (Carey & Siragy, 2003). Several antihypertensive drugs target this system at different points of the cascade (Williams, 2009). Another peptidic system, the endo-

thelin (ET) system, also has an increasingly recognized role in blood pressure regulation, and has been targeted for hypertension drug treatment (Schiffrin, 2005). In the ET system, the endothelin-converting enzyme (ECE) cleaves the biologically inactive intermediate termed big ET-1 to form ET-1 which has powerful vasoconstrictor and pressor properties. Selective ECE inhibitors have been tested in preclinical rat models of hypertension (Battistini, Ayach, Molez, Blouin, & Jeng, 2002). Moreover, present strategies in the search for novel classes of antihypertensive drugs include the development of single compounds capable of simultaneously inhibiting more than one enzymatic activity involved in hypertension pathophysiology (Battistini, Daull, & Jeng, 2005).

In recent years interest in food protein-derived peptides with antihypertensive effects has grown as an alternative to drugs in the control of systemic blood pressure and prevention of associated cardiovascular disease events. Although ACE inhibition is

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3900022; fax: +34 96 3636301.

E-mail address: pmananz@iata.csic.es (P. Manzanares).



In vivo angiotensin I-converting enzyme inhibition by long-term intake of antihypertensive lactoferrin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats



Ricardo Fernández-Musoles^a, Paloma Manzaneras^a, María C. Burguete^{c,d}, Enrique Alborch^{b,c,d}, Juan B. Salom^{b,c,d,*}

^a Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ave. Agustín Escardino, 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^b Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Ave. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

^c Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia, Ave. Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

^d Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular, IIS-Fundación Investigación Hospital La Fe, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2013

Accepted 28 July 2013

Available online 2 August 2013

Keywords:

Bovine lactoferrin
Milk protein hydrolysate
Antihypertensive peptides
Renin–angiotensin system
In vivo ACE inhibition
Spontaneously hypertensive rat

ABSTRACT

We evaluated the effect of the long-term intake of a bovine lactoferrin hydrolysate enriched in low molecular weight peptides (LFH < 3 kDa) on the progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats and its *in vivo* mechanism of action. Male spontaneously hypertensive rats received tap water (negative control), captopril (positive control, 76 mg/kg/day), LFH < 3 kDa (285 mg/kg/day), or LFH < 3 kDa (782 mg/kg/day). Twice a week, systolic blood pressure, body weight and liquid intake were measured. Blood components of the renin–angiotensin system were determined. The systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats receiving water increased along the 24-day follow-up period, while systolic blood pressure around or slightly below the baseline was maintained in both LFH < 3 kDa treated groups. The antihypertensive effects appeared earlier in the high-dose than in the low-dose group. There were no differences in body weight gain between the two groups but liquid intake increased in rats treated with high-dose LFH < 3 kDa. There were reductions of circulating angiotensin I-converting enzyme activity, angiotensin II and aldosterone levels, as well as a compensatory increase of renin activity after LFH < 3 kDa intake. Our results support angiotensin I-converting enzyme inhibition as an *in vivo* mechanism for the antihypertensive effect of long-term oral administration of LFH < 3 kDa to spontaneously hypertensive rats and its potential application as a nutraceutical approach for hypertension treatment.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The renin–angiotensin system (RAS) is one of the main targets for the treatment of hypertension. Its inhibition at three possible levels, angiotensin I-converting enzyme (ACE), upstream renin activity or downstream angiotensin receptors, is the pharmacological basis for commonly used antihypertensive drugs (Fragasso, Maranta, Montanaro, Salerno, Torlasco, & Margonato, 2012). ACE inhibition is also the most aimed target for antihypertensive food-derived peptides developed as an alternative to drugs (Hong, Ming, Yi, Zhanxia, Yongquan, & Chi, 2008). However, the well established *in vitro* inhibitory effect of those

peptides on ACE activity contrasts with the limited *in vivo* evidence available for the mechanism of action underlying their blood pressure modulating effect. In fact increasing evidence is being provided that different mechanisms, other than ACE inhibition, are involved in the antihypertensive effect exerted by many of the food-derived peptides (Hernández-Ledesma, Contreras, & Recio, 2011).

Milk is the main source of antihypertensive ACE-inhibitory peptides reported to date, and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats (SHRs) of mainly casein-derived peptides have been reported during the last two decades (Martínez-Maqueda, Miralles, Recio, & Hernández-Ledesma, 2012). In contrast to casein, there was much less information about the potential of milk whey proteins as sources of antihypertensive peptides when some years ago we focused on the whey protein lactoferrin (LF) (González-Chávez, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2009). We have shown that peptides derived from different regions of LF sequence, including some derived from the well-known antimicrobial LF-derived peptide lactoferricin B (LfciB) (Wakabayashi, Takase, & Tomita, 2003), had inhibitory effects on *in vitro* ACE activity and *ex vivo* angiotensin I-induced ACE-dependent vasoconstriction and were orally

Abbreviations: ACE, angiotensin I-converting enzyme; ANOVA, analysis of variance; ECE, endothelin-converting enzyme; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; LF, lactoferrin; LfciB, lactoferricin B; LFH, lactoferrin hydrolysate; RAS, renin–angiotensin system; SBP, systolic blood pressure; SEM, standard error of the mean; SHR, spontaneously hypertensive rat.

* Corresponding author at: Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Ave. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain. Tel.: +34 963862797; fax: +34 961973018.

E-mail address: salom_jb@uva.es (J.B. Salom).

0963-9969/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.063>

Antihypertensive Mechanism of Lactoferrin-Derived Peptides: Angiotensin Receptor Blocking Effect

Ricardo Fernández-Musoles,[†] María Castelló-Ruiz,^{‡,§,#} Cristina Arce,[‡] Paloma Manzanares,[†] M. Dolores Ivorra,[‡] and Juan B. Salom^{*,‡,§,#}

[†]Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

[‡]Centro de Investigación, Hospital Universitario 'La Fe', Avenida Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

[§]Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia, Avenida Blasco Ibáñez 17, 46010 Valencia, Spain

[#]Unidad Mixta de Investigación Cerebrovascular, IIS-Fundación Investigación Hospital La Fe–Universidad de Valencia, Valencia, Spain

^{*}Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ABSTRACT: Looking for antihypertensive mechanisms beyond ACE inhibition, we assessed whether lactoferrin (LF)-derived peptides can act as receptor blockers to inhibit vasoconstriction induced by angiotensin II or endothelin-1. The lactoferrin B (LfcinB)-derived peptide LfcinB_{20–25} (RRWQWR), the low molecular weight LF hydrolysate (LFH < 3 kDa), and two peptides identified in LFH < 3 kDa (LIWKL and RPYL) were tested in ex vivo assays of vasoactive responses. The peptide RPYL was tested in radioligand receptor binding assays. Both LFH < 3 kDa and individual peptides inhibited angiotensin II-induced vasoconstriction. RPYL showed the highest ex vivo inhibitory effect and also inhibited binding of [¹²⁵I]-[Sar¹,Ile⁶]-angiotensin II to AT₁ receptors. By contrast, neither LFH < 3 kDa nor RPYL inhibited endothelin-1 and depolarization-induced vasoconstrictions. In conclusion, LF-derived peptides selectively inhibit angiotensin II-induced vasoconstriction by blocking angiotensin AT₁ receptors. Therefore, inhibition of angiotensin II-induced vasoconstriction is suggested as a mechanism contributing along with ACE inhibition to the antihypertensive effect of some LF-derived peptides.

KEYWORDS: bovine lactoferrin hydrolysate, lactoferrin-derived peptides, antihypertensive mechanism, renin–angiotensin system, angiotensin-converting enzyme inhibition, angiotensin receptor blocker

INTRODUCTION

Hypertension is probably the most important modifiable risk factor for cardiovascular disease, and its management includes not only pharmacological treatment but also lifestyle changes including physical activity and dietary habits.¹ The increasing perception about the relationship between food and health is fostering the development of functional foods providing health benefits beyond basic nutrition.² Some food proteins contain embedded peptides that once released behave as bioactive peptides with different health-promoting properties including blood pressure lowering effects.³

The renin angiotensin system (RAS) is one of the main targets for the treatment of hypertension. Its inhibition at three possible levels, angiotensin-converting enzyme (ACE), upstream renin activity, or downstream angiotensin receptors, is the pharmacological basis for commonly used antihypertensive drugs.⁴ ACE inhibition is also the most aimed target for antihypertensive food-derived peptides developed as an alternative to drugs.⁵ Although different animal and plant proteins have been used, milk is the main source of antihypertensive ACE-inhibitory peptides reported to date.⁶

In contrast to casein, there was much less information about the potential of milk whey proteins as sources of antihypertensive peptides when some years ago we focused

on whey protein lactoferrin (LF)⁷ and its well-known functional domain lactoferrin B (LfcinB).⁸ First, we have shown that a set of peptides derived from LfcinB had inhibitory effects on in vitro ACE activity and ex vivo angiotensin I-induced ACE-dependent vasoconstriction⁹ and were orally effective antihypertensive peptides in spontaneously hypertensive rats (SHRs).¹⁰ With regard to the parent protein, we have reported the inhibitory effects of a LF pepsin hydrolysate (LFH) on ACE activity and ACE-dependent vasoconstriction.¹¹ Then, we have recently described that the ultrafiltered hydrolysate (LFH < 3 kDa) showed increased inhibitory effect on ACE activity and orally antihypertensive effect in SHRs after both acute¹² and chronic¹³ administration. Finally, we have isolated and identified novel non-LfcinB-derived peptides with ACE-inhibitory and antihypertensive properties, which could contribute to the antihypertensive effects of LFH < 3 kDa.¹²

The search for in vitro ACE inhibition is the most common strategy in the selection of potential antihypertensive peptides derived from food proteins. However, it is difficult to establish a

Received: October 15, 2013

Revised: December 18, 2013

Accepted: December 19, 2013

Published: December 19, 2013

