

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Identificación y caracterización de las propiedades biológicas de
péptidos de alpiste: cereal empleado para el tratamiento de
diabetes e hipertensión**

Tesis que presenta

Patricia Aurora Estrada Salas

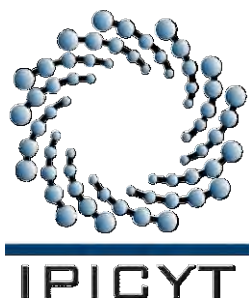
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2013



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 423452) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Identificación y caracterización de las propiedades biológicas de péptidos de alpiste: cereal empleado para el tratamiento de diabetes e hipertensión**” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Patricia Aurora Estrada Salas** y aprobada el **cuatro de julio del dos mil trece** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dra. Gabriela Margarita Montero Morán
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Ma. del Carmen González Castillo
Miembro del Comité Tutorial



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 109 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de julio del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ma. del Carmen González Castillo	Presidente	UASLP
Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Secretaria	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dra. Gabriela Margarita Montero Morán	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Patricia Aurora Estrada Salas

sobre la Tesis intitulada:

Identificación y caracterización de las propiedades biológicas de péptidos de alpiste: cereal empleado para el tratamiento de diabetes e hipertensión

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

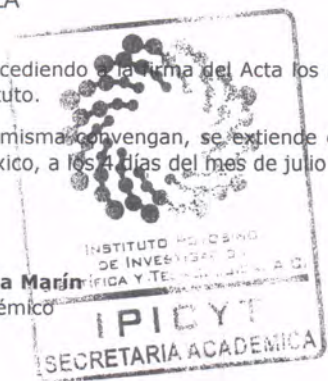
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de julio de 2013.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dedicatorias

A mi familia y a Julio

Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

A la Dra. Gabriela Margarita Montero Morán

A la Dra. Leticia Santos Martínez

A la Dra. Ma. Del Carmen González Castillo de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP

Al Q.F.B. Pedro P. Martínez Cuevas de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP

Al Q.F.B. Manuel Alejandro Ramírez Lee de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP

Al M. en C. Alberto Barrera Pacheco

A los profesores de la División de Biología Molecular

A los compañeros del laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular

A los amigos del IPICYT

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (423452)

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción y Antecedentes	1
1.1 Generalidades del alpiste (<i>Phalaris canariensis L.</i>)	1
1.2 Características estructurales	1
1.3 Composición química de la semilla de alpiste	3
1.4 Proteínas de semilla de alpiste	3
1.5 Utilidad del alpiste	4
1.6 Proteínas de reserva	4
1.6.1 <i>Albúminas</i>	5
1.6.2 <i>Globulinas</i>	5
1.6.3 <i>Prolaminas</i>	6
1.6.4 <i>Glutelinas</i>	6
1.7 Péptidos bioactivos	7
1.7.1 <i>Péptidos con actividad opioide</i>	7
1.7.2 <i>Péptidos hipotensivos (inhibidores de la ECA)</i>	7
1.7.3 <i>Péptidos inmunomoduladores y antimicrobianos</i>	8
1.7.4 <i>Péptidos con actividad sobre el sistema digestivo</i>	8
1.7.6 <i>Péptidos con capacidad inhibitoria de la actividad de la enzima DPPIV</i>	9
1.8 Diabetes	9
1.8.1 <i>Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)</i>	10
1.9 Hipertensión	14
1.9.1 <i>Sistema renina-angiotensina-aldosterona</i>	14
1.9.2 <i>Enzima convertidora de angiotensina (ECA)</i>	16
1.9.3 <i>Bradicinina (BK)</i>	18
1.9.4 <i>Óxido Nítrico</i>	18

II. Justificación	20
III. Objetivo	21
IV. Materiales y Métodos	22
4.1 Material biológico	22
4.2 Extracción de proteínas de reserva	22
4.3 Cuantificación de proteínas y electroforesis SDS-PAGE (1-DE)	22
4.4 Digestión trípica de proteínas de reserva	23
4.5 Simulación de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	23
4.6 Ensayo de actividad dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV)	23
4.7 Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA)	24
4.8 Bioensayo de corazón aislado y perfundido de rata	24
4.9 Producción de óxido nítrico (NO) en el efluente venoso de corazones aislados	25
4.9.1 Análisis estadístico	25
V. Resultados y Discusión	26
5.1 Extracción y cuantificación de proteínas de reserva	26
5.2 Perfil electroforético de proteínas de reserva de alpiste	26
5.3 Liberación de péptidos encriptados por digestión enzimática <i>in vitro</i>	28
5.4 Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la actividad de la dipeptidilpeptidasa IV	28
5.5 Ensayo <i>in vitro</i> de inhibición de la ECA	31
5.6 Evaluación del efecto vasodilatador de los péptidos de alpiste	31
5.7 Producción de óxido nítrico (NO) en el efluente venoso de corazones aislados	36
VI. Conclusiones	38
VII. Referencias	39
VIII. Anexos	47

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Descripción de la planta de alpiste.	2
Figura 2. Estructura de la DPPIV.	12
Figura 3. Papel de la DPPIV en la inactivación de incretinas.	13
Figura 4. Fases del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA).	15
Figura 5. Isoformas principales de la ECA.	17
Figura 6. Proteínas de reserva de alpiste expresado en porcentaje (%).	27
Figura 7. Perfil electroforético de proteínas de reserva de alpiste.	27
Figura 8. Perfil de digestiones in vitro de las proteínas totales extraídas de harina de alpiste.	29
Figura 9. Actividad inhibitoria de los hidrolizados de proteínas de alpiste sobre la DPPIV.	30
Figura 10. Actividad inhibitoria de los hidrolizados de proteínas de alpiste sobre la ECA.	32
Figura 11. Efecto vasodilatador de péptidos de alpiste (ALP).	34
Figura 12. Porcentaje de vasodilatación y vasoconstricción de péptidos de alpiste (ALP).	35
Figura 13. Estimulación de la producción de NO por los péptidos de alpiste.	37

Resumen

Identificación y caracterización de las propiedades biológicas de péptidos de alpiste: cereal empleado para el tratamiento de diabetes e hipertensión

La diabetes así como la hipertensión y la obesidad se han incrementado significativamente en México y en el mundo. Estas enfermedades se asocian principalmente al cambio en los hábitos nutricionales. Por tal motivo, existe gran interés en identificar y caracterizar nuevas moléculas bioactivas provenientes de alimentos, especialmente los biopéptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas, son los de mayor potencial para el desarrollo de alimentos funcionales. El alpiste (*Phalaris canariensis* L.) tradicionalmente se consume como tratamiento de la diabetes e hipertensión, sin embargo, a la fecha no existen reportes científicos que identifiquen los bioactivos responsables de estas propiedades, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar y evaluar los péptidos encriptados en las proteínas del alpiste. Las proteínas de reserva fueron fraccionadas en base a su solubilidad y se caracterizaron electroforéticamente. Las prolaminas (37%) y glutelinas (35%) fueron las fracciones mayoritarias. El patrón electroforético mostró similitud con el de cereales como cebada, avena y maíz. Los péptidos encriptados (biopéptidos) fueron liberados mediante digestión trípica y empleando el método de simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*. Los péptidos menores de 10 kDa mostraron inhibición del 43.5% sobre la actividad de la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV) y del 73.5% sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Para evaluar el efecto vasoactivo de los biopéptidos se utilizó un bioensayo de corazón aislado y perfundido de rata, en donde se evaluó la presión de perfusión como un índice del tono vascular, y la magnitud de la contractilidad del miocardio, de forma simultánea. También se cuantificó la producción de óxido nítrico (NO) en el efluente venoso del corazón aislado. La producción de NO de los biopéptidos de alpiste fue de 12.24 μM . Estos hallazgos apoyan científicamente el empleo del alpiste en la prevención de diabetes e hipertensión y el alto potencial de este cereal como alimento funcional.

Palabras claves: ECA, DPPIV, *Phalaris canariensis*, óxido nítrico.

Abstract

Identification and characterization of the biological properties of peptides birdseed: cereal used for the treatment of diabetes and hypertension

Diabetes, hypertension, and obesity have increased significantly in Mexico and worldwide, diseases associated mainly to the change in diet. Therefore, there is great interest in identifying and characterizing new bioactive molecules from food; especially biopeptides obtained and isolated from the enzymatic hydrolysis have the higher potential for development of functional foods. The canary grass (*Phalaris canariensis* L.) is a cereal that in Mexico is used as traditional food for the treatment of diabetes and hypertension, however, up to date there are no scientific reports that describe the bioactive responsible for these functions. Therefore, the aim of this work was to characterize and evaluate the bio-peptides of bird seed. The flour and grain of canary grass were purchased at the supermarket. Storage proteins were fractionated based on their solubility and characterized electrophoretically. Prolamins (37%) and glutelins (35%) were the main fractions. The electrophoretic pattern showed similarity with that of cereals such as barley, oat and maize. The peptides encrypted (bio-peptides) were released by tryptic digestion and by the method of simulated in vitro gastrointestinal digestion. Peptides below 10 kDa showed 43.5% inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) and 73.5% of the angiotensin converting enzyme (ACE). To evaluate the effect vasoactive of bio-peptides a bioassay isolated perfused heart rat was used, where the perfusion pressure was evaluated as an indication of vascular tone, and the extent of myocardial contractility, simultaneously quantifying the production of nitric oxide (NO) in the venous effluent of the isolated heart. NO production with birdseed bio-peptides was 12.24 μ M. These findings support scientifically the use of bird seed in the prevention of diabetes and hypertension and the high potential of this cereal as a functional food.

Keywords: ACE, DPPIV, *Phalaris canariensis*, nitric oxide.

I. Introducción y Antecedentes

1.1 Generalidades del alpiste (*Phalaris canariensis* L.)

Phalaris canariensis L. comúnmente llamado canaryseed, anual canarygrass, canary grass, birdseed o alpiste, pertenece a la familia Poaceae (gramínea), subfamilia Pooideae y tribu Agrostideae. Es de la misma subfamilia del trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* L.), y avena (*Avena sativa* L.). El alpiste es un cereal con un ciclo de cultivo y prácticas de producción similares a las de otros cereales invernales, tales como el trigo y la avena (Jingzhao et al., 2011). En la actualidad, su producción se concentra en las provincias del suroeste de Canadá (Alberta, Saskatchewan y Manitoba) y en menor escala en Argentina, Tailandia y Australia (Cogliatti, 2012). Los granos de alpiste se destinan casi con exclusividad a la alimentación de aves, solos o en mezcla con otros cereales como mijo, girasol y lino, sin embargo, el alpiste tiene una composición rica en proteínas que contienen aminoácidos como cisteína, triptófano y fenilalanina, que le confiere un amplio potencial como alimento nutritivo (Cogliatti, 2012).

1.2 Características estructurales

El alpiste es una planta herbácea, de alrededor de 60 -100 cm de altura, con tallos erectos (Figura 1). Tiene vainas sin pelo, hojas planas sin pelo de 20 a 40 mm de largo por 5 a 10 mm de ancho y panículas compactas de forma ovalada que conservan la semilla con firmeza (Cogliatti, 2012). Presenta granos pequeños elípticos con vainas cubiertas con pelos muy finos o tricomas silíceos (Abdel-Aal et al., 1997).

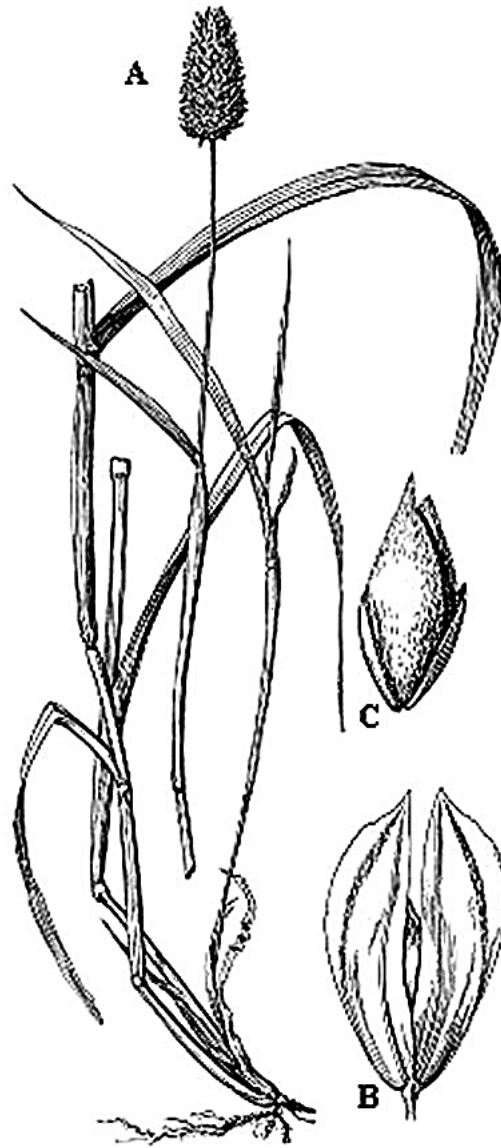


Figura 1. Descripción de la planta de alpiste. A) panícula, B) espiguilla, C) grano en vaina con tricomas (Tomado de Cogliatti, 2012).

1.3 Composición química de la semilla de alpiste

Los principales componentes de la semilla de alpiste son almidón (60%), proteína (21%), aceite (8%) y fibras (7%) (Abdel-Aal et al., 1997). También contiene fitoquímicos, incluyendo, fitatos, fenoles y taninos (Abdel-Aal et al., 2010). El porcentaje de fibra total en alpiste es más bajo que en los cereales comunes. La avena contiene de 11 a 25%, el trigo de 13 a 21%, y la cebada de 16 a 27%, este dato sugiere que alpiste no es una buena fuente de fibra (Ward et al., 2008). De los ácidos grasos presentes en alpiste, el 55% corresponde a ácido linoleico, 29% oleico, 11% palmítico, 2.5% linolénico, y el 1% al ácido esteárico. El aceite es altamente insaturado, por lo cual tiene un alto potencial para la rancidez rápida, sin embargo, la presencia de componentes antioxidantes ayudan a retrasar este proceso durante el almacenamiento (Abdel-Aal et al., 1997). El almidón de alpiste difiere del almidón de trigo y de maíz por presentar menor contenido de amilosa (16 a 22%) (Abdel-Aal et al., 1997), mayor viscosidad, el gel formado es altamente estable y rígido cuando se calienta o se congela (Abdel-Aal et al., 2010). Los gránulos de almidón de alpiste son poligonales con un tamaño promedio de 1.5-3.5 o 2.5-5.0 μm , el tamaño pequeño y su facilidad de extracción hacen del alpiste un cereal útil en la industria cosmética como un ingrediente en polvo (Abdel-Aal et al., 1997), en las industrias textil y farmacéutica como espesante, estabilizador coloidal y agente gelificante (Abdel-Aal et al., 2010).

1.4 Proteínas de semilla de alpiste

Comparado con otros cereales comunes, el alpiste contiene altos niveles de proteína, alrededor del 21% (Abdel-Aal et al., 2010). Las albúminas y las globulinas de alpiste se encuentran en niveles más bajos que en el trigo (13.1% en alpiste vs 23.6% en trigo), mientras que las prolaminas y las glutelinas son más abundantes en el alpiste (77.7%) que en el trigo (73.5%). La composición de aminoácidos indican que las proteínas de alpiste son deficientes en lisina y treonina (1.3 y 2.7 g/100g de proteína, respectivamente) al igual que las proteínas del trigo (1.9 y 2.8 g/100g de proteína, respectivamente). Sin embargo, las proteínas de alpiste son muy ricas en cisteína, triptófano y fenilalanina (Abdel-Aal et al., 1997). Las concentraciones de metionina en las proteínas de alpiste (1.4

g/100g de proteína) son iguales a las del trigo, estas concentraciones representan solo la mitad de los niveles del estándar de la FAO (Food and Agriculture Organization). La deficiencia de este aminoácido en el alpiste es mejorado por la presencia de altas concentraciones de cisteína (3.3 g/100g de proteína) (Abdel-Aal et al., 1997).

1.5 Utilidad del alpiste

Los granos de alpiste se emplean casi exclusivamente como alimento para pájaros, sin embargo, Newkirk et al. (2011) demuestran el potencial de alpiste como alimento para pollos de engorda, así mismo Thacker (2003) propone que el alpiste puede ser un alimento exitoso para cerdos en crecimiento ya que no afectan su crecimiento o la calidad de la carne. Rowe et al., (1974) muestran que los ratones aceptan el alpiste como alimento. Además, Takagi y Iida (1980) demostraron que un extracto de éter de alpiste sirvió como un potente antioxidante en manteca de cerdo y aceite de sardina. Los principales activos antioxidantes de este extracto identificados fueron ésteres de ácido cafeico con sitosterol, gramisterol, campesterol y cicloartenol (Takagi y Iida, 1980; Tan y Shahidi, 2012). El alpiste también se considera por las comunidades tradicionales de México y otros países como planta medicinal, esta semilla se emplea para el tratamiento de afecciones renales e hipercolesterolemia (Cogliatti, 2012), además se ha reportado que la infusión de alpiste tiene propiedades antihipertensivas (Passos et al., 2012).

1.6 Proteínas de reserva

Las proteínas de las semillas están constituidas principalmente por tres grupos: 1) estructurales, 2) con actividad biológica (generalmente son enzimas, lectinas, e inhibidores de enzimas) y 3) de reserva o de almacenamiento (Mandal y Mandal, 2000). Las proteínas de reserva constituyen la mayor proporción de proteínas en semillas, estas proteínas son depositadas en cuerpos proteínicos durante el desarrollo del endospermo (Fukushima, 1991), son una fuente de nitrógeno y azufre necesario para la germinación de la plántula (Mandal y Mandal, 2000). Las proteínas de almacenamiento representan alrededor del 50% del total de las

proteínas en granos de cereales maduros y tienen un impacto importante en la calidad nutricional del grano para el consumo humano y ganado o en sus propiedades funcionales importantes en el procesamiento de alimentos (Shewry et al., 2002). Las proteínas de reserva fueron clasificadas por Osborne (1909) en base a su solubilidad como: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (soluble en mezclas de alcohol y agua) y glutelinas (soluble en soluciones ácidas, alcalinas, o soluciones de SDS diluido).

1.6.1 Albúminas

Las albúminas comprenden enzimas metabólicas directa o indirectamente relacionadas a la función de almacenamiento del tejido cotiledón. También juegan un papel importante en la defensa de las plantas, tales como los inhibidores de hidrolasas y las lectinas. A las albúminas de tipo 2S se le han atribuido un papel como proteína de reserva y como proveedoras de azufre en la germinación (Duranti et al., 2008). Las albúminas y globulinas comprenden la fracción mayoritaria de las proteínas de reserva de dicotiledóneas (Mandal y Madal, 2000).

1.6.2 Globulinas

Las globulinas son el grupo de proteínas de almacenamiento más ampliamente distribuidas, están presentes no sólo en plantas dicotiledóneas (leguminosas) sino también en plantas monocotiledóneas (cereales). Pueden dividirse en dos grupos basado en su coeficiente de sedimentación: las globulinas 7S, tipo vicilina y las globulinas 11S o tipo legumina. Ambos grupos muestran una variación considerable en su estructura, la cual resulta parcialmente del procesamiento postraducciona (Shewry et al., 1995). Las globulinas 11S consisten de seis pares de subunidades que interactúan no covalentemente. Cada uno de estos pares de subunidades tienen una subunidad ácida de aproximadamente 40 kDa y una subunidad básica de aproximadamente 20 kDa, unidas por un puente disulfuro. Las vicilinas 7S son típicamente proteínas triméricas (Argos et al., 1985) de aproximadamente 150 a 190 kDa.

1.6.3 Prolaminas

La mayoría de las gliadinas (prolaminas) están presentes como monómeros, inicialmente fueron clasificadas en cuatro grupos con base a la movilidad electroforética y denominadas como α , β , γ y ω gliadinas, en orden decreciente de movilidad; sin embargo estudios posteriores, en base a su secuencia de aminoácidos han demostrado que las α , β gliadinas forman un solo grupo (α/β). Métodos tales como electroforesis bidimensional ó cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) permitió agruparlas en 4 tipos: ω_1 , ω_2 , ω_5 , α/β y γ . Basado en el análisis de secuencia de aminoácidos, composición de aminoácidos y peso molecular, las ω gliadinas (ω_5 y ω_1) se caracterizan por un alto contenido de glutamina, prolina y fenilalanina, y poco contenido de cisteína, el peso molecular de ω_5 y ω_1 es de 50 kDa y 40 kDa, respectivamente. Las gliadinas α/β y γ tienen una menor proporción de glutamina y prolina que las ω gliadinas, y presentan superposición de pesos moleculares de aproximadamente 28 a 35 kDa (Wieser, 2007).

1.6.4 Glutelinas

Las glutelinas más estudiadas son las del trigo, sus grandes polímeros llamados “macropolímeros de glutelinas” y su cantidad en la harina del trigo (aproximadamente de 20-40 mg/g) dan la mayor contribución a las propiedades funcionales de la masa. La fracción de glutelinas comprende agregados de proteínas unidos por enlaces disulfuro, después de la reducción de los enlaces disulfuro las subunidades resultantes de las glutelinas muestran una solubilidad en alcoholes acuosos similar a las gliadinas (Wieser, 2007). Las glutelinas se dividen en dos grupos, las subunidades de bajo peso molecular y las de alto peso molecular (Espitia et al., 2008). Las subunidades de bajo peso molecular están relacionadas a las α/β y γ gliadinas en peso molecular y composición de aminoácidos, las subunidades de alto peso molecular pueden ser agrupadas en 2 tipos, el tipo x y el tipo y, con pesos moleculares de 83 a 88 kDa y de 67 a 74 kDa, respectivamente (Wieser, 2007).

1.7 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son péptidos encriptados en las proteínas que además de su valor nutricional (fuente de aminoácidos esenciales) son capaces de ejercer efectos biológicos específicos. La mayoría de los péptidos bioactivos son generados espontáneamente durante la digestión *in vivo* a partir de las proteínas que los contienen. No obstante, también se han obtenido nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano (Martínez y Martínez, 2006). Los péptidos bioactivos pueden ejercer su acción tanto a nivel local (tracto gastrointestinal) como sistémico (Vermeirssen et al., 2004; Rutherfurd y Moughan, 2005), ya que pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos a través de la circulación sanguínea (Teschemacher et al., 1997; Vermeirssen et al., 2008). Hasta el momento se encuentran descritos varios péptidos con diferentes actividades biológicas, algunos de ellos se describen a continuación.

1.7.1 Péptidos con actividad opioide

Los péptidos con actividad opioide son péptidos pequeños entre 5 y 10 aminoácidos de longitud. Los más abundantes son las β -casomorfina denominadas así por derivar de la hidrólisis de la β -caseína y por su efecto fisiológico parecido al de la morfina. Otros péptidos aunque con menor actividad opioide son las exorfinas generadas a partir de la hidrólisis de la α -caseína y del gluten del trigo (péptido GYYPT) (Vioque et al., 2000; Hartmann y Meisel, 2007).

1.7.2 Péptidos hipotensivos (inhibidores de la ECA)

Los péptidos Inhibidores de la ECA (ECAi) son generalmente péptidos de cadena corta, di y tripéptidos (Vioque et al., 2000), con frecuencia llevan residuos de aminoácidos polares como prolina (Hartmann y Meisel, 2007). Estos péptidos son absorbidos fácil y rápidamente en el estómago e intestino. Pueden entrar en el sistema circulatorio e inhibir a la ECA, promoviendo una disminución de la presión arterial (Vioque et al., 2000). Un gran número de péptidos ECAi han sido aislados de la digestión de proteínas de alimentos, especialmente en leche (ejemplo, el tripéptido VPP), pescado (tripéptido LRP), amaranto y carne (tripéptido LKP)

(Hartmann y Meisel, 2007, Silva-Sánchez, et al., 2008), otros reportes mencionan efecto inhibitorio con péptidos de maíz y arroz (Vioque et al., 2000).

1.7.3 Péptidos inmunomoduladores y antimicrobianos

Los péptidos inmunomoduladores pueden potenciar la función de las células inmune, como la proliferación de linfocitos, la actividad de las células natural killer (NK), síntesis de anticuerpos y regulación de citocinas. Además podrían reducir reacciones alérgicas en trastornos alérgicos mediados por la acción de anticuerpos IgE y potenciar la inmunidad del tracto gastrointestinal. Se han aislado de hidrolizados trópicos de proteínas de arroz (ejemplo, el péptido GYPMYPLR) y soya (Hartmann y Meisel, 2007). Los péptidos antimicrobianos han sido identificados en muchos hidrolizados de proteínas, especialmente de la leche. Actúan contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas (*Escherichia*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella* y *Staphylococcus*), levaduras y hongos filamentosos. La interrupción de la permeabilidad de la membrana es parcialmente responsable del mecanismo antibacterial (Hartmann y Meisel, 2007).

1.7.4 Péptidos con actividad sobre el sistema digestivo

Los péptidos que ejercen sus acciones sobre el sistema digestivo mejoran la función digestiva e inducen el crecimiento de la microbiota no patógena, por ejemplo los péptidos derivados de la lactoferrina proveniente de la leche (Martínez y Martínez, 2006). Se han aislado una serie de péptidos procedentes del gluten y de las α y β caseínas que actúan mediante unión a receptores, como moduladores exógenos de la motilidad intestinal, de la permeabilidad epitelial y de la liberación de hormonas intestinales (Martínez y Martínez, 2006). Los péptidos con actividad sobre la absorción de minerales previenen la precipitación de minerales en la luz intestinal durante la digestión, ya que son capaces de quelar (secuestrar) minerales ayudando a mantenerlos solubles y facilitar su absorción (Martínez y Martínez, 2006).

1.7.5 Péptidos antitrombóticos e hipocolesterolémicos

Los péptidos antitrombóticos son péptidos que inhiben la agregación de plaquetas en la sangre y la unión de la cadena α del fibrinógeno a los receptores de superficie de las plaquetas, algunos de estos péptidos son los derivados de la caseína (MAIPPKKNQNK y KNQNK) (Hartmann y Meisel, 2007). Los péptidos hipocolesterolémicos han sido aislados de caseína y suero de leche o bien en péptidos derivados de soya (péptido LPYPR). El mecanismo de este efecto no es totalmente claro, un posible mecanismo podría ser debido a una reducción de la solubilidad del colesterol en forma de micelas, impidiendo así su absorción intestinal (Hartmann y Meisel, 2007).

1.7.6 Péptidos con capacidad inhibitoria de la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)

Los péptidos con capacidad de inhibir la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV ayudan en el tratamiento y prevención de la diabetes, ya que la DPPIV es una enzima que hidroliza las incretinas, hormonas involucradas en la secreción de insulina. Se han reportado péptidos con esta capacidad en amaranto, trigo, soya, frijol negro (Velarde Salcedo et al., 2013), salmón (péptido GPAQ) (Li-Chan et al., 2012) y leche (péptido VAGTWY) (Uchida et al., 2011).

1.8 Diabetes

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno metabólico multifactorial. Se caracteriza por hiperglicemia crónica, resistencia a los efectos biológicos de la insulina (resistencia a insulina IR) y a un defecto en la secreción de insulina. Los factores exactos que conducen al desarrollo de la DM2 no se han aclarado plenamente (Pérez, 2009). Desde el punto de vista del mecanismo fisiopatológico, en la DM2 se observan tres fases: a) aparición de un estado de IR periférica a la insulina, generalmente asociada a valores de normoglicemia, b) una segunda fase asociada a una IR más marcada a nivel de tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo) donde existe una sobreproducción de insulina que no alcanza a controlar la homeostasis de glucosa (hiperglicemia postprandial), c) una fase final, asociada a una declinación en el funcionamiento de las células beta pancreáticas, donde

disminuye la síntesis de la hormona (Pérez, 2009). Se ha reconocido un nuevo mecanismo involucrado en la fisiopatología de la DM2: el déficit de producción y/o acción de las principales incretinas, la Glucagon like péptido-1 (GLP1) y el Polipéptido insulínotropo glucosa dependiente (GIP). Las incretinas son enterohormonas que estimulan la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de nutrientes. Ambas presentan también efecto trófico sobre las células beta de los islotes pancreáticos. GLP-1 tiene otras acciones como son la inhibición de la secreción de glucagón, enlentecimiento del vaciamiento gástrico e inhibición del apetito. Ambas incretinas son rápidamente hidrolizadas por la enzima DPP IV. Las terapias actuales para el tratamiento de la diabetes se basan en fármacos como los incretinomiméticos, análogos y los inhibidores de DPPIV, que se presentan como una terapéutica prometedora para los pacientes con DM2 (Bayon et al., 2010).

1.8.1 *Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV)*

La DPPIV es una serina exopeptidasa perteneciente a la familia de las proteínas S9B que cortan dipéptidos X-prolina, X-hidroxiprolina, X-dehidroprolina o X-alanina al extremo N-terminal de proteínas tales como, quimosinas, neuropéptidos, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, y las hormonas GLP 1 y GLP 2. La DPPIV es una glicoproteína transmembranal del tipo II, en su dominio citoplasmático tiene seis aminoácidos N-terminal, y en el dominio extracelular cuenta con un segmento flexible, una región rica en cisteína, una región glicosilada y una región catalítica en el C-terminal (Figura 2). Esta enzima se expresa en la superficie membranal de muchos tipos celulares y cuyas funciones fisiológicas son en gran medida desconocidas (Matteucci y Giampietro, 2009). Se sabe que tiene una función dual, como proteasa regulatoria y proteína de unión (Mentlein, 1999). La DPPIV está localizada en el riñón, hígado, en células epiteliales del ducto pancreático, también se encuentra en fluidos corporales relacionados en nutrición y excreción (lumen del intestino, bilis, fluido pancreático, orina); sin embargo, también está en contacto cercano con hormonas circulantes en la sangre, ya que se encuentra en células epiteliales de vasos sanguíneos y además está localizada como enzima soluble en el plasma sanguíneo. Entre las

células del sistema inmune, la DPPIV se expresa en linfocitos T-helper activado y los subconjuntos de macrófagos (Mentlein, 1999). También es responsable de degradar las incretinas (GLP1 y GLP2) (Figura 3), por tanto los inhibidores de la DPPIV incrementan el tiempo de acción de las incretinas (Mentlein, 1999; Barnett, 2006).

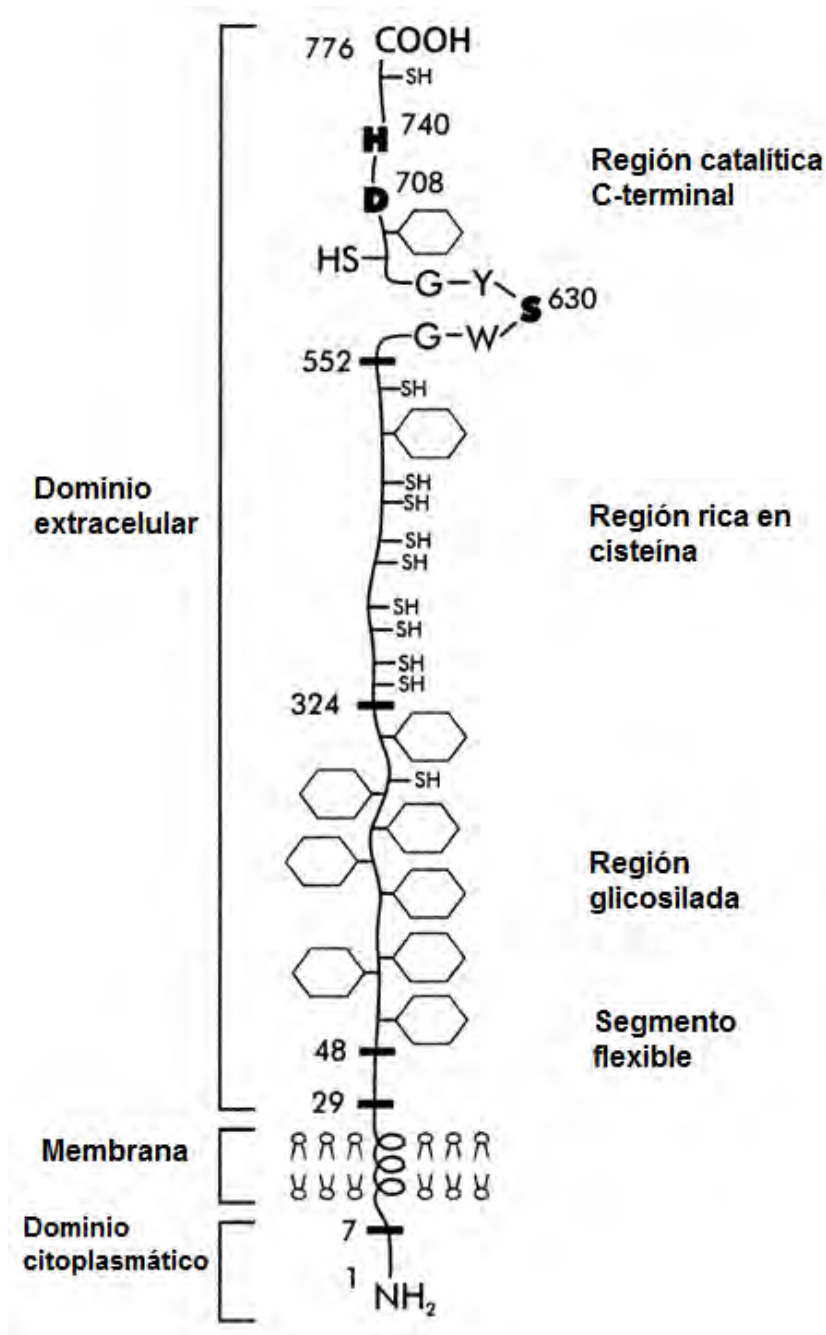


Figura 2. Estructura de la DPPIV. La DPPIV cuenta con un dominio citoplasmático y un dominio extracelular en donde se localiza la región catalítica, la cual tiene un centro catalítico tipo serin-proteasa (Modificado de Mentlein, 1999).

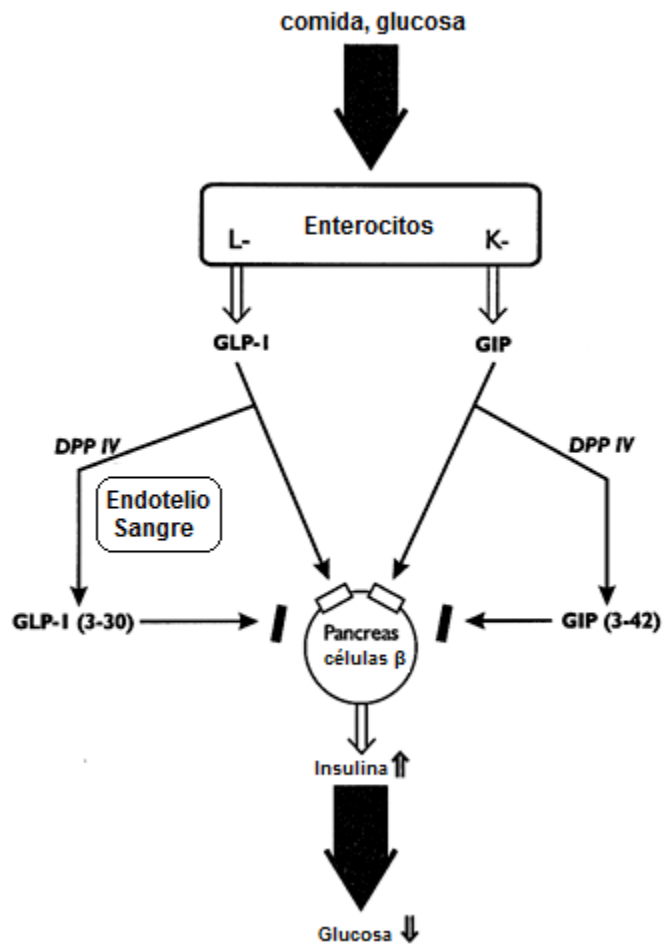


Figura 3. Papel de la DPPIV en la inactivación de incretinas. Las hormonas GLP-1 y GIP son liberadas postprandialmente por las células L ó células K del intestino, transportadas en la sangre hacia las células β pancreáticas donde estimulan la secreción de insulina. La DPPIV en la superficie de las células endoteliales o soluble en la sangre, degrada ambos péptidos del N-terminal, resultando una rápida pérdida de la actividad hormona (Modificado de Mentlein, 1999).

1.9 Hipertensión

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica de etiología multifactorial, cuyo signo característico es la elevación persistente de la presión arterial (PA) (Oropesa-Fernández y Gallego-Fernández, 1995), siendo esta patología una de las principales causas de muerte en el mundo (Fritz et al., 2011). Se estima que existen más de 600 millones de personas que la padecen (Rosas 2003; Lara et al., 2004). La PA se caracteriza básicamente por la existencia de una disfunción endotelial (DE), y en consecuencia un desequilibrio entre los factores relajantes del vaso sanguíneo como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante del endotelio (EDHF) y los factores vasoconstrictores (principalmente endotelinas) (Wagner-Grau, 2010). También existe una disminución a nivel del endotelio de la prostaciclina-PGI₂ (proteína vasodilatadora) y el aumento relativo del tromboxano-TXA₂ intracelular (proteína vasoconstrictora) (Wagner-Grau, 2010). Otro factor fisiopatológico considerado en la génesis de la hipertensión arterial es el incremento en la secreción o la actividad inapropiada de la renina, dando como resultado un incremento en la producción de angiotensina II y aldosterona a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Gamboa, 2006) el cual se describe a continuación.

1.9.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura 4) es uno de los sistemas principales reguladores de la presión arterial, fluido y homeostasis de los electrolitos. El angiotensinógeno es una proteína globular grande (52 a 60 kDa) que sirve como sustrato para la renina, enzima que cataliza la conversión proteolítica de angiotensinógeno al decapeptido angiotensina I (ANGI). La ANGI es a su vez es transformada por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) al octapeptido angiotensina II (ANGII). La unión de la ANGII a sus receptores, media la vasoconstricción y la liberación de aldosterona (Gamboa, 2006).

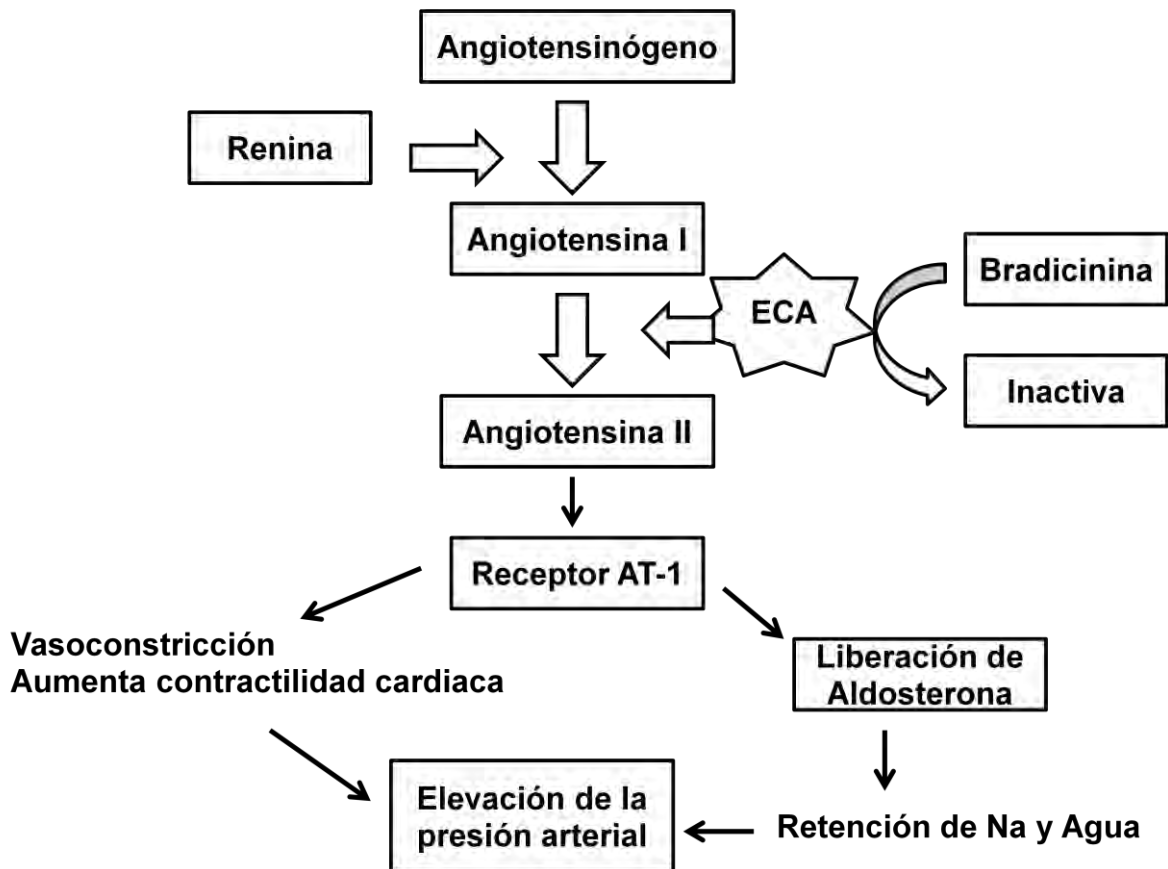


Figura 4. Fases del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). La actividad de la ECA en este sistema es que convierte la angiotensina I en angiotensina II, potente vasoconstrictor. La ECA también tiene la capacidad de inactivar la bradicinina, potente vasodilatador (Modificado de Santeliz et al., 2008).

1.9.2 Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La dipeptidil carboxipeptidasa, denominada comúnmente como ECA remueve el dipéptido C-terminal His-Leu de ANGI generando la ANGII el cual es un potente vasoconstrictor (Figura 4). La ECA, además inactiva la bradisinina (de acción vasodilatadora), removiendo secuencialmente los dipéptidos Phe-Arg y Ser-Pro (Moreau et al., 2005). Por esto la ECA tiene un papel importante papel en la homeostasis de la presión sanguínea (Martínez, 1992). Estructuralmente la ECA es una metalopeptidasa de zinc y funcionalmente una ectoenzima unida a membrana. Existen 3 isoformas principales de la ECA: la somática, la testicular o germinal y la plasmática o soluble. La ECA somática es una glicoproteína bilobulada de 170 kDa unida a la membrana celular y que tiene una región hemodimérica extracelular (Figura 5), se encuentra en vasos sanguíneos, riñones, corazón y cerebro, principalmente, posee dos dominios homólogos con un sitio catalítico activo cada uno (sitio activo N-terminal y sitio activo C terminal), un dominio de anclaje transmembrana y una cola corta de carboxilo intracelular (Santeliz et al., 2008). La ECA testicular es una glicoproteína de 90 kDa que se encuentra exclusivamente en las células germinales de los testículos, se diferencia a la ECA somática en que sólo tiene un amino terminal en la región extracelular y por lo tanto tiene un sitio catalíticamente activo (Figura 5). La ECA plasmática se piensa que deriva de la segmentación proteolítica de la región C-terminal de la ECA somática desde la membrana celular y carece del dominio transmembrana en la porción intracelular; por lo tanto, la ECA soluble corresponde a la región extracelular de la ECA somática y contiene 2 sitios activos (Figura 5).

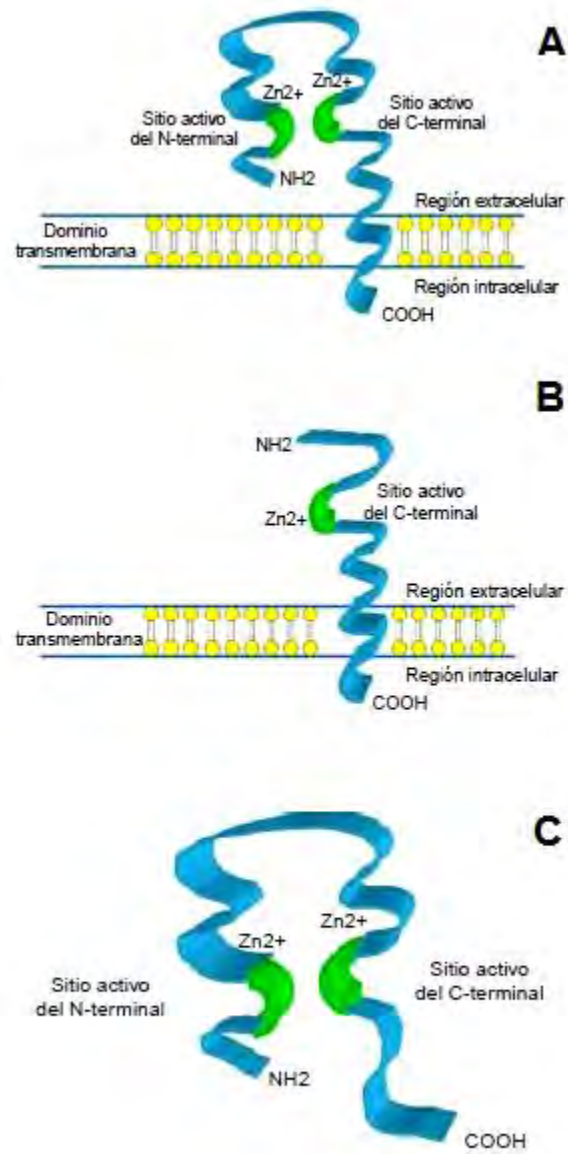


Figura 5. Isoformas principales de la ECA: somática, testicular o germinal y plasmática o soluble (Modificado de Santeliz et al., 2008).

1.9.3 Bradicinina (BK)

La bradicinina es una cinina regulada por el sistema calicreína-cinina, este sistema al ser activado libera cininas vasoactivas (Moreau et al., 2005). La BK es un nonapéptido de bajo peso molecular (1060.21 Da) el cual es rápidamente metabolizado por metaloproteasas endógenas, incluyendo la ECA ó cininasa II, endopeptidasa neutral (NEP o neprilisina), carboxipeptidasa N (CPN o cininasa I) y aminopeptidasa P. El tiempo de vida media de la BK en plasma es de aproximadamente 15 segundos y sus niveles de circulación son relativamente bajos (0.2-7.1 pM) (Moreau et al., 2005). La BK tiene efectos antihipertensivos, antitrombogénicos, antiproliferativos y antifibrogénicos. También participa en los procesos inflamatorios mediante la activación de células endoteliales para promover la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular, produciendo los síntomas clásicos de la inflamación, como enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor. La manera en que BK media sus efectos es al interactuar con sus receptores B₁ y B₂, estos receptores están acoplados a proteína G (GPCR), que interactúan a través de la vía las proteínas G $\alpha_{q/11}$ y G $\alpha_{i/o}$ y también a través de efectores intracelulares. Por ejemplo, la BK se une al receptor B₂ endotelial permitiendo la producción de NO, la formación de prostaciclina, la elevación de Ca²⁺ intracelular y la formación de factor hiperpolarizante, que desencadena vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular (Maurer et al., 2011).

1.9.4 Óxido Nítrico

El endotelio, localizado en la túnica íntima de los vasos sanguíneos (Cabrera, 2004), regula la función plaquetaria, el sistema de coagulación, modula el tono vascular, controla la proliferación de las células musculares lisas locales y recluta células sanguíneas. Uno de los productos más importantes que sintetiza el endotelio es el óxido nítrico (NO). El NO tiene una vida media ultracorta (seis milisegundos), es el principal responsable de mantener un estado de vasodilatación regulado (Duarte et al., 2008) su producción en el endotelio es inducido por sustancias vasoactivas como la BK, al activar la enzima óxido nítrico sintetasa constitutiva (eNOS) a partir de la L-arginina. La eNOS es una enzima calcio dependiente y mantiene el equilibrio fisiológico en los tejidos donde se libera

(Mena y Riverón, 1999). Después de que se forma el NO, se difunde a través del endotelio uniéndose principalmente al grupo Hemo de la guanilato ciclasa, favoreciendo la conversión de guanosintrifosfato (GTP) a guanosinmonofosfato (GMPc) que finalmente favorece la relajación vascular (Duarte et al., 2008) Además, de la regulación en la vasodilatación que ocasiona el NO, tiene otro tipo de funciones, tales como, regular la expresión de células musculares lisas vasculares, evitar la adhesión leucocitaria local, y tener un efecto antiagregante plaquetario (Duarte et al., 2008).

II. Justificación

Hoy en día el desarrollo y progresión de diabetes e hipertensión representan graves problemas de salud pública a nivel nacional, declarándose que México ocupa el primer lugar de casos de diabetes y obesidad sobre todo en niños (Danaei et al., 1980; Hermansen, 2000). Se sabe que estas enfermedades están relacionadas con los hábitos alimenticios (Hannah y Howard, 1994; Wang et al., 2008) y que una dieta saludable reduce el riesgo de padecerlas (Sirtori et al., 2009), por lo tanto, los productos nutraceuticos o funcionales representan una alternativa para mejorar el estado de salud y en consecuencia la calidad de vida del ser humano (Afman y Muller, 2008). Los péptidos encriptados en las proteínas de los alimentos son secuencias específicas de 2 a 10 aminoácidos que poseen importantes funciones biológicas por lo que su estudio se ha incrementado por su importante implicación en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la leche es una fuente importante de biopéptidos (Hartmann y Meisel, 2007), al igual que los granos de soya, amaranto y maíz (Vioque et al., 2000; Silva-Sánchez et al., 2008). El alpiste es un cereal que se emplea básicamente para la alimentación de pájaros, sin embargo debido a su alta calidad nutricional, es decir, un elevado contenido de aminoácidos esenciales, han derivado en el desarrollo de variedades libres de sílice que permite el consumo en humanos. A partir de ello, se han generado harinas que se encuentran en los supermercados como alimentos para tratar la diabetes e hipertensión pero no existen reportes científicos que indiquen cual o cuáles son los compuestos bioactivos presentes en este grano y que validen su uso como promotor de la salud. Por lo tanto, la finalidad de este trabajo fue caracterizar las proteínas de reserva de alpiste, digerir las proteínas para liberar los péptidos encriptados y evaluar los efectos antidiabéticos y antihipertensivos.

III. Objetivo

Caracterizar las proteínas de reserva de alpiste (*Phalaris canariensis* L.), liberar los péptidos activos empleando dos métodos de digestión proteolítica y evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los péptidos sobre la enzima DPPIV y la ECA, así como medir el efecto vasodilatador empleando un sistema de corazón aislado.

Objetivos específicos

- Establecer las condiciones para la extracción de proteínas de reserva de alpiste.
- Cuantificar las proteínas de reserva de alpiste.
- Obtener el perfil electroforético de las proteínas de alpiste.
- Determinar las condiciones de hidrólisis de las proteínas de alpiste para liberar péptidos activos.
- Caracterizar la actividad inhibitoria de los péptidos de alpiste sobre la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV).
- Caracterizar la actividad inhibitoria de los péptidos de alpiste sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA).
- Evaluar el efecto vasoactivo de los péptidos de alpiste mediante un sistema de corazón aislado y perfundido de rata (sistema de perfusión Langendorff).

IV. Materiales y Métodos

4.1 Material biológico

La semilla de alpiste comercial “Marabu” y la harina comercial “**mas Lait**” producto sanitizado libre de fibras de silica fueron comprados en mercados locales. Mas Lait es el producto comercial consumido para el tratamiento de hipertensión y diabetes. La semilla de alpiste se colocó en agua en una proporción 1:5 (p/v) toda la noche a temperatura ambiente, el agua de remojo fue eliminada y el grano se molió y el líquido resultante se consideró como “**leche de alpiste**”. El grano de alpiste se molió y la harina obtenida se tamizó a través de malla 80 y se nombro “**harina de alpiste**”. La harina de la semilla en remojo, se obtuvo poniendo la semilla en agua 1:5 (p/v) toda la noche a temperatura ambiente, posteriormente se dejó secar, se molió y se tamizó y se nombró “**harina de grano remojado**”.

4.2 Extracción de proteínas de reserva

Las proteínas de reserva fueron extraídas a partir de harina de las tres presentaciones (harina de alpiste, harina de grano remojado y de la harina “mas Lait”). Las proteínas se fraccionaron en base a su solubilidad (Osborne, 1909). La fracción de albúmina se obtuvo empleando agua destilada (1:10 p/v). Para la extracción de globulinas 7S la pastilla resultante se resuspendió en 0.1 M NaCl, 0.01 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5. La fracción de globulinas 11S se extrajo utilizando 0.8 M NaCl, 0.01 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.5. Las prolaminas se obtuvieron con etanol al 70% y finalmente las glutelinas con 0.1 M NaOH. La proteína total de las harinas fue extraída empleado 7.5 M urea, 63 mM CHAPS, 2.2 M Thiourea, 22 mM clorhidrato de tris, 17.3 mM trizma base, 0.25% (v/v) triton X-100, pH 3.1, se agitó empleando vortex y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.3 Cuantificación de proteínas y electroforesis SDS-PAGE (1-DE)

Para cuantificar las proteínas de reserva se utilizó el kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific). La concentración de péptidos en las digestión trípica y simulación gastrointestinal se determinó utilizando el kit Lowry-based DC protein

Assay (Bio Rad). Se empleó como estándar albúmina de suero bovino (BSA). La presencia de proteínas de reserva se visualizó con el método SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

4.4 Digestión triptica de proteínas de reserva

Para liberar los biopéptidos de las proteínas de reserva de alpiste (harina de alpiste, harina proveniente de la semilla remojada, harina comercial, y leche de alpiste liofilizada) se digirieron con tripsina de páncreas de cerdo, a una relación de enzima:sustrato 1:5 (p/p). La digestión se realizó utilizando 100 mM Tris pH 8 a 37 °C por 6 h, y la reacción se detuvo por congelación de la muestra. Para eliminar la tripsina, los digeridos de alpiste se ultrafiltraron empleando membranas de 10 kDa de peso molecular de corte.

4.5 Simulación de digestión gastrointestinal *in vitro*

La simulación gastrointestinal se logró utilizando el modelo *in vitro* sugerido por Wang et al. (2008) y Velarde-Salcedo et al. (2013). La harina (1 g) se resuspendió en 20 ml de 0.03 M NaCl, pH 2, y se calentaron a 80 °C por 5 min. Se enfriaron a temperatura ambiente, y se agregó pepsina de mucosa gástrica de cerdo en una relación 1:40 (p/p enzima: sustrato), las muestras se digirieron a pH y agitación constante por 3 h a 37 °C. Después el pH se ajustó a 7.5 y se agregó una mezcla de tripsina /pancreatina de páncreas de cerdo (1:1p/p) previamente disueltas en 0.1 N NaHCO₃ a una relación 1:5000 (p/p enzima: sustrato), y se incubó a pH constante por 3 h. La digestión se detuvo calentando las muestras a 75 °C por 20 min y se dejó enfriar y se centrifugó a 13000 rpm por 30 min. Para eliminar las enzimas usadas en la digestión, los digeridos se ultrafiltraron empleando centricones (Millipore) de 10 kDa de peso molecular de corte (MWCO).

4.6 Ensayo de actividad dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV)

Para evaluar la capacidad de inhibición de los péptidos de alpiste sobre la actividad de la enzima DPPIV se llevó a cabo el ensayo de actividad DPPIV *in vitro* utilizado por Velarde-Salcedo et al. (2013), se empleó el sustrato cromogénico Gly-pro-pNA a una concentración de 500 µM y 100 ng/ml de dipeptidyl peptidase IV aislada de riñón porcino y concentraciones crecientes de péptidos de alpiste de

las diferentes presentaciones. La reacción se llevó a cabo por 1 h a 37 °C y la absorbancia se leyó a 415 nm. Las muestras se leyeron por triplicado y se usó diprotin A (Ile-pro-Ile) como control positivo de inhibición.

4.7 Ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA)

La actividad inhibitoria de los péptidos de alpiste sobre la ECA se realizó mediante el ensayo descrito por Barba de la Rosa et al. (2010). La reacción se llevó a cabo a 37 °C por 30 min en 100 µl de buffer de fosfato de potasio 0.1 M (pH 8.3), 0.3 M NaCl y 5 mM hipuril histidil leucina, y se agregaron 25 µl de concentraciones crecientes de péptidos y 2 mU de la ECA. La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de 1 M HCl. El ácido hipúrico formado se extrajo con 1 ml de acetato de etilo, se evaporó y se disolvió en 1 ml de agua destilada y se midió espectrofotométricamente a 228 nm.

4.8 Bioensayo de corazón aislado y perfundido de rata (Sistema de perfusión de Langendorff)

Para evaluar el efecto vasoactivo de los biopéptidos de alpiste se empleó la preparación de Langendorff (Rubio y Ceballos, 2000; González et al., 2003; Riascos et al., 2004). Se utilizaron ratas macho Wistar (300-350 g) se anestesiaron con 50 mg/Kg de pentobarbital sódico intraperitoneal y 500 UI de heparina, se extirpó el corazón y se canuló a través de la aorta ascendente en el sistema de perfusión retrógrado (IsoHearth-SR Harvard Apparatus) y se mantuvo a una velocidad de flujo constante de 10 ml/min. El medio de perfusión fue la solución Krebs-Henseleit (Rubio y Ceballos, 2000) equilibrada con 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 °C. En este sistema se realizó la administración de bolos intracoronarios de concentraciones crecientes (0.01, 0.1 y 1 µg/ml) de péptidos de alpiste menores de 10 kDa. Como controles positivos se usó bradicidina (10 µM) y captopril (50 µM) y los negativos fueron la angiotensina I (1 µM) y la angiotensina II (1 µM).

4.9 Producción de óxido nítrico (NO) en el efluente venoso de corazones aislados

La concentración de NO como nitritos y nitratos se determinó por el método de Griess (Miranda et al., 2001). Se colectaron 100 μ l del efluente venoso proveniente de los corazones aislados con los tratamientos correspondientes antes mencionados y se incubaron 37° C por 30 min, en presencia de 80 μ l de cloruro de vanadio (VCl_3), se adicionaron de 20 μ l del reactivo de Griess (1% de sulfanilamida, 0.1% de naftiletiletildiamina en 2.5% de ácido fosfórico) y se registró la absorbancia a 540 nm, utilizando nitrato de sodio ($NaNO_3$) como estándar.

4.9.1 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el software Graphpad Prism 5, mediante el análisis de ANOVA de una vía, seguidos de la prueba de Tukey, para la comparación estadística entre las medias. Los resultados fueron replicados en tres experimentos independientes. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar (SE). Los resultados son considerados estadísticamente significativos con una $P < 0.05$.

V. Resultados y Discusión

5.1 Extracción y cuantificación de proteínas de reserva

Las proteínas de reserva de la harina de alpiste, harina de alpiste remojado y del producto “mas Lait” fueron extraídas y no se encontraron diferencias significativas entre la composición de las fracciones entre los tres productos analizados (Figura 6). Las albúminas en semillas de alpiste representan el 16% y las globulinas 7S y 11S el 6% cada una, mientras que la fracción mayoritaria fueron las prolaminas (37%) y las glutelinas (35%), estos valores son similares a lo reportado por Abdel-Al et al. (1997). A la fecha las proteínas de alpiste no han sido caracterizadas electroforéticamente, por lo tanto, procedimos a obtener este perfil.

5.2 Perfil electroforético de proteínas de reserva de alpiste

En la Figura 7 se muestra el perfil electroforético de las proteínas de reserva de alpiste. No hubo diferencias en este perfil cuando se analizaron las tres presentaciones (Figura suplementaria 1) por lo que presentamos el perfil de la harina de alpiste bajo condiciones desnaturalizantes. Las albúminas de alpiste mostraron bandas de 10, 15, 25 y 40 kDa, pesos moleculares similares a los componentes de albúmina de avena (14-17 kDa, 20-27 kDa y 36-47 kDa) (Klose et al. 2012). El perfil de globulinas 7S fue similar al de albúminas con la adición de una banda más a 30 kDa y una banda mayor a 40 kDa. Las globulinas 11S mostraron bandas de mayor peso molecular (40-70kDa). Las prolaminas mostraron al menos tres bandas, de peso molecular de 15, 20 y 25 kDa. Este perfil es parecido a los de las prolaminas de avena (17-34 kDa), prolaminas de cebada (15-20 kDa) y zeínas (prolaminas) de maíz (23- 24 kDa y de 26.5-27 kDa) (Shewry y Tatham, 1990; Shewry y Halford, 2002; Klose y Arendt, 2012). Las bandas principales de glutelinas fueron de 20, 30, 40 y 50 kDa, perfil parecido al de las glutelinas de cebada que muestran bandas de 35 kDa y de 42-46 kDa (Martínez et al., 1997). Estos resultados sugieren que el perfil electroforético de las proteínas de reserva de alpiste es característico de los cereales de la subfamilia pooidea, como la cebada y la avena y de cereales de la familia poaceae (gramínea) como el maíz.

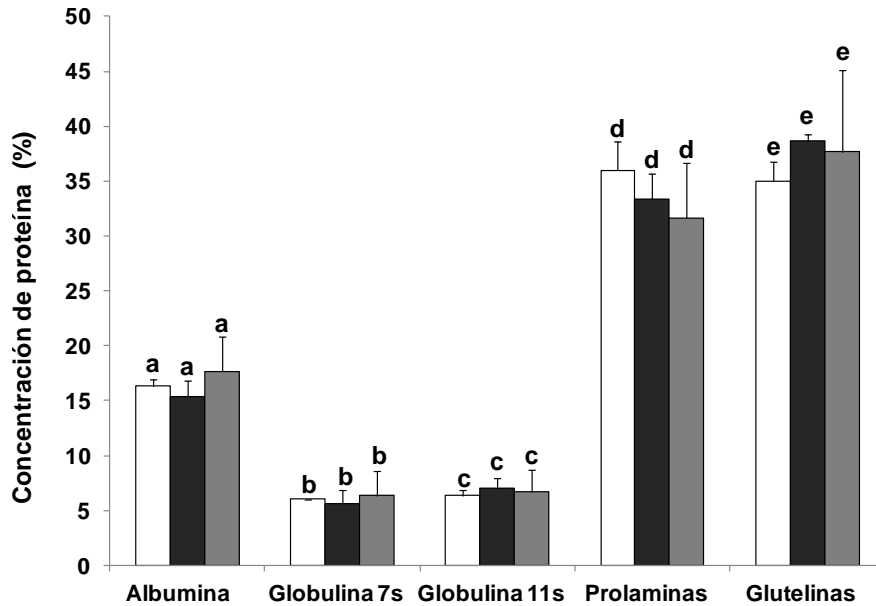


Figura 6. Proteínas de reserva de alpiste expresado en porcentaje (%). Se evaluaron tres presentaciones de alpiste, la harina de alpiste (barra blanco) la harina de la semilla remojada en agua (barra negra) y la harina comercial “mas Lait” (barra gris). En cada caso la barra corresponde al promedio de tres repeticiones indicando la desviación estándar. Mismas letras significa que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la misma fracción.

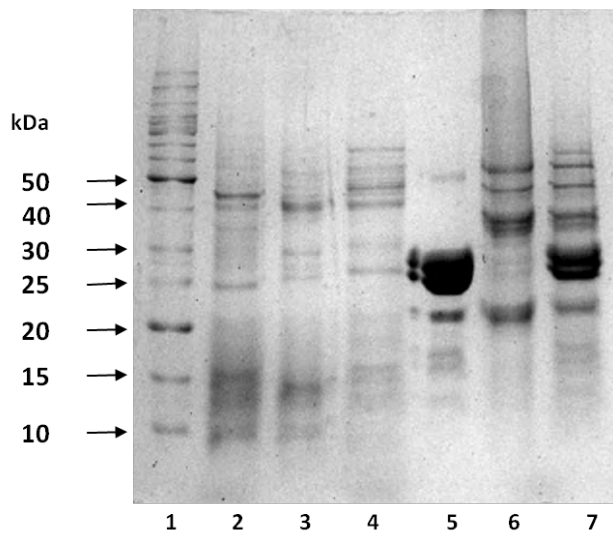


Figura 7. Perfil electroforético de proteínas de reserva de alpiste. Las proteínas de reserva de harina de alpiste fueron extraídas de acuerdo a su solubilidad: Carril 1= marcador de peso molecular, carril 2= albúminas solubles en agua, Carril 3= globulinas 7S solubles en solución salina 0.1 M NaCl, Carril 4= globulinas 11S solubles en 0.8 M NaCl, Carril 5= prolaminas solubles en etanol al 70%, Carril 6= glutelinas extraídas con 0.1 M NaOH, carril 7= proteína total. Las proteínas se separaron en geles de acrilamida al 12% bajo condiciones desnaturalizantes.

5.3 Liberación de péptidos encriptados por digestión enzimática *in vitro*

La digestión trípica *in vitro* (Figuras 8A) y la simulación gastrointestinal (Figura 8B) de las harinas de alpiste, harina de la semilla remojada, harina comercial y leche de alpiste mostraron el mismo patrón de digestión. Se observó que a las 6 h de digestión trípica desaparecen las bandas de mayor peso molecular quedando en su mayoría proteínas de alrededor de 10 kDa (Figura 8A). Para obtener los péptidos de bajo peso molecular, los digeridos se ultrafiltraron empleando membranas de 10 kDa de peso molecular de corte (Figura 8C).

5.4 Ensayo *in vitro* de inhibición de la actividad de la dipeptidilpeptidasa IV

Los péptidos de alpiste obtenidos por simulación gastrointestinal presentaron un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la actividad de la DPPIV, alcanzando un porcentaje de inhibición del 43.4%. El comportamiento fue similar entre las 4 presentaciones de alpiste (Figura 9). Las muestras sin digerir presentaron un efecto casi nulo de inhibición (9.3%), los digeridos trípticos (Figura suplementaria 2) obtuvieron un porcentaje de inhibición menor que el de los digeridos por simulación gastrointestinal (23%), lo cual de acuerdo con Vermeirssen et al., (2004) se obtienen péptidos con una mayor capacidad inhibitoria cuando son hidrolizados por la combinación de pepsina, tripsina, quimiotripsina y pancreatina. Estos resultados nos dieron la pauta para utilizar en los siguientes ensayos los péptidos obtenidos por simulación gastrointestinal. El control positivo de inhibición Diprotin A (Ile-pro-Ile) tuvo un IC_{50} de 2 μ g/ml, este valor fue similar a valores reportados en la literatura (Rituparna et al., 2011; Sudhanshu et al., 2012).

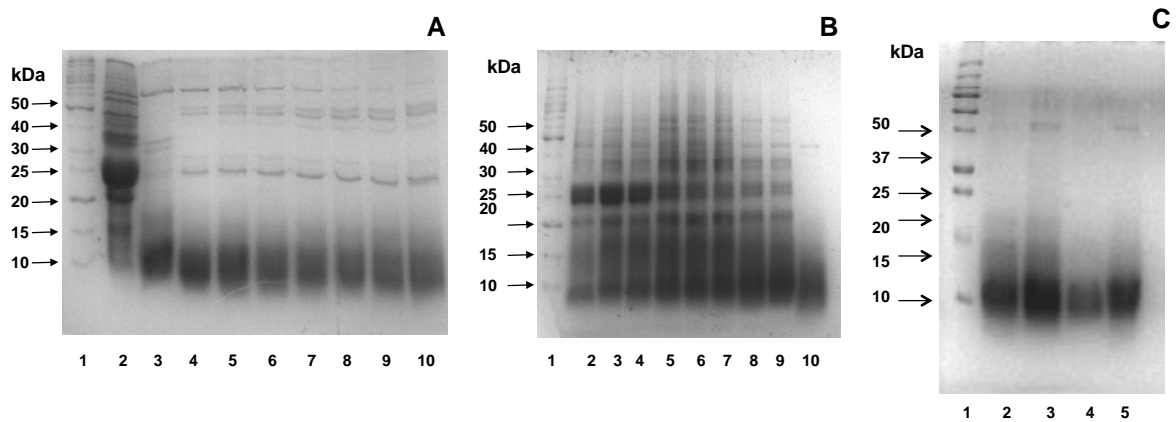


Figura 8. Perfil de digestiones in vitro de las proteínas totales extraídas de harina de alpiste. A) Digestión con tripsina, B) Digestión con el método de simulación gastrointestinal. Carril 1=marcador de peso molecular, carril 2=proteína nativa, carriles 3 a 10=digestiones a 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 h. C) Perfil de péptidos obtenidos después de 5 h por el método de simulación gastrointestinal y ultrafiltrados en centricones de 10 kDa de peso molecular de corte. Carril 1= marcador de peso molecular, Carriles 2-5=ultrafiltrados de los digeridos de: harina de alpiste, harina de la semilla remojada, harina comercial "mas Lait" y leche de alpiste, respectivamente.

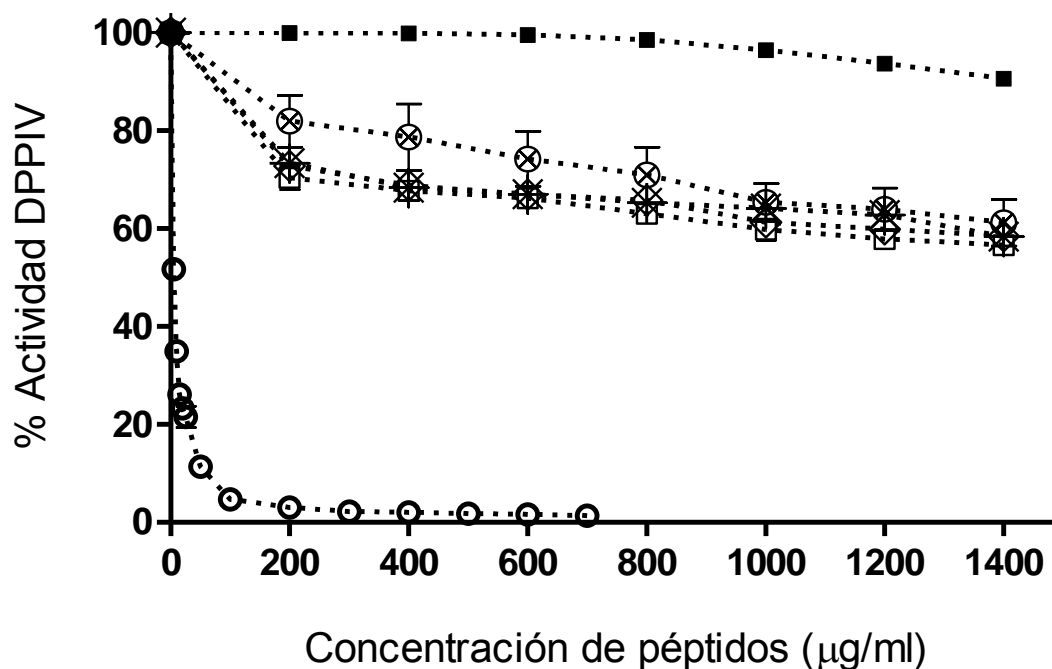


Figura 9. Actividad inhibitoria de los hidrolizados de proteínas de alpiste sobre la actividad de la DPPIV. Las proteínas de alpiste fueron digeridas mediante simulación gastrointestinal y los fragmentos menores de 10 kDa fueron obtenidos por ultrafiltración. Se midió el porcentaje de actividad de DPPIV en presencia de concentraciones crecientes de los hidrolizados de las 4 presentaciones de alpiste: leche de alpiste (◻), harina de alpiste (⊗), harina de semilla remojada (*), harina comercial (◇). Control negativo se emplearon las proteínas de alpiste sin digerir (■) y como control positivo de inhibición se empleó el Diprotin A (○). Los valores están expresados como la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

5.5 Ensayo *in vitro* de inhibición de la ECA

Para evaluar la posible capacidad antihipertensiva de los hidrolizados de proteínas de alpiste se evaluó la actividad inhibitoria de la ECA usando concentraciones de 0 a 600 µg/ml de los digeridos obtenidos por simulación gastrointestinal. La mayor inhibición alcanzada fue del 73.5% (Figura 10), porcentaje similar al reportado con los hidrolizados de suero de leche bovina (Pihlanto et al., 1998). El IC₅₀ de los hidrolizados de alpiste fue de 332 µg/ml, valor parecido al de los hidrolizados de garbanzo, lenteja (Barbana y Boye, 2010), soya (Tsai et al., 2006) gliadinas de trigo (Motoi y Kodama, 2003), gluten de trigo (Kodera y Nio, 2006) y músculo de sardina (Vercruyssen et al., 2005). Las 4 presentaciones de alpiste tuvieron la misma tendencia de inhibición. Las muestras sin digerir sólo alcanzaron una inhibición de 10.7 % a la concentración más alta. El captopril (CAPT), empleado como control positivo, mostró un valor IC₅₀ de 4.074 µg/ml, valor semejante a los valores reportados en la literatura para este compuesto (Hayes et al., 2007).

5.6 Evaluación del efecto vasodilatador de los péptidos de alpiste (Sistema de perfusión de Langendorff)

El efecto vasodilatador de los péptidos de alpiste se evaluó utilizando la técnica de corazón aislado y perfundido de rata o de Langendorff, en donde se pueden obtener parámetros tales como la presión de perfusión (PP) como un índice del tono vascular (vasodilatación/vasoconstricción), así como la presión ventricular izquierda como índice de la contractilidad cardiaca.

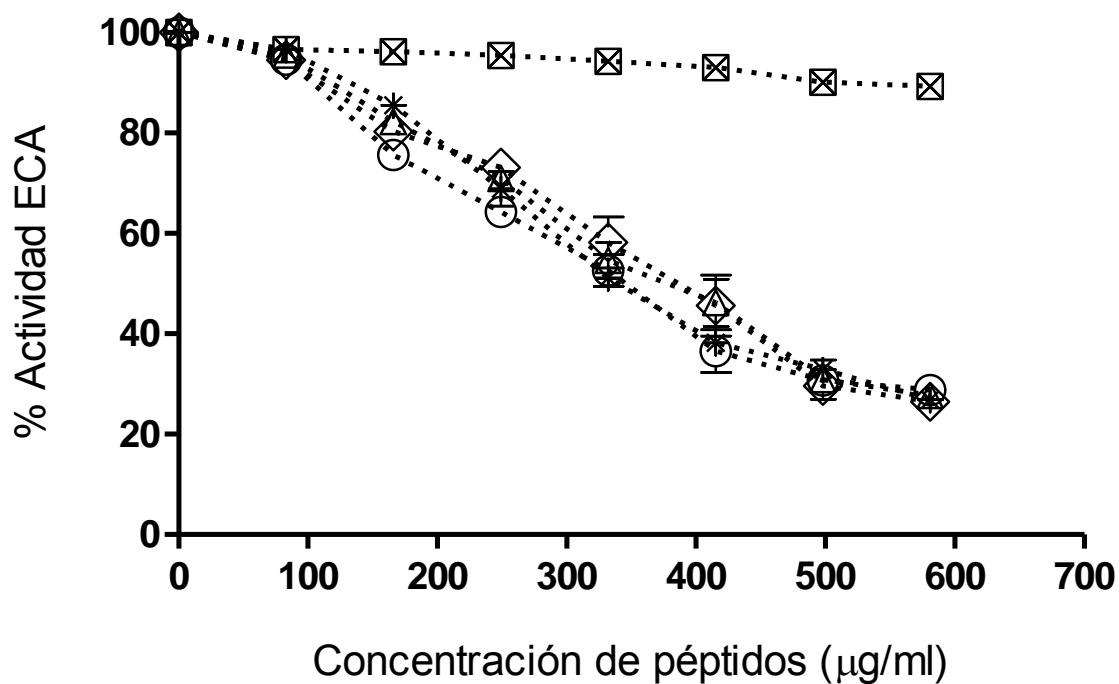


Figura 10. Actividad inhibitoria de los hidrolizados de proteínas de alpiste sobre la actividad de la ECA. Las proteínas de alpiste fueron digeridas mediante simulación gastrointestinal y los fragmentos menores de 10 kDa fueron obtenidos por ultrafiltración. Se midió el porcentaje de inhibición de concentraciones crecientes de los hidrolizados de las 4 presentaciones de alpiste: leche de alpiste (◇), harina de alpiste (○), harina de semilla remojada (*), harina comercial (△). Control negativo se emplearon las proteínas de alpiste sin digerir (□). Los valores están expresados como la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Se evaluaron tres concentraciones crecientes de péptidos de alpiste (ALP) menores de 10 kDa (0.01, 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$), observándose un efecto vasodilatador de manera dosis-dependiente, la mayor disminución de la presión se observó a 1 $\mu\text{g/ml}$ tal como la bradicinina (BK) a 10 μM , empleada como el control positivo (Figura 11A). Para evaluar la participación de los péptidos de alpiste como inhibidores de ECA se administró angiotensina I (ANGI) en presencia de captopril (CAPT) como controles negativos (Figura 11B) y ANGI en presencia de ALP (1 $\mu\text{g/ml}$), observándose que tanto CAPT (Figura 11B) como los péptidos de ALP contrarrestan el efecto vasoconstrictor inducido por la ANGI (Figura 11C). Se ha reportado que la ANGI causa vasoconstricción en sistemas biológicos en perfusión (Van et al., 1998; Nishimura et al., 1998; Wei et al., 1999) y es inhibida por inhibidores de la ECA (Coviello et al., 1993; Nishimura et al., 1998; Mauer et al., 2001; Oliveira et al., 2011), por esta razón, estos efectos vasoactivos en sistemas cardiovasculares permiten evaluar de manera indirecta las acciones vasoconstrictoras inducidas por la formación de la ANGII, cuando la ECA promueve la conversión de ANGI a ANGII, mayor agente constrictor en los vasos sanguíneos (Van et al., 1998). Se observó que la contractilidad cardíaca mostró un efecto semejante y en la misma magnitud que la PP (Figura 12). La vasodilatación por los péptidos ALP (1 $\mu\text{g/ml}$) fue de 82.7% comparado con el 100% de vasodilatación inducida por el CAPT (Figura 12A). En la Figura 12B se observa el porcentaje de vasoconstricción de ANGI (72%) y el de ANGII (100%), observándose que tanto el CAPT como los péptidos ALP bloquean por completo la vasoconstricción inducida por la ANGI, lo que sugiere que la ECA endógena, presente en los vasos coronarios de los corazones aislados y perfundidos de rata es inhibida por CAPT y los péptidos ALP impidiendo la conversión de ANGI a ANGII. Esto nos indica que los péptidos ALP son potenciales candidatos como inhibidores de la actividad de ECA (Figura 12B).

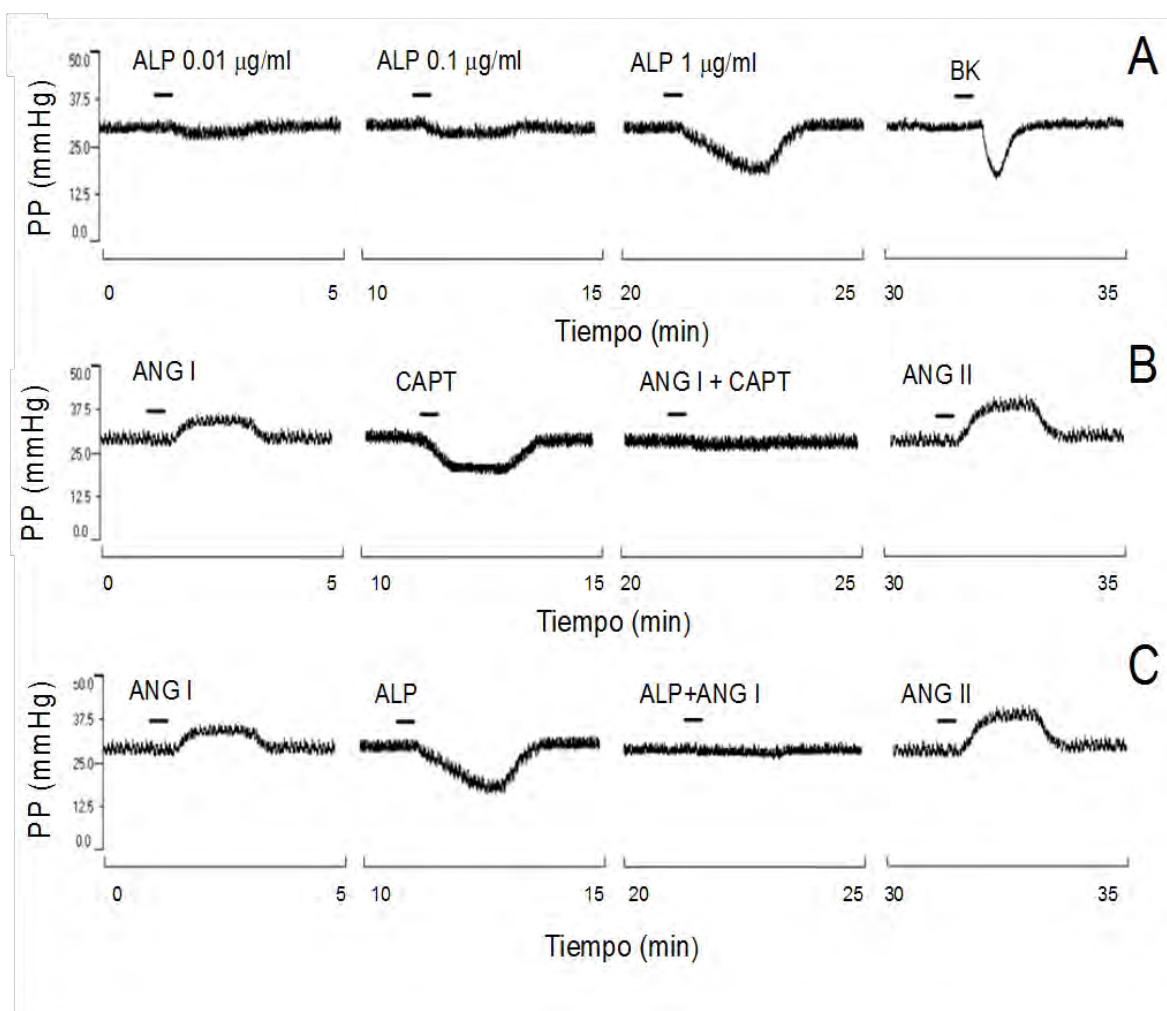


Figura 11. Efecto vasodilatador de péptidos de alpiste (ALP). Imagen representativa de 3 experimentos independientes. A) Efecto inducido por los péptidos ALP en concentraciones crecientes y empleando la bradicinina (BK) control positivo. B) Efecto inducido por los controles negativos angiotensina I (ANG I) y angiotensina II (ANGII) y el efecto del captopril (CAPT) en presencia de ANGI. C) Efecto de péptidos de ALP en presencia de ANGI.

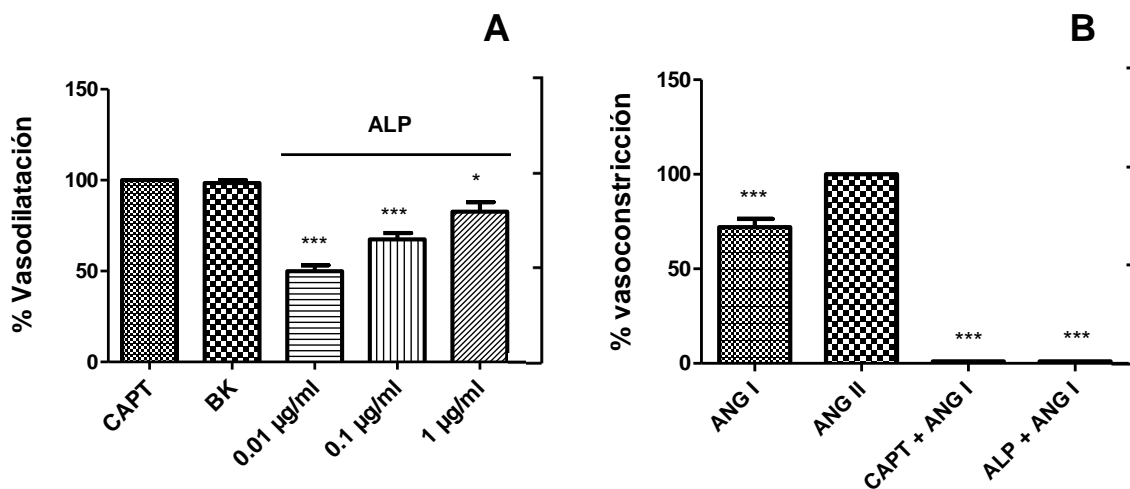


Figura 12. Porcentaje de vasodilatación y vasoconstricción ejercida por los péptidos de alpiste (ALP). A) porcentaje de vasodilatación de péptidos de alpiste (0.01, 0.1, 1 µg/ml) y de los controles positivos captopril (CAPT, 50µM) y bradicidina (BK, 10 µM). B) Porcentaje de vasoconstricción de CAPT en presencia de ANGI, los péptidos de ALP en presencia de ANGI y de los controles negativos (ANGI y ANGI). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los valores están expresados como la media ± el error estándar, los asteriscos muestran diferencias significativas a $P < 0.05$ vs. Control.

5.7 Producción de óxido nítrico (NO) en el efluente venoso de corazones aislados

Para determinar si el efecto vasodilatador de los péptidos del alpiste, era también asociado con la producción de NO, se determinó su producción en los efluentes venosos de corazón aislado y perfundido de rata de las muestras evaluadas. La mayor producción de NO fue de 12.24 μM , observada a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de los péptidos de alpiste (Figura 13). El valor de producción de NO con captopril fue 20.27 μM y de bradicidina (BK) de 19.24 μM . Esto sugiere una función importante de los hidrolizados de alpiste en la regulación del tono vascular. La BK ejerce su acción vasodilatadora, al estimular la producción de NO a través la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial de eNOS (óxido nítrico sintasa), el NO producido en la túnica íntima de los vasos sanguíneos difunde al músculo liso de estos, o bien a la célula cardíaca, bloqueando la liberación de calcio necesario para la contracción muscular, y por lo tanto se promueve un estado de relajación (González et al., 2004; Barba de la Rosa et al., 2010). Los inhibidores de la ECA, inducen vasodilatación, a través de favorecer la formación de BK (Barba de la Rosa et al., 2010). Por lo tanto, los péptidos de alpiste inhibidores de la ECA estimulan la producción de NO, por esta vía.

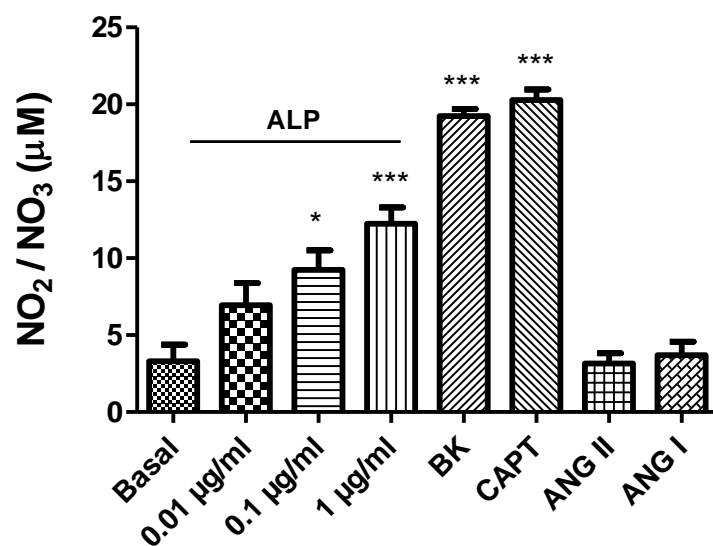


Figura 13. Estimulación de la producción de NO por los péptidos de alpiste. La producción de NO fue medida por la acumulación de NO₂/NO₃ en el efluente venoso de corazón de rata aislado y perfundido. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Los valores están expresados como el promedio ± el error estándar. Los asteriscos muestran medias estadísticamente significativas a $P < 0.05$. vs. Basal.

VI. Conclusiones

1. Las proteínas de reserva de alpiste tienen pesos moleculares característicos de los cereales de la subfamilia pooidea, como la cebada, y de cereales de la familia poaceae (gramínea) como el maíz.
2. Los péptidos menores a 10 kDa de alpiste tienen capacidad de inhibir *in vitro* la actividad de la enzima dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV).
3. Los péptidos de alpiste menores a 10 kDa tienen la capacidad de inhibir *in vitro* la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).
4. Los péptidos de alpiste tienen un efecto vasodilatador dosis-dependiente en un sistema de corazón aislado y perfundido de rata.
5. Los péptidos tipo inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECAi) estimulan la producción de óxido nítrico con la consecuente vasodilatación.
6. Estos resultados demuestran que el alpiste sirve como alimento funcional para el tratamiento y prevención de la diabetes e hipertensión, debido a la capacidad antidiabética y antihipertensiva de sus péptidos.

VII. Referencias

- Abdel-Aal, E-SM.; Hucl, P.; Sosulski, F. W. Characteristics of canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) Starch. *Starch/Stärke*. **1997**, 49, 475-480.
- Abdel-Aal, E-SM.; Hucl, P.J.; Patterson, C.A; Gray, D. Fractionation of hairless canary seed (*Phalaris canariensis*) into starch, protein, and oil. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 7046–7050.
- Abdel-Aal, E-SM.; Hucl, P.J.; Sosulski, F.W. Structural and compositional characteristics of canary seed (*Phalaris canariensis* L.). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3049-3055.
- Afman, L.; Muller, M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J. Am. Diet. Assoc.* **2006**, 106, 569-576.
- Argos, P.; Narayanal, S.V.L.; Nielsen, N. C. Structural similarity between leguminin and vicilin storage proteins from legumes, *EMBO J.* **1985**, 4, 1111-1117.
- Barba de la Rosa, A.P.; Barba, A., Martínez, P.; Hernández, B.; León, F.; De León, A.; González, C. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* **2010**, 23, 106–111.
- Barba de la Rosa, A.P.; Gueguen, J.; Paredes, O.; Virobent, G. Fractionation procedures, Electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 931-936.
- Barba de la Rosa, A.P.; Paredes-López, O.; Gueguen, J. Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 937-940.
- Barbana, C.; Boye, I. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of chickpea and pea protein hydrolysates. *Food Res. Intl.* **2010**, 43, 1642–1649.
- Barnett, A. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Ltd. Int. J. Clin. Pract.* **2006**, 60, 1454–1470.
- Bayón, C.; Barriga, M. A.; Litwak, L.; Incretins, incretinmimetics, inhibitors. *Rev. Argent. Endocrino. Metab.* **2010**, 47, 36-51.

- Cabrera, F. E. I. Biomecánica de la hipertensión arterial. *Rev. Argent. Cardiol.* **2004**, 72, 150-156.
- Cogliatti, M. Canaryseed Crop. *Sci. Agropecu.* **2012**, 1, 75 – 88.
- Coviello, A.; Soria, M.; Proto, M.; Peral de Bruno, M.; Berman, D.; Khosla, M.; Bumusf, F. Effects of angiotensin I of the american bullfrog *Rana Catesbeiana* on amphibian tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* **1993**, 104, 113-116.
- Danaei, G.; Finucane, M.; Lu, Y.; Singh, G.; Cowan, M.; Paciorek, C.; Lin, J.; Farzadfar, F.; Khang, Y.; Stevens, G.; Rao, M. K.; Ali, M.; Riley, L.; Robinson, C.; Ezzati, M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet.* **2011**, 378, 31–40.
- Duarte, M. J.; Espinosa, L. R. F.; Díaz, M. S.; Sánchez, R. G.; Lee-Eng, C. V. E.; Mijangos, C. J.; Barragán, G. J. A. Óxido nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. *Med. Int. Mex.* **2008**, 24, 397-406.
- Duranti, M.; Consonni, A.; Magni, C.; Sessa, F.; Scarafoni, A. The major proteins of lupin seed: characterization and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends. Food Sci. & Technol.* **2008**, 19, 624-633.
- Espitia, R. E.; Martínez, C. E.; Peña, B. R. J.; Villaseñor, M. H. E.; Huerta, E. J. Polimorphism of high molecular weight glutenins and its relationship with in rainfed bread wheat. *Agric. Tec. Mex.* **2008**, 34, 57-67.
- Fritz, M.; Vecchi, B.; Rinaldi, G.; Añón, M. Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem.* **2011**, 126, 878–884.
- Fukushima, D. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Rev. Int.* **1991**, 7, 353-381.
- Gamboa, A R. Physiopathology of Essential arterial hypertension. *Acta. Med. Per.* **2006**, 23, 76-82.

- Gonzalez, C.; Corbacho, A.; Eiserich, J.; Garcia, C.; López, F.; Morales, V.; Barajas, A.; Diaz, M.; Rubio, R.; Lin, H.; Martínez de la Escalera, G.; Clapp, C. 16K-Prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. **2004**, 145, 5714–5722.
- Gonzalez, C.; Rubio, R.; Zenteno, T. Coronary flow-induced inotropism is modulated by binding of dextrans to the endothelial luminal surface. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2003**, 284, 1348–1357.
- Hannah, J.; Howard, B. Dietary fats, insulin resistance, and diabetes. *J. Cardiovasc. Risk*. **1994**, 1, 31-37.
- Hartmann, R.; Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, 18, 163–169.
- Hayes, M.; Stanton, C.; Slattery, H.; Sullivan, O.; Hill, C.; Fitzgerald, G.; Ross, R. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 Contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme Inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 4658-4667.
- Hermansen, K. Diet, blood pressure and hypertension. *Br. J. Nutri.* **2000**, 83, 113–119.
- Jingzhao, L.; Båga, M.; Hucl, P.; Ravindra, N. C. Development of microsatellite markers in canary seed (*Phalaris canariensis* L.). *Mol. Breed.* **2011**, 28, 611–62.
- Klose, C.; Arendt, E. Proteins in Oats; their synthesis and changes during germination: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **2012**, 52, 629–639.
- Kodera, T.; Nio, N. Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a Soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. *J. Food Sci.* **2006**, 71,164-173., H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J. Funct. Foods.* **2009**, 1, 177–187.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **1970**, 227, 680-685.

- Lamberts, R.; Van, R.; Sipkema, P.; Fransen, P.; Sys, U.; Westerhof, N. Increased coronary perfusion augments cardiac contractility in the rat through stretch-activated ion channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2002**, 282, 1334–1340.
- Lara, A.; Rosas, M.; Pastelín, G.; Aguilar, C.; Attie, F.; Velázquez, M. Hipercolesterolemia e hipertensión arterial en México. Consolidación urbana actual con obesidad, diabetes y tabaquismo. *Arch. Cardiol. Mex.* **2004**, 74, 231-245.
- Li-Chan, E. C. Y.; Hunag, S. L.; Jao, C. L.; Ho, K.P.; Hsu, K. C. Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *J.Agric.Food Chem.* **2012**, 60, 973–978.
- Li, J.; Båga, M.; Hucl, P.; Ravindra, R. N. Development of microsatellite markers in canary seed (*Phalaris canariensis* L.). *Mol. Breeding.* **2011**, 28, 611–621.
- Mandal, S.; Mandal, R. K. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering. *Curr. Sci.* **2000**, 79, 576-589.
- Martínez, A. O.; Martínez, de V. M. E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* **2006**, 21, 1-14.
- Martínez, B. C.; Dipeptidil carboxipeptidasa. *Quím. Clín.* **1992**, 11, 8-16.
- Martínez, N.; Castellani, O.; Añón, M. Common molecular features among Amaranth storage proteins. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3832-3839.
- Matteucci, E.; Giampietro, O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 2943-2951.
- Mauer, K.; Exaire, J.; Escalante, B. Importance of angiotensin converting enzyme in coronary circulation. *Arch. Cardiol. Mex.* **2001**, 71, 278-285.
- Maurer, M.; Bader, M.; Bas, M.; Bossi, F.; Cicardi, M.; Cugno, M.; Howarth, P.; Kaplan, A.; Kojda, G.; Leeb-Lundberg, F.; Lo-tvall, J.; Magerl, M. New topics in bradykinin research. *Allergy*, **2011**, 66, 1397–1406.
- Mena, M. V. R.; Riverón, C. R. L. Óxido nítrico/Sepsis. Controversias en su metabolismo, funciones y utilización. *Rev. Cuba. Pediatr.* **1999**, 71, 238-44.

- Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory Peptides. *Regul. Pept.* **1999**, 85, 9–24.
- Miranda, K.M; Espey, M.G; Wink, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* **2001**, 5, 62-71.
- Moreau, M. E.; Garbacki, N.; Molinaro, G.; Brown, N. J.; Marceau, F.; Adam, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, 99, 6–38.
- Motoi, H.; Kodama, T. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung/Food.* **2003**, 47, 354–358.
- Newkirk, R. W.; Ram, J. I.; Hucl, P.; Patterson, C. A.; Classen, H. L. A study of nutrient digestibility and growth performance of broiler chicks fed hairy and hairless canary seed (*Phalaris canariensis* L.) products. *Poult. Sci.* **2011**, 90, 2782–2789.
- Nishimura, H.; Buikema, H.; Baltau, O.; Ganten, D.; Urata, H. Functional evidence for alternative ANG II-forming pathways in hamster cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **1998**, 275, 1307-1312.
- Oliveira de Oliveira, U.; Reischak de Oliveira, Á.; Kucharski, L.; Fabres, U.; Irigoyen, M.; D'Agord, B. Efectos de la angiotensina-I e isquemia en la recuperación funcional en corazones aislados. *Arq. Bras. Cardiol.* **2011**, 97, 390-396.
- Oropesa-Fernández, C. M.; Gallego-Fernández, C. Utilidad terapéutica de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Farm. Hosp.* **1995**, 19, 3-9.
- Osborne, T. Solubility of vegetable proteins. In *The Vegetable Proteins*, edition 2nd.; Longmans, G., Eds.; Publisher: London; New York, **1909**; Vol. 1., pp 30-33.
- Passos, S.C.; Carvalho, L.N.; Pontes, R.B.; Campos, R.R.; Ikuta, O.; Boim, M.A. Blood pressure reducing effects of *Phalaris canariensis* in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2012**, 90, 201-208.

- Pérez, F. Epidemiology and Physiopathology of Diabetes Mellitus Type 2. *Rev. Med. Clin. Condes* . **2009**, 20, 565 – 571.
- Pihlanto, A.; Rokka, T.; Korhonen, H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy Journal*. **1998**, 8, 325-331.
- Riascos, B.; Baltaxe, E.; Pascual, G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Universitas Médica*. **2004**, 45, 111-117.
- Rituparna, C.; Singh, B.; Prakrith, N.; Nimisha, V.; Lalthanzama, V.; Mohamed, H.; Kavitha, T. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of *Berberis aristata*. *J. Nat. Prod*. **2011**, 4, 158-163.
- Rosas, P. M. La hipertensión arterial en México y su relación con otros factores de riesgo. *Arch. Cardiol. Mex*. **2003**, 73, 137-140.
- Rowe, F. P.; Bradfield, A.; Redfern, R. Food preferences of wild house-mice (*Mus musculus* L.). *J. Hyg. Camb*. **1974**, 73, 473-478.
- Rubio, R.; Ceballos, G. Role of the endothelial glycocalyx in dromotropic, inotropic, and arrhythmogenic effects of coronary flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. **2000**, 278, 106–116.
- Rutherford, M. K. J.; Moughan, P. J. Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Int*. **2005**, 88, 955-966.
- Santeliz, C. H.; Romano, E. L.; González, C. A.; Hernández y Hernández, H. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev. Mex. Cardiol*. **2008**, 19, 21-29.
- Shewry, P.; Halford, N. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot*. **2002**, 53, 947-958.
- Shewry, P. R.; Napier, J. A.; Tatham, A. S.; Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant. Cell*. **1995**, 7, 945-956.
- Shewry, P.; Tatham, A. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J*. **1990**, 267, 1-12.
- Sirtori, C., Galli, C., Anderson, J., Arnoldi, A. Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*. **2009**, 203, 8–17.

- Silva, S.C.; Barba de la Rosa, A.P.; León Galván, M.F.; De Lumen, B. O.; De León, R.A.; González de Mejía, E. Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 1233–1240.
- Sudhanshu, B.; Neeraj, S.; Amit, K.; Sudhir, J.; Supriya, K.; Ashok, G.; Ashis, G.; Om, P. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of seed extract of *Castanospermum australe* and molecular docking of their Alkaloids. *Topcls. J. Herbal Med.* **2012**, 1, 029-035.
- Tan, Z.; Shahidi, F. A novel chemoenzymatic synthesis of phytosteryl caffeates and assessment of their antioxidant activity. *Food Chem.* **2012**, 133, 1427–143.
- Takagi, T.; Iida, T. Antioxidant for fats and oils from canary seed: sterol and triterpene alcohol esters of caffeic acid. *JAOCS.* **1980**, 57, 327-330.
- Teschemacher, H.; Koch, G.; Brantl, V. Milk protein-derived opioid receptor ligands. *Biopoly.* **1997**, 43, 99-117.
- Thacker, P. A. Performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs fed diets containing graded levels of canaryseed. *Can. J. Anim. Sci.* **2003**, 83, 89–93.
- Tsai, S.; Lin, Y.; Pan, S.; Chen, J. Antihypertensive peptides and α -aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk. *Process Biochem.* **2006**, 41, 1282–1288.
- Uchida, M.; Ohshiba, Y.; Mogami, O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -Lactoglobulin. *J. Pharmacol. Sci.* **2011**, 117, 63–66.
- Van, J.; Danser, J.; Van, M.; Jan, R.; Sassen, L.; Verdouw, P.; Schalekamp, M. Angiotensin production by the heart a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circ.* **1998**, 98, 73-81.
- Velarde, S.A.; Barrera, P.A.; Lara, G.S.; Montero, M.G.; Díaz, G.A.; González de Mejía, E.; Barba de la Rosa, A.P. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem.* **2013**, 136, 758–764.

- Vercruyssen, L.; Camp, J. V.; Smagghe, G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 8106-8115.
- Vermeirssen, V.; Camp, J. V.; Verstraete, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nut.* **2004**, 92, 357–366.
- Vioque, J.; Vioque, S. R.; Clemente, A.; Pedroche, J.; Yust, M.; Millán, F. Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites.* **2000**, 51, 361-365.
- Wagner-Grau, P. Pathophysiology of arterial hypertension. *An. Fac. med.* **2010**, 71, 225-229.
- Wang, L.; Manson, J. E.; Buring, J. E.; Lee, I-M.; Sesso, H. D. Dietary intake of dairy products, calcium, and vitamin D and the risk of hypertension in middle-aged and older women. *Hypertension.* **2008**, 51, 1073-1079.
- Wang, W.; Bringe, N. A.; Berhow, M. A.; Gonzalez de Mejia, E. β -conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 4012–4020.
- Ward, J. L.; Poutanen, K.; Gebruers, K.; Piironen, V.; Maija, L. A.; Nystro, M. L.; Andersson, A. A. M.; Åman, P.; Boros D.; Rakszegi, M.; Bedo, Z.; Shewry, P. R. The healthgrain cereal diversity screen: concept, results, and prospects. *J. Agric. Food. Chem.* **2008**, 56, 9699–9709.
- Wei, C.C.; Meng, C.; Palmer, R.; Hageman, G.; Durand, J.; Bradley, E.; Farrell, D.; Hankes, G.; Oparil, S.; Dell’Italia, L. Evidence for angiotensin converting enzyme and chymase-mediated angiotensin II Formation in the Interstitial Fluid Space of the Dog Heart In Vivo. *Circ.* **1999**, 99, 2583-2589.
- Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **2007**, 24, 115-119.

VIII. Anexos

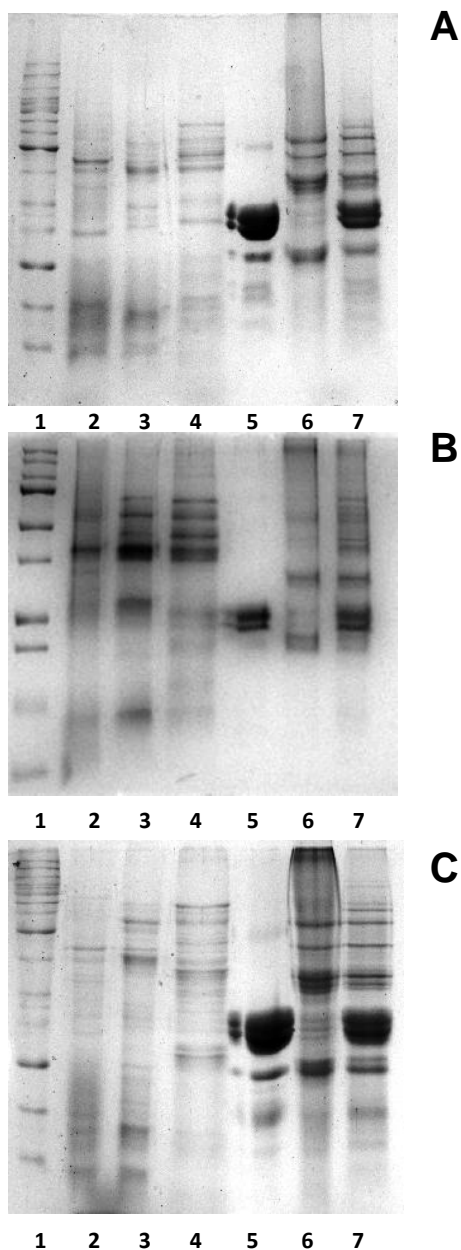


Figura suplementaria 1. Perfil electroforético de proteínas de reserva de alpiste. A) Harina de la semilla de alpiste, B) harina de la semilla remojada, C) harina comercial "mas Lait". Las proteínas de reserva de harina de alpiste fueron extraídas de acuerdo a su solubilidad: Carril 1= marcador de peso molecular, carril 2= albúminas solubles en agua, Carril 3= globulinas 7S solubles en solución salina 0.1 M NaCl, Carril 4= globulinas 11S solubles en 0.8 M NaCl, Carril 5= prolaminas solubles en etanol al 70%, Carril 6= glutelinas extraídas con 0.1 M NaOH, carril 7= proteína total. Las proteínas se separaron en geles de acrilamida al 12% bajo condiciones desnaturizantes.

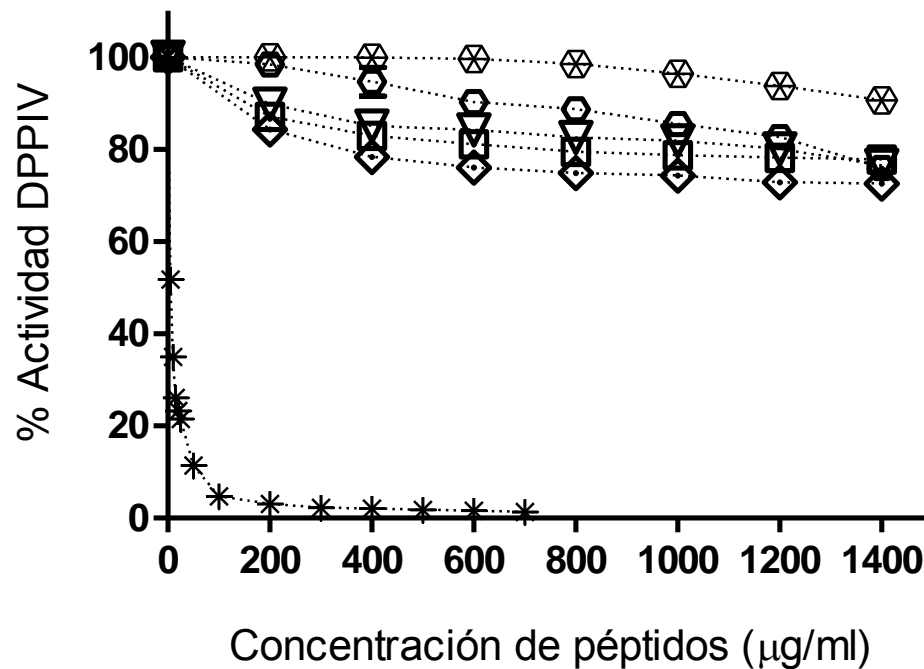


Figura suplementaria 2. Actividad inhibitoria de los hidrolizados trípticos de proteínas de alpiste sobre la actividad de la DPPIV. Las proteínas de alpiste fueron digeridas mediante simulación gastrointestinal y los fragmentos menores de 10 kDa fueron obtenidos por ultrafiltración. Se midió el porcentaje de actividad de DPPIV en presencia de concentraciones crecientes de los hidrolizados de las 4 presentaciones de alpiste: leche de alpiste (◊), harina de alpiste (◻), harina de semilla remojada (▽), harina comercial (◇). Control negativo se emplearon las proteínas de alpiste sin digerir (⊕) y como control positivo de inhibición se empleó el Diprotin A (∗). Los valores están expresados como la media de tres repeticiones ± la desviación estándar.