

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS A PARTIR DE HIDROLIZADOS PROTEICOS DE LA NUEZ (*Carya illinoensis*): ANALISIS *in silico* E *in vitro*

Mares-Mares, E.^a, Del Rincon Castro M. C.^a, Ordoñez Acevedo L.G.^b y León-Galván, M. F.^{a,*}.

^a Departamento de Alimentos-Posgrado Biociencias, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca de la Universidad de Guanajuato. Carr. Irapuato-Silao km 9.0 Ex-Hacienda El Copal. C.P. 36500. Irapuato, Gto. México.

^b Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV). Departamento de Bioquímica. Libramiento Norte Carr. Irapuato-León Km 9.6. C.P.36821. Irapuato, Gto. *fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

Actualmente existe un interés en alimentos que además de nutrir tengan propiedades funcionales capaces de prevenir el padecimiento de enfermedades crónicas. Algunas de estas propiedades son atribuidas al contenido de proteínas. La nuez (*Carya illinoensis*) brinda un equilibrado aporte de grasas (65%) y es una buena fuente de proteína (9-13%). En el presente trabajo se realizó la identificación de péptidos *in silico* en la nuez usando las plataformas de NCBI y BIOPEP. Se obtuvieron las fracciones proteicas (Albuminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas) de acuerdo a su solubilidad, se analizó el contenido de aminoácidos (RP-HPLC), fueron digeridas con tripsina, y se sometieron a espectroscopia de masas-masas para identificar péptidos antihipertensivos. Para la fracción con mayor cantidad péptidos se evaluó la actividad inhibitoria de la ECA-I. El analisis de aminoácidos indico que la nuez es deficiente en metionina. Los resultados del analisis *in silico* de 6 secuencias reportadas, mostraron 11 actividades biológicas, de las cuales, la antihipertensiva es la principal con un valor de frecuencia de ocurrencia de 0.2045. En el analisis de masas-masas se encontraron 9 péptidos con actividad antihipertensiva encriptados en la fracción de las glutelinas. La máxima inhibición de la ECA fue del 81.75% con 500 µg/mL de digeridos.

ABSTRACT:

There is a currently interest in foods that, further to nourish, also possess functional properties that prevent chronic diseases. Some of these properties are attributed to protein content. The nut (pecan) provides balanced intake of fats (65%) and is a good source of protein (13.9%). In this paper "*in silico*" identification of nut's peptides was done, using NCBI and BIOPEP platforms. The protein fractions (according to their solubility): albumins, globulins, prolamins and glutelins, were obtained. The amino acid content (RP-HPLC) was analyzed and the protein fractions were digested with trypsin and subjected to mass spectroscopy-mass to identify antihypertensive peptides. For the majority protein fraction, the inhibitory activity ACE - I was evaluated. Amino acid analysis indicated that the nut is deficient in methionine. The results of "*in silico*" analysis reported 6 sequences showing 11 biological activities, being the antihypertensive the principal of them with a frequency of occurrence of 0.2045. In the glutelins fraction, were found 9 encrypted peptides in the mass-mass analysis. The maximum ACE inhibition was 81.75 % with 500 mg / mL of digested.

Palabras clave:

Nuez (*carya illinoensis*), Péptidos, Antihipertensivos

Keyword:

Nut (*carya illinoensis*), Peptides, Antihypertensive

Área: Cereales, Leguminosas y Oleaginosas; Nutrición y nutracéuticos

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha presentado un creciente interés en el mejoramiento de la dieta y el estilo de vida como una estrategia para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de cáncer. En este sentido, la ciencia de los alimentos está promoviendo un nuevo concepto de nutrición y de diseño del alimento, el cual consiste en el desarrollo de productos alimenticios con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. Muchas proteínas de la dieta pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en el cuerpo humano, ya que poseen propiedades biológicas que hacen a estos componentes, ingredientes potenciales por su bioactividad o como alimentos promotores de la salud (Torruco et al., 2008). Tales alimentos son denominados como alimentos funcionales o nutraceuticos. Los componentes de los alimentos que funcionan como nutraceuticos tienen potencial bajo como compuestos bioactivos si son comparados con fármacos, pero, dado que son ingeridos regularmente en cantidades significativas como parte de la dieta, pueden presentar un efecto fisiológico a largo plazo perceptible (Espin et al., 2007).

Los mecanismos mediante los cuales las proteínas pueden exhibir sus efectos benéficos incluyen un incremento en la ingesta de aminoácidos biológicamente activos o péptidos bioactivos (Appel, 2003; Elliot, 2003). La hidrólisis enzimática de las proteínas vegetales es el bioproceso que incrementa las propiedades químicas y funcionales de la proteína original sin perjudicar su valor nutritivo. Esta es la forma más común para la obtención de péptidos bioactivos (Conde et al., 2009).

Una alternativa para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión arterial es el uso de componentes bioactivos obtenidos de fuentes naturales (animal o vegetal) tales como los péptidos antihipertensivos, ya que estos pueden reducir la presión arterial en el organismo, mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) la cual es la responsable que se altere la presión sanguínea en el organismo. (Torruco et al., 2008). Comparados con los fármacos inhibidores de la ECA, los péptidos derivados de alimentos tienen ciertas ventajas, ya que, aunque tienen una actividad inhibitoria menor *in vitro* que los fármacos (FitzGerald y Meisel, 2000), no tienen los efectos secundarios dañinos, tales como tos seca, vértigo, dolor de cabeza, sabor anormal (metálico o salado), problemas de riñones e hígado y angioedema, además de que representan un costo más bajo de la salud (FitzGerald y Meisel, 2000).

Los problemas actuales de salud pública en México y en el mundo, han llevado a la investigación de nuevas alternativas para la prevención o en su caso tratamiento de las enfermedades más frecuentes como son la hipertensión. Por tanto el objetivo de este trabajo es predecir, identificar y caracterizar péptidos con actividad antihipertensiva en proteínas de reserva de la nuez (*Carya illinoensis*) y evaluar su actividad antihipertensiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Predicción *in silico* de péptidos. Se realizó una búsqueda de secuencias de proteínas relacionadas con la nuez en Blast-Protein de NCBI, cada una se analizó en la plataforma BIOPEP para la predicción de la actividad biológica, determinando la frecuencia de ocurrencia, valor que indica la probabilidad de encontrar un péptido bioactivos en una secuencia.

Obtención de proteínas de reserva e hidrolizados trípticos. Se realizó la extracción secuencial de proteínas; a partir de harina desengrasada de nuez se diluyeron con un solvente específico para cada fracción en una relación harina/solvente (1:10 p/v) en agitación magnética por 1h a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Para Albuminas en agua, Globulinas 7S en NaCl al 0.1M, 11S en NaCl al 0.8M, Prolaminas en alcohol al 70% y Glutelinas en NaOH al 0.1M. Las fracciones se sometieron a digestión con tripsina en una relación 1:50 (p/p, tripsina: proteína) por 16 horas a 37°C.

Caracterización de Aminoácidos. La determinación de aminoácidos se realizó mediante cromatografía de líquidos de fase reversa (RP-HPLC) con el kit AccQ-Tag (Waters) para el análisis de aminoácidos esenciales. Se emplearon 200 µL de cada fracción soluble de proteína de nuez. Las muestras se derivaron con el reactivo AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate). El análisis se realizó aplicando 5µL de muestra a la columna. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Identificación de péptidos (Espectroscopia de masas). Las fracciones digeridas se analizaron en un sistema SYNAP-NanoUPLC (Waters Co.). Los péptidos fueron identificados utilizando MASCOT y BIOPEP.

Evaluación de la Actividad Antihipertensiva. Ensayo de Inhibición de la ECA-I. La determinación de actividad inhibitoria de ECA de los digeridos trípticos de la fracción más importantes en la nuez se realizó según lo reportado por Cushman y Cheung (1971). Se agregaron 15 µL de digeridos trípticos (diferentes concentraciones 1-1000 µg/mL) a un buffer de fosfatos [(0.3 M NaCl, 0.2 M K₂HPO₄ y 10 mM de Hip-His-Leu, pH 8.3) (Sigma)]. A esta mezcla se le agregaron 25 µL de ACE (5 mU) (Sigma) y se incubó a 37°C en baño María por 80 minutos. La reacción se detuvo con HCl 1N. El ácido hipúrico producido en la reacción se extrajo con acetato de etilo; finalmente el ácido hipúrico se disolvió en agua. La determinación se realizó a 228nm de longitud de onda. La actividad de estas muestras se midió por triplicado. Como control de inhibición de ECA, solo se midió la actividad inhibitoria de captopril a las mismas concentraciones. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} * 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Predicción in silico de péptidos. En el análisis in silico se encontró 6 secuencias de aminoácidos asociadas a proteínas de reserva y 11 actividades biológicas comunes en la predicción de péptidos. La antihipertensiva es la principal con un valor de frecuencia de ocurrencia de 0.2045 (Figura 1). El análisis bioinformático mostró que los péptidos antihipertensivos y antioxidantes tenían la mayor frecuencia y se encontraban en las proteínas de reserva de la nuez. Los valores de ocurrencia A más alta para la actividad antihipertensiva se presentan en las proteína: 1. Glutelina (0.2045), 5. Albumina (0.18) y 6. Globulina 7S (0.1706), estas proteínas presentan un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-I (ECA). La enzima conocida como enzima convertidora de la angiotensina (ECA; peptidildipéptido hidrolasa, EC 3.4.15.1) juega un papel importante en la regulación de la

presión sanguínea en mamíferos, catalizando la conversión de la angiotensina I (un deca péptido) en el potente vasoconstrictor angiotensina II (un octapéptido), y al mismo tiempo inactivando al vasodilatador bradykinina (Wang y Gonzalez, 2005). Comparando estos valores con las prolaminas (α/β Gliadinas) del trigo y con las globulinas 7S de la soya que van de 0.06 a 0.08 (Silva, 2007), resultan superiores, por lo que la nuez se puede considerar como una excelente fuente natural de péptidos antihipertensivos. Glicina, leucina, alanina y tirosina son aminoácidos que conforman la mayoría de estos péptidos cuya conformación son dos residuos de aminoácidos (dipeptidos).

Análisis de Aminoácidos. La composición de aminoácidos determina las principales propiedades físicas y químicas de las proteínas como lo son punto isoeléctrico, solubilidad y calidad nutricional. Más aún, la composición de aminoácidos influencia las propiedades funcionales como espumado, capacidad de absorción de agua y aceite, emulsificación, entre otras (Badui, 2006). La Tabla 1 muestra la composición de aminoácidos esenciales de las diferentes fracciones de las proteínas de reserva de nuez obtenidas en este estudio. Los aminoácidos esenciales con mayor contenido fueron leucina y treonina, estos aminoácidos coinciden con los reportados por la SAGARPA, 2010. Entre las fracciones con mayor balance de aminoácidos fueron Albuminas y Glutelinas que tuvieron una composición similar según lo reportado por la FAO, 1981. El aminoácido limitante por tanto es la metionina en nuez.

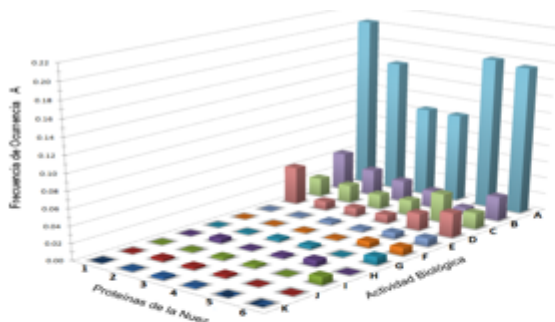


Figura 1 Predicción de péptidos con actividad potencial biológica en proteínas de reserva de la nuez. Proteínas de la Nuez: 1. Glutelina (44aa, 1998), 2. Globulina 11S "Legumina" (505aa, 2011), 3. Globulina 7S "Vicilina" (784aa, 2008), 4. Globulina 7S "Vicilina" (792aa, 2008), 5. "Supuesto Alergeno" en Albuminas (143aa, 2003), 6. "Supuesto Alergeno" en Globulinas 7S (102aa, 2006). Actividad Biológica: A) Antihipertensivo, B) Antioxidante, C) Inhibidor de Proteasas, D) Estimulante, E) Regulador Metabólico, F) Neuropeptido, G) Antitrombotico, H) Hipotensivo, I) Antiamnésico, J) Activación de proteólisis mediada por ubiquitina (AUMP) y K) Inmunomodulante.

Tabla 1. Composición de Aminoácidos esenciales de las fracciones proteicas.

Aminoácido Esencial (mg/g Proteína)	Harina de nuez	Fracción				Patrón de la FAO	
		ALB	GLB	PRL	GLT	Niños 2-5 Años	Adultos
Leucina	63.5	10.5	10.0	30.0	38.0	66	19
Isoleucina	35.5	38.0	20.0	30.0	40.0	28	13
Lisina	38.5	40.0	6.0	40.0	20.0	58	16
Metionina – Cisteína	12.0	0.0	1.0	3.0	38.0	25	17
Fenilalanina – Tirosina	43.0	16.0	41.0	13.0	17.0	63	19
Treonina	38.2	66.0	19.0	17.0	54.0	34	9
Valina	42.3	40.0	0.0	30.0	30.0	35	13
Triptófano	nd	nd	nd	nd	nd	11	5
Histidina	nd	nd	nd	nd	nd	19	16

ALB = Albuminas GLB 11S = Globulinas 11S, PRL= Prolaminas, GLT = Glutelinas. nd No determinado

ALB = Albuminas GLB 11S = Globulinas 11S, PRL= Prolaminas, GLT = Glutelinas. nd No determinado

Identificación de péptidos (Espectroscopia de masas). En la identificación de péptidos por espectroscopia de masas, un total de 21 péptidos con actividad biológica fueron encontrados en la fracción de las glutelinas, esta fracción fue la más importante de la nuez ya que representó la fracción soluble de mayor composición y además fue estructuralmente similar a las Globulinas 11S. En esta fracción se encontraron los péptidos con actividad Antihipertensiva, Antioxidante y Anticarcinogénica, mostrando similitud con los resultados del análisis bioinformático. Las glutelinas son la fracción que mayor actividad antihipertensiva presenta con 9 péptidos

antihipertensivos identificados. En la Tabla 2 se muestran los péptidos identificados por espectroscopia de masas

Tabla 2. Caracterización por MS/MS de los péptidos bioactivos en la nuez.

Actividad	Frecuencia de Ocurrencia	Secuencias con actividad biológica.	Proteína de Reserva	Descripción y Reporte
Antihipertensivo	0.063	MVSR, LAASGLLL, ALLALS, YDG, FQP, DMFPAQ, EEE, LKAWSVAR	Glutelinas	Inhibidor de la enzima convertidora de Angiotensina I (Yokoyama et al., 1992)
		CYFQNCPR	Albuminas y Glutelinas	
Antioxidante	0.0621	GYV, EL, IRKH, TFEETSQ, NYKQMT	Glutelinas	Protege a la célula de la oxidación (Cheng et al., 2010)
		YYY, LKPPTY, YYG, LEGFYYY	Albuminas y Glutelinas	
Anticarcinogenico	0.031	AYRNRYRQYRY, EQRPRT, LPTSEAAKY	Glutelinas	Inhibidor del factor de transcripción oncogénico (STAT3) (Doutal et al., 2009)
Antitrombótico	0.0016	DEE	Globulinas 11S	Antiagregante plaquetario (Lee and Kim, 2005)

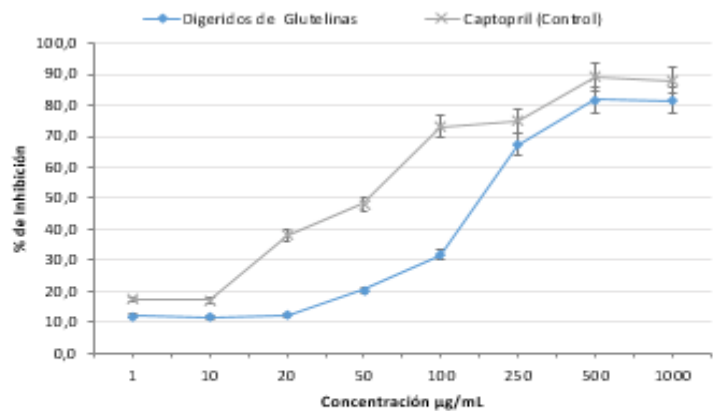


Figura 2. Actividad inhibitoria de la ECA de digeridos de glutelinas

Actividad Antihipertensiva. Ensayo de Inhibición de la ECA-I. Se analizó y cuantificó el porcentaje de inhibición de los digeridos trípticos de glutelinas de nuez sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), utilizando el siguiente rango de concentraciones: 1, 10, 20, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL. La máxima inhibición alcanzada como se observa en la Figura 2, fue del 81.75% con 500 µg/mL de digeridos trípticos, cuando la concentración se aumentó a 1000 µg/mL se observó una disminución en el porcentaje de inhibición. Como control, se analizó y cuantificó la actividad inhibitoria del captopril, utilizando las mismas concentraciones que en los digeridos de glutelinas. Los datos obtenidos corresponden a la misma concentración de 500 µg/mL que en los digeridos, obteniendo un 89.23% de inhibición. Con estos datos se obtuvo una CL₅₀ de 250 µg/mL para los digeridos y para el captopril

Los digeridos trípticos de glutelinas de nuez podrían ser considerados nutraceuticos antihipertensivos, es decir, sustancias provenientes de un alimento que proveen algún beneficio a la salud que pudiera ayudar en el tratamiento o prevención de enfermedades (NUCIS, 2012). Los compuestos que funcionan como nutraceuticos tienen potencia baja como compuestos bioactivos si son comparados con fármacos, pero, dado que son ingeridos regularmente en cantidades significativas como parte de la dieta, pueden presentar un efecto fisiológico a largo plazo perceptible (NUCIS, 2012). Comparados con los fármacos inhibidores de la ECA, los péptidos derivados de alimentos tienen ciertas ventajas, ya que, aunque tienen una actividad inhibitoria menor in vitro que los fármacos (Espín et al., 2007) no tienen los efectos secundarios dañinos, tales como tos seca, vértigo, dolor de cabeza, sabor anormal (metálico o salado), problemas de riñones e hígado y angioedema (FitzGerald y Meisel, 2000), además de que representan un costo más bajo de la salud (Espín et al., 2007). De esta manera, la nuez es un alimento que puede ser incluido en la dieta de pacientes con enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y la aterosclerosis, como coadyuvante de los tratamientos farmacológicos de dichas patologías.

CONCLUSIONES

De todas las fracciones digeridas analizadas, los digeridos trípticos de las glutelinas de nuez podrían ser considerados nutraceuticos antihipertensivos. Los ensayos de actividad biológica de las glutelinas de nuez, indicaron que tenían un efecto antihipertensivo. En tanto se concluye que los péptidos encriptado provenientes de las proteínas de reserva en la nuez cumplen con una función regulatoria en el metabolismo.

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen a Ciencia Básica SEP-Conacyt por el apoyo otorgado al proyecto 182549 y DAIP/UG por el apoyo otorgado al proyecto 647/2015.

BIBLIOGRAFÍA

- Dourlat, J., W. Q. Liu, F. Sancier, T. Edmonds, P. Pamosinlapatham, F. Cruzalegui and C. Garbay. 2009. A novel non-phosphorylated potential antitumoral peptide inhibits STAT3 biological activity. *Biochimie*, 91: 996-1002.
- Elliott P. (2003) Protein intake and blood pressure in cardiovascular disease. *Proc Nutr Soc*, 62:495–504.
- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T., y Tomas-Barberan, F.A. 2007. Nutraceuticals: facts y fiction. *Phytochemistry* 68: 2986-3008
- FitzGerald, R.J., y Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme. *Br J Nutr* 84 Suppl 1: S33-37.
- NUCIS, 2012. Disponible en <http://www.nucis.org/>
- Osborne TB. 1924. The vegetable proteins. Disponible en: <http://www.archive.org/details/vegetableprotein00osbouoft>
- SAGARPA 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/paginas/nuez.aspx>
- Silva, S. C. 2007. Caracterización fisicoquímica y nutraceutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. (Tesis Doctorado- IPICYT).
- Torruco-Uco, J. G., M. A. Domínguez-Magaña, G. Dávila-Ortiz, A. Martínez-Ayala, L. A. Chel Guerrero, and D. A. Betancur. 2008. Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de Origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6 (2): 158-168.
- Wang, W. and E. González de Mejía. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food. Science and Food Safety*. 4: 63-78.