

## COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS FUNCIONALES: PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS PROCEDENTES DE LA LECHE

### AUTORAS

Beatriz Gómez-Sala<sup>1</sup>  
Belén Díaz-Freitas<sup>2</sup>  
María Jesús Rodríguez Martínez<sup>3</sup>

1. Licenciada en Farmacia. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
2. Doctora en Biología. Laboratorio de Inmunología. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
3. Doctora en Farmacia. Farmacéutica comunitaria en Madrid.

Este artículo se enmarca en un proyecto de investigación sobre péptidos bioactivos en el que colabora SEFAC con el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), la empresa de biotecnología Innaves, S.A. y la Universidad Complutense de Madrid.

### RESUMEN

Los complementos alimenticios representan una importante fuente de nutrientes esenciales y otros elementos. Últimamente, se está produciendo un aumento de su consumo relacionado con la importancia que está adquiriendo el autocuidado de la salud, donde el farmacéutico juega un importante papel. Dentro de esta categoría de sustancias han aparecido recientemente los péptidos bioactivos. Estos péptidos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, inactivas dentro de la proteína intacta, pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento en el organismo o por un procesado previo del mismo. Tienen efectos beneficiosos en diversos casos y pueden influir positivamente en la salud de la población. Algunas actividades que han demostrado tener son: antihipertensiva, opiácea, antioxidante, quelante de minerales o inmunomoduladora.

De entre los diferentes grupos de péptidos bioactivos, los péptidos antihipertensivos están recibiendo una especial atención debido a la frecuencia de la hipertensión arterial en la población mundial. Estos péptidos obtenidos por fermentación o hidrólisis enzimática han demostrado su actividad antihipertensiva como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*

Continúa ➔

### INTRODUCCIÓN

#### SITUACIÓN ACTUAL DE LOS COMPLEMENTOS ALIMENTICIOS

Los complementos alimenticios representan una importante fuente de nutrientes esenciales, son ampliamente utilizados y, a menudo, contienen el 100% de la cantidad diaria recomendada (CDR) de uno o más nutrientes. Actualmente, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha aprobado una serie de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos y complementos alimenticios<sup>1</sup>. Para garantizar que estas declaraciones de propiedades saludables sean veraces, claras, fiables y útiles para la población general, según lo previsto en el Reglamento (CE) 1924/2006, sólo se han autorizado aquellas solicitudes que han sido aprobadas después de una evaluación científica del nivel más elevado llevado a cabo por la propia EFSA. Promocionar la salud a través de alimentos y complementos alimenticios funcionales es una estrategia atractiva para la población general, ya que es una forma de mejorar o mantener la salud con una aproximación proactiva y adecuada. Además, cabe añadir que algunos aspectos demográficos, como el incremento de la riqueza de los habitantes de países desarrollados, el envejecimiento de la población y el consecuente incremento de los problemas de salud asociados, contribuyen a que aumente el interés por este tipo de productos<sup>2</sup>.

En España, se ha publicado recientemente el Real Decreto 1487/2009 relativo a los complementos alimenticios. Esta Directiva se refiere a estos productos definiéndolos como fuentes concentradas de nutrientes, vitaminas y minerales u otras sustancias, que tengan efectos nutricionales o fisiológicos, solas o en combinación, que se comercializan en forma dosificada, y cuyo fin sea complementar una dieta normal. Aunque en circunstancias normales una dieta ade-

cuada y equilibrada proporciona todos los nutrientes necesarios para el normal desarrollo y mantenimiento de un organismo sano, las investigaciones realizadas demuestran que esta situación ideal no se da en la práctica para todos los nutrientes, ni para todos los grupos de población.

Los complementos alimenticios pueden usarse en el contexto de un estilo de vida saludable para proveer niveles óptimos de un nutriente que el organismo necesite, para llevar a cabo sus funciones o para proveer a dicho organismo de una sustancia que éste no requiera directamente, pero que le sea necesaria para mejorar su funcionamiento. O bien para tratar deficiencias de ciertos nutrientes, como forma de compensar un estilo de vida no saludable.

La tendencia en el consumo de complementos alimenticios está cambiando y uno de los principales factores para que esto ocurra es que el usuario está teniendo un mayor protagonismo en el autocuidado de su salud, buscando alternativas terapéuticas en productos naturales y otros que no requieren prescripción<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta que los consumidores pueden decidir complementar su ingesta de nutrientes mediante el consumo de estos productos, y considerando que una ingesta excesiva y continuada de los mismos puede tener efectos perjudiciales para la salud, el papel del farmacéutico en su dispensación e indicación es muy importante, aconsejando el más adecuado a cada situación, dando información sobre su utilización y comprobando que su consumo no esté contraindicado por el uso de otros medicamentos o por problemas de salud de la persona que los va a utilizar.

Existe una amplia gama de nutrientes y otros elementos que pueden estar presentes en los complementos alimenticios, incluyendo las vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, fibra, etc. En la actualidad,

en animales de experimentación en pruebas agudas, crónicas y toxicológicas, así como en ensayos clínicos en humanos. Son unos productos de probada seguridad y eficacia. Su aparición como complementos alimenticios permite al farmacéutico tener un recurso terapéutico, que no es de prescripción, para su indicación en aquellos casos en los que se detecten valores de presión arterial que sin llegar a la hipertensión sean susceptibles de una intervención farmacéutica.

## PALABRAS CLAVE

### PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL

Complemento alimenticio, péptidos bioactivos, hipertensión, hidrolizado de caseínas.

### PALABRAS CLAVE EN INGLÉS

Dietary supplements, bioactive peptides, hypertension, casein hydrolysate.

## ABREVIATURAS

CDR: cantidad diaria recomendada.  
 EFSA: European Food Safety Authority (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria).  
 FOS: fosfo-oligosacáridos.  
 GOS: gluco-oligosacáridos.  
 CN: caseína.  
 PA: presión arterial.  
 PAS: presión arterial sistólica.  
 PAD: presión arterial diastólica.  
 TGI: tracto gastrointestinal.  
 HTA: hipertensión arterial.  
 ECV: enfermedad cardiovascular.  
 RCV: riesgo cardiovascular.  
 ADN: ácido desoxirribonucleico.  
 SHR: Spontaneously Hypertensive Rats (ratas espontáneamente hipertensas).  
 ECA: enzima convertidora de angiotensina.  
 HHL: Hippuryl-His-Leu.  
 HPLC-MS: high-performance liquid chromatography-mass spectra (cromatografía líquida de alta eficacia-espectrometría de masas).

Fecha de recepción: 7/7/2011

Fecha de aceptación: 3/8/2011

encontramos en la farmacia algunas sustancias y productos de especial relevancia, bien porque su consumo se está incrementando, bien por ser novedades con unas perspectivas de uso en alza. Entre ellas, encontramos los probióticos, prebióticos (FOS y GOS), antioxidantes (resveratrol), omega 3 o melatonina.

Unos productos que están empezando a comercializarse como complementos alimenticios en la farmacia española y en los que hay puestas muchas expectativas son los péptidos bioactivos.

## PÉPTIDOS BIOACTIVOS: PÉPTIDOS ANTIHIPERTENSIVOS

La relevancia y el interés que suscitan los péptidos bioactivos, tanto en el ámbito científico como industrial, quedan reflejados en el número de publicaciones y patentes que existen en la literatura científica y en los nuevos productos que se lanzan al mercado. Actualmente, las proteínas más estudiadas como fuente de péptidos bioactivos y principal fuente de péptidos antihipertensivos son las proteínas lácteas.

La leche es una fuente de nutrientes para el ser humano, por lo que se considera un alimento básico. Se trata de una mezcla compleja de especies moleculares de diferente naturaleza compuesta principalmente por agua, proteínas, carbohidratos y lípidos, así como enzimas, vitaminas y sales minerales. Algunos de estos componentes son de vital importancia para el crecimiento del recién nacido, ya que pueden actuar como moduladores de las funciones gastrointestinales, hormonas y factores de crecimiento, y podrían influir en el desarrollo del tracto gastrointestinal, otros órganos específicos, en el sistema inmune y en la modulación de la microflora intestinal<sup>4</sup>.

Las proteínas lácteas presentan un elevado valor nutricional, debido a su alto contenido en aminoácidos esenciales y a su adecuada digestibilidad. Existen dos tipos de proteínas lácteas: las caseínas, que son el principal componente proteico de la leche y representan el 80%, y las proteínas del suero (Tabla 1)<sup>5</sup>.

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre dos y quince residuos, inactivas dentro de la proteína intacta, pero que pueden ser liberados bien durante la digestión del alimento en el TGI del individuo o bien por un procesado previo

TABLA 1 PRINCIPALES PROTEÍNAS DE LA LECHE BOVINA <sup>a</sup>	
Proteína	Cantidad en la leche desnatada (g/l)
<b>Caseínas</b>	
$\alpha_1$ -CN	12-15
$\alpha_2$ -CN	3-4
$\beta$ -CN	9-11
$\kappa$ -CN	2-4
<b>Proteínas séricas</b>	
$\alpha$ -lactoglobulina	0,6-1,7
$\beta$ -lactoglobulina	2-4
Lactoferrina	0,02-0,1

<sup>a</sup>Adaptado de Farrell et al<sup>5</sup>.

del mismo. Estos péptidos tienen efectos beneficiosos para el organismo en diversos casos y pueden influir positivamente en la salud de la población<sup>6</sup>. En las últimas décadas, se han desarrollado numerosas investigaciones relativas a la caracterización de péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas<sup>7-14</sup>. Algunas de las funcionalidades asociadas a estos péptidos se encuentran resumidas en la Tabla 2<sup>15-27</sup>.

De entre los diferentes grupos de péptidos bioactivos, los péptidos antihipertensivos están recibiendo una especial atención debido a la frecuencia de la HTA en la población mundial y a que es un factor de riesgo de ECV y renales que conllevan un alto coste socioeconómico<sup>28</sup>.

En general, se estima que la frecuencia de la hipertensión en la población está en torno a un 30%, siendo más elevada en ancianos, aproximadamente un 68%<sup>29</sup>. Casi otro 20% de los individuos presentan una PA normal-alta y un 14-15% presentan una presión normal, donde existe también riesgo cardiovascular y muertes relacionadas<sup>30</sup>. La hipertensión arterial se define por la presencia mantenida de cifras de PA sistólica  $\geq 140$  mmHg o PA diastólica  $\geq 90$  mmHg o ambas<sup>31</sup>. Cifras inferiores a los límites anteriormente citados no indican necesariamente una ausencia de riesgo. Existe una relación continua, consistente e independiente de otros factores de riesgo entre PA y riesgo de sufrir ECV. Cuanto mayor es la PA, mayor es también la posibilidad de sufrir una enfermedad cardíaca, cerebrovascular o renal. En la Tabla 3<sup>32-34</sup>, se muestran las diferentes categorías de PA para adultos. La clasificación "pre-hipertensión" ha sido recientemente introducida con el fin de identificar a aquellos sujetos en los que la intervención temprana con

**TABLA 2** FUNCIONALIDAD DE ALGUNOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS

Sistema fisiológico	Actividad	Secuencia de aminoácidos	Péptido	Referencias
Sistema cardiovascular	Antihipertensivo	VPP	$\beta$ -CN f(74-76)	15, 16
		IPP	$\beta$ -CN f(84-86)	15, 16
		RYLGY	$\alpha_{S1}$ -CN f(90-94)	17
		AYFYPEL	$\alpha_{S1}$ -CN f(143-149)	17
		FFVAPFPEVFGK	$\alpha_{S1}$ -CN f(23-34)	18
	Antioxidante	PYVRYL	$\alpha_{S2}$ -CN f(203-208)	19
		YFYPEL	$\alpha_{S1}$ -CN f(144-149)	20
	Antitrombótico	MAIPPCKKNQDK	$\kappa$ -CN f(106-116)	21
		KNQDK	$\kappa$ -CN f(112-116)	13
		NQDK	$\kappa$ -CN f(113-116)	13
	Hipocolesterolémico	IIAEK	$\beta$ -lactoglobulina	21
		GLDIQK	$\beta$ -lactoglobulina	22
		ALPMH	$\beta$ -lactoglobulina	22
	Opiáceo	YFPFGIPNSL	$\beta$ -casomorfinina f(60-70)	23, 13
YFPF		$\beta$ -CN f(60-63)	13	
Quelantes de minerales	EASPEVI	$\kappa$ -CN f(147-153)	24, 25	
	Sistema nervioso	Opiáceo	YFPFGIPNSL	$\beta$ -casomorfinina f(60-70)
YFPF			$\beta$ -CN f(60-63)	13
Antiestrés		YLGLYLEQLLR	$\alpha_{S1}$ -CN f(91-100)	26
Sistema inmune	Inmunomodulante	YGG	$\alpha$ -lactoalbúmina	27
		YG	$\kappa$ -CN y $\alpha$ -lactoalbúmina	27, 23
		RYLGYL	$\alpha_{S1}$ -CN f(90-95)	23
	Antimicrobiano	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	$\alpha$ -CN f(1-23)	13
	Citomodulante	HIQKED(V)	$\alpha$ -casomorfinina	21
YFPFGPI		$\beta$ -casomorfinina-7	21	
Sistema óseo	Quelantes de minerales	EASPEVI	$\kappa$ -CN f(147-153)	24, 25
		Anticariogénico	RELEELNVPGEIVESLSSEESITR	$\beta$ -CN f(1-25)
	ELEELNVPGEIVESLSSEESITR	$\beta$ -CN f(2-25)	25, 28	
	QMEAESISSSEEIVPNSVEQK	$\alpha_{S1}$ -CN f(59-79)	25, 28	
Sistema digestivo	Antimicrobiano	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF	$\alpha$ -CN f(1-23)	13
	Inmunomodulante	YGG	$\alpha$ -lactoalbúmina	27
		YG	$\kappa$ -CN y $\alpha$ -lactoalbúmina	27, 23
		RYLGYL	$\alpha_{S1}$ -CN f(90-95)	23
	Opiáceo	YFPFGIPNSL	$\beta$ -casomorfinina f(60-70)	23, 13
YFPF		$\beta$ -CN f(60-63)	13	

**TABLA 3** CLASIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PRESIÓN ARTERIAL PARA ADULTOS (ADAPTADA DE SEH-LELHA<sup>a</sup>)

Categoría según ESH-ESC <sup>b</sup>		PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	Categoría según el JNC <sup>c</sup>
Normotensión o HTA controlada	Óptima	<120	<80	Normal
	Normal	120-129	80-84	
	N-Alta	130-139	85-89	Pre-hipertensión
HTA	Grado 1	140-159	90-99	Hipertensión Tipo 1
	Grado 2	160-179	100-109	Hipertensión Tipo 2
	Grado 3	≥180	≥110	

<sup>a</sup>SEH-LELHA: Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial<sup>32</sup>;

<sup>b</sup>Categorías de HTA según European Society of Hypertension. European Society of cardiology Guidelines Committee<sup>33</sup>;

<sup>c</sup>Categorías de Hipertensión según The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure<sup>34</sup>.

medidas de estilo de vida saludable podría reducir la PA y el progreso a HTA con el paso de los años, señalando la necesidad de incrementar la educación para la salud por los profesionales sanitarios y la población general<sup>34</sup>. En concreto, los farmacéuticos comunitarios por su accesibilidad y contacto habitual con los pacientes tienen un papel fundamental, no sólo en la educación sanitaria para concienciar a los usuarios de la importancia de la prevención y en la promoción de hábitos saludables (dieta adecuada, ejercicio, moderar el consumo de alcohol, deshabituación tabáquica y pérdida o manteni-

valor de IC<sub>50</sub> o concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la enzima.

El efecto antihipertensivo puede ser evaluado con experimentos *in vivo* usando ratas SHR. Los ensayos llevados a cabo en este tipo de ratas están considerados como uno de los mejores modelos experimentales para evaluar los medicamentos antihipertensivos, ya que se ha demostrado que la progresión de la hipertensión en estos animales es similar a la de los humanos<sup>71</sup>. Se han realizado numerosos estudios, tanto agudos como crónicos, en este modelo de experimentación confirmando su efecto antihipertensivo<sup>72-74</sup>. Además, los estudios toxicológicos realizados muestran que no hay evidencia de toxicidad en ningún órgano tras la administración por vía oral de altas dosis de estos péptidos, tanto de forma aguda como prolongada en el tiempo<sup>63,75</sup>.

Finalmente, para determinar si las propiedades antihipertensivas de estos péptidos se manifiestan en humanos, se llevan a cabo estudios clínicos, generalmente en sujetos con tensión normal-alta o hipertensión grado I. Los estudios clínicos más relevantes están recogidos en dos meta-análisis publicados recientemente. Xu y colaboradores<sup>76</sup> incluyen doce ensayos con un total de 623 participantes y encontraron una disminución significativa tanto en la PAS como en la PAD. El meta-análisis llevado a cabo por Pripp y colaboradores<sup>77</sup>, que incluye quince ensayos clínicos, arroja un resultado similar. Por otro lado, otras de las conclusiones que se desprenden de los estudios clínicos es que estos péptidos antihipertensivos derivados de la leche sólo producen su efecto en sujetos hipertensos y no en normotensos<sup>78-80</sup>. También se ha descrito su efecto estabilizando la HTA en sujetos con medicación antihipertensiva<sup>81,82</sup>. Además, a pesar de que la manifestación de la HTA, puede estar condicionada por factores ambientales y genéticos, se ha demostrado que el efecto antihipertensivo de estos péptidos es independiente de la raza<sup>83-85</sup>. Los lactopéptidos se consideran seguros puesto que derivan de las proteínas lácteas, las cuales forman parte esencial de la dieta diaria en humanos. En realidad esos péptidos bioactivos, como ya se ha dicho, están contenidos en muchos alimentos de

origen lácteo y, en ocasiones, en concentraciones fisiológicamente significativas, y se consumen de forma inadvertida o aleatoria. Las nuevas presentaciones en forma de complementos alimenticios permiten asegurar su dosificación y establecer una pauta de consumo eficaz.

## CONCLUSIÓN

**Los péptidos antihipertensivos son productos de probada seguridad y eficacia, que se pueden utilizar en la fase de prehipertensión y junto a la adquisición de hábitos de vida saludable, conseguir que no aparezca o se retrase lo más posible la HTA. La aparición en el mercado de estas sustancias como complementos alimenticios permite al farmacéutico tener un recurso terapéutico que no es de prescripción, para su indicación en aquellos casos en los que se detecten valores de PA que, sin llegar a la hipertensión, sean susceptibles de una intervención farmacéutica para conseguir que el paciente mantenga un estilo de vida saludable. FC**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EFSA (European Food Safety Authority) [Monografía en Internet]. (acceso 20/05/11). Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/>
2. de Jong N, Ocké MC, Branderhorst HAC, Friele R. Demographic and lifestyle characteristics of functional food consumers and dietary supplement users. *Br J Nutr.* 2003; 89: 273-81.
3. Greger JL. Dietary supplement use: consumer characteristics and interests. *J Nutr.* 2001; 131: 1339S-43S.
4. Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ACE inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol.* 2001; 11: 347-56.
5. Farrell Jr HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 1641-74.
6. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides. Production and functionality. *Int Dairy J.* 2006; 16: 945-60.
7. Korhonen, H. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J Funct Foods.* 2009; 1: 177-87.
8. Ricci I, Artacho R, Olalla M. Milk protein peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACEI) activity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010; 50: 390-402.
9. Hernández-Ledesma B, Contreras MM, Recio I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011; 165: 23-35.
10. Chatterton DEW, Smithers G, Roupas P, Brodtkorb A. (2006). Bioactivity of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin -Technological implications for processing. *Int Dairy J.* 2006; 16: 1229-40.
11. Haque E, Chand R, Kapila S. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food Rev Int.* 2009; 25: 28-43.
12. Hayes M, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnol J.* 2007; 2(4): 426-34.
13. Hayes M, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Putting microbes to work: dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Biotechnol J.* 2007; 2(4): 435-49.
14. Hernández Ledesma B, López-Expósito I, Ramos M, Recio I. Bioactive peptides from milk proteins. *Immunochemistry in Dairy Research.* 2006; 37-60.
15. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci.* 1995; 78: 777-83.
16. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Takano T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J Dairy Sci.* 1995; 78: 1253-7.

17. Contreras MM, Carrón R, Montero MJ, Ramos M, Recio I. Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *Int Dairy J.* 2009; 19: 566-73.
18. López-Expósito I, Quirós A, Amigo L, Recio I. Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait.* 2007; 87: 241-9.
19. Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem.* 2000; 11: 128-31.
20. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2007; 18(2): 163-9.
21. Hernández-Ledesma B, Recio I, Amigo L. Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids.* 2008; 35 (2): 257-65.
22. Gill HS, Doull F, Rutherford KJ, Cross ML. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br J Nutr.* 2000; 84 (1): S111-7.
23. FitzGerald RJ. Potential uses of casein-phosphopeptides. *Int Dairy J.* 1998; 8: 451-7.
24. Phelan M, Aherne A, Fitzgerald RJ, O'Brien NM. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Int Dairy J.* 2009; 19: 643-654.
25. Guesdon B, Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Fromentin G, Tomé D, Even PC. A tryptic hydrolysate from bovine milk alphaS1-casein improves sleep in rats subjected to chronic mild stress. *Peptides.* 2006; 27(6): 1476-82.
26. Kayser H, Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 1996; 383(1-2): 18-20.
27. Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL, Black CL, Riley PF, Johnson IH, Perich JW. Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J Dent Res.* 1995; 74: 1272-9.
28. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365: 217-23.
29. Escobar C, Barrios V. Combined therapy in the treatment of hypertension. *Fund Clin Pharmacol.* 2010; 24: 3-8.
30. Banegas JR, Rodríguez Artalejo F, Cruz JJ, de Andrés B, Rey J. Mortalidad relacionada con la presión arterial y la hipertensión en España. *Med Clin (Barc).* 1999; 112: 489-94.
31. SEH-LELHA (Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial). *Guía Española de Hipertensión.* 2005; 22(2).
32. European Society of Hypertension-European Society of Cardiology Guidelines Committee. 2003 European Society of Hypertension - European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens.* 2003; 21: 1011-53.
33. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA.* 2003; 289: 2560-72.
34. Whelton PK, He J, Appel LJ. Primary prevention of hypertension: Clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *JAMA.* 2002; 288: 1882-8.
35. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors.* 2004; 21(1-4): 43-7.
36. Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos R, Recio I. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(6): 1504-10.
37. Hernández-Ledesma B, Amigo L, Ramos M, Recio I. Release of angiotensin converting enzymes inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int Dairy J.* 2004; 14(10): 889-98.
38. Hernández-Ledesma B, Quirós A, Amigo L, Recio I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int Dairy J.* 2007; 17: 42-9.
39. Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese. Stability under simulated gastrointestinal digestion. *Int Dairy J.* 2004; 14(12): 1075-80.
40. Lignitto L, Cavatorta V, Balzan S, Gabai G, Galaverna G, Novelli E, Sforza S, Segato S. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d'allevio cheese. *Int Dairy J.* 2010; 20: 11-17.
41. Gómez-Ruiz JA, Ramos M, Recio I. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int Dairy J.* 2002; 12(8): 697-706.
42. Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA. Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J Dairy Sci.* 2006; 89(9): 3352-9.
43. Yamamoto N, Maeno M, Takano T. Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J Dairy Sci.* 1999; 82(7): 1388-93.
44. Quirós A, Ramos M, Muguerza B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A, Recio I. Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J.* 2007; 17(1): 33-41.
45. Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F, Addeo F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 3898-904.
46. Jauhiainen T, Collin M, Narva M, Cheng ZJ, Poussa T, Vapaatalo H, Korpela R. Effect of long-term intake of milk-peptides and minerals on blood pressure and arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Milchwissenschaft.* 2005; 60(4): 358-62.
47. Yamaguchi N, Kawaguchi K, Yamamoto N. Study of the mechanism of antihypertensive peptides VPP and IPP in spontaneously hypertensive rats by DNA microarray analysis. *Eur J Pharmacol.* 2009; 620: 71-7.
48. Miguel M, Muguerza B, Sánchez E, Delgado MA, Recio I, Ramos M, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure in hypertensive rats caused by long-term intake of milk fermented with *Enterococcus faecalis* CECT 5728. *Br J Nutr.* 2005; 94: 36-43.
49. Jauhiainen T, Vapaatalo H, Poussa T, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Korpela R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. *Am J Hypertens.* 2005; 18: 1600-5.
50. Tuomilehto J, Lindström J, Hyyrynen J, Korpela R, Karhunen ML, Mikkola L, Jauhiainen T, Seppo L, Nissinen A. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of Human Hypertension.* 2004; 18: 795-802.
51. Turpeinen AM, Kumpu M, Rönnback M, Seppo L, Kautiainen H, Jauhiainen T, Vapaatalo H, Korpela R. Antihypertensive and cholesterol-lowering effects of a spread containing bioactive peptides IPP and VPP and plant sterols. *Journal of Functional Foods.* 2009; doi: 10.1016/j.jff.2009.03.001.
52. Nakamura T, Mizutani J, Ohki K, Yamada K, Yamamoto N, Takeshi M, Takazawa K. Casein hydrolysate containing Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro improves central blood pressure and arterial stiffness in hypertensive subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 2011. *Atherosclerosis.* doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.06.007.
53. Saito T, Nakamura T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J Dairy Sci.* 2000; 83(7): 1434-40.
54. Smacchi E, Gobbetti M. Peptides from several Italian cheese inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enz Microb Technol.* 1998; 22: 687-94.
55. Gómez-Ruiz JA, Taborda G, Amigo L, Recio I, Ramos M. Identification of ACE-inhibitory peptides in different Spanish cheeses by tandem mass spectrometry. *Eur Food Res Technol.* 2006; 223(5): 595-601.
56. Miguel M, Gomez-Ruiz JA, Recio I, Aleixandre A. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Mol Nutr Food Res.* 2010. 54: 1422-7.

57. Butikofer U, Meyer J, Sieber R, Wechsler D. Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheese. *Int Dairy J.* 2007; 17(8): 968-75.

58. Butikofer U, Meyer J, Sieber R, Walther B, Wechsler D. Occurrence of the angiotensin-converting enzyme inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in different cheese varieties of Swiss origin. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 29-38.

59. Mizuno S, Nishimura S, Matsuura K, Gotou T, Yamamoto N. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 3183-8.

60. Sevilla MA, Costalago S, Carron R, Contreras MM, Ramos M, Recio I, Montero MJ. Antihypertensive properties of a casein hydrolysate are related to in vivo ace inhibition. *Meth Find Exp Clin Pharmacol.* 2008; 30: 109.

61. Anadón A, Martínez MA, Ares I, Ramos E, Martínez-Larrañaga MR, Contreras MM, Ramos M, Recio I. Acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity studies of two antihypertensive peptides, RYLYG and AYFYPEL, that correspond to fragments (90-94) and (143-149) from alpha(s1)-casein. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 1836-45.

62. Sánchez D, Kassan M, Contreras MM, Carron R, Recio I, Montero MJ, Sevilla MA. Long-term intake of a milk casein hydrolysate attenuates the development of hypertension and involves cardiovascular benefits. *Pharmacol Res.* 2011; 63: 398-404.

63. Townsend RR, McFadden CB, Ford V, Cadee JA. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of casein protein hydrolysate (C12 peptide) in human essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2004; 17: 1056-8.

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

65. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol.* 1971; 20: 1637-48.

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

67. Li GH, Liu H, Shi YH, Le GW. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 37: 219-24.

68. Shalaby SM, Zakora M, Otte J. Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *J Dairy Res.* 2006; 73: 178-86.

69. Doig MT, Smiley JW. Direct injection assay of angiotensin-converting enzyme by high-performance liquid chromatography using a shielded hydrophobic phase column. *J Chromatogr.* 1993; 613: 145-9.

70. Siemerink M, Schebb NH, Liesener A, Perchuc AM, Schoni R, Wilmer M, Hayen H, Karst U, Vogel M. Development of a fast liquid chromatography/mass spectrometry screening method for angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors in complex natural mixtures like snake venom. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010; 24: 687-97.

71. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963; 27: 282-93.

72. Wang JP, Hu JE, Cui JZ, Bai XF, Du YG, Miyaguchi YJ, Lin BC. Purification and identification of an ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the anti hypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 2008; 111: 302-8.

73. Hernández-Ledesma B, Miguel M, Amigo L, Aleixandre MA, Recio I. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic beta-lactoglobulin peptide sequences. *J Dairy Res.* 2007; 74: 336-9.

74. Miguel M, Manso M, Aleixandre A, Alonso MJ, Salaices M, López-Fandino R. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and antihypertensive properties of peptides derived from egg white. *J Agric Food Chem.* 2007; 55: 10615-21.

75. Mizuno S, Mennear JH, Matsuura K, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of tripeptides (L-valyl-L-prolyl-L-proline and L-isoleucyl-L-prolyl-L-proline): V.A 13 week toxicity study of tripeptides-containing casein hydrolysate in male and female rats. *Int J Toxicol.* 2005; 24(4): 41-59.

76. Xu JY, Qin LQ, Wang PY, Li W, Chang C. Effect of milk tripeptides on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition.* 2008; 24(10): 933-40.

77. Pripp AH. Effect of peptides derived from food proteins on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr Res.* 2008; 52, doi: 10.3402/fnr.v52i0.1641.

78. Itakura H, Ikemoto S, Terada S, Kondo K. The effect of sour milk on blood pressure in untreated hypertensive and normotensive subjects. *J Jap Soc Clin Nutr.* 2001; 23: 26-31.

79. Kajimoto O, Nakamura Y, Yada H, Moriguchi S, Hirata H, Takahashi T. Hypotensive effects of sour milk in subjects with mild or moderate hypertension. *J Jpn Soc Nutr Food Sci.* 2001; 54: 347-54.

80. Yasuda K, Aihara K, Komazaki K, Mochii M, Nakamura Y. Effect of large high intake of tablets containing 'lactotriptides (VPP, IPP)' on blood pressure, pulse rate and clinical parameters in healthy volunteers. *J Nutr Food.* 2001; 4: 63-72.

81. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* 2003; 77: 326-30.

82. Hata Y, Yamamoto M, Ohni M, Nakajima K, Nakamu Y, Takano T. A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr.* 1996; 64: 767-71.

83. Anderson PJ, Critchley JA, Tomlinson B, Resplandy G. Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral doses of perindopril in normotensive Chinese and Caucasian volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1995; 39: 361-8.

84. Anderson PJ, Critchley JA, Tomlinson B. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cilazapril between Chinese and Caucasian healthy, normotensive volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996; 50: 57-62.

85. Vaidyanathan S, Jermany J, Yeh C, Bizot MN, Camisasca R. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, exhibits similar pharmacokinetics and pharmacodynamics in Japanese and Caucasian subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2006; 62: 690-8.