



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**OBTENCIÓN DE INHIBIDORES DE LA  
DIPEPTIDIL PEPTIDASA-IV DEL GRANO DE  
AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.)  
Y SU EFECTO EN LA GLUCEMIA DE  
RATONES DIABÉTICOS**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

M. en B. RAÚL REYES BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JORGE SORIANO SANTOS

ASESORES:

Dra. ISABEL GUERRERO LEGARRETA

Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS

MÉXICO, CDMX

JULIO 2017

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT a través de la beca 47942.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Iztapalapa aprobó la tesis

OBTENCIÓN DE INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-IV DEL GRANO DE  
AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Y SU EFECTO EN LA GLUCEMIA DE  
RATONES DIABÉTICOS

que presentó

Raúl Reyes Bautista

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesora: Dra. Isabel Guerrero Legarreta  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos  
Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Jurado:

Presidente: Dr. Rubén Román Ramos

*Universidad Autónoma Metropolitana*

Secretario: Dr. Julio César Almanza Pérez

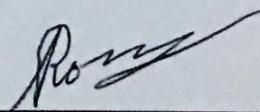
*Universidad Autónoma Metropolitana*

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godínez

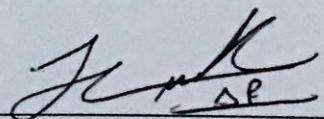
*Universidad Autónoma de Tlaxcala*

Vocal: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

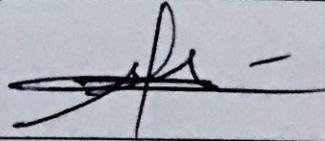
*Universidad Autónoma Metropolitana*



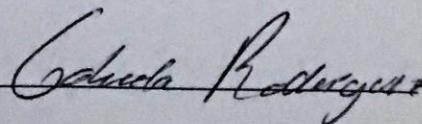
---



---



---



---

## *DEDICATORIAS*

*A mis dos grandes ilusiones que me han dado las fuerzas para seguir luchando día a día, mis hijos Raúl Reyes Arce y Carlos Reyes Arce, gracias por existir.*

*A mi madre Gloria Bautista Rodríguez por su amor, comprensión y apoyo incondicional durante toda mi vida. Todo lo que soy te lo debo a ti. Es un orgullo ser tu hijo.*

*A la memoria de mi padre Raúl Reyes Vázquez.*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A Berenice Arce Martínez por tu cariño y comprensión, por aceptarme como soy. Gracias por tu amor y por darme mis dos más grandes alegrías en la vida.*

*A mi sobrinita Claudia Nicol López Reyes porque ella es la felicidad de nuestra familia.*

*A mis hermanas Claudia Reyes Bautista y María Guadalupe Reyes Bautista por todo su cariño, apoyo y comprensión que me han brindado.*

*Al Dr. Rubén Román Ramos, asesor en este trabajo y por su gran interés sobre mi labor profesional y mi vida personal, porque sin duda alguna él me motivo a culminar el presente documento, gracias por todos sus consejos.*

*Al Dr. Julio César Almanza Pérez, revisor y colaborador importante en la elaboración del presente trabajo, por brindarme su ayuda en cada momento incluso más allá de la parte académica.*

*A los evaluadores que con su oportuna participación enriquecieron el presente trabajo.*

*A mi amigo y compañero de toda la parte experimental de este trabajo y ahora laboral, Erik G. Tovar Pérez, por compartir sus conocimientos y ofrecerme su apoyo en todo momento.*

*A mi gran amigo Eduardo A. Godínez Guzmán, porque cuando me preguntan cuantos hermanos tengo, siempre respondo uno y es de corazón; y ese hermano eres tú lalo, gracias por tu amistad, apoyo incondicional y respeto.*

## *AGRADECIMIENTO ESPECIAL*

*Al Dr. Jorge Soriano Santos por darme la oportunidad de realizar la presente investigación y compartir su gran conocimiento. Gracias por todo.*

## RESUMEN

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) es un pseudocereal con un contenido de proteínas entre 16-20% mayor a los cereales comunes. Debido al gran contenido de proteínas, este pseudocereal ha sido objeto de estudio debido a las secuencias encriptadas con funcionalidad biológica. La hidrólisis enzimática libera biopéptidos a partir de proteínas; sin embargo, hay información limitada sobre la bioactividad de los péptidos de las proteínas de amaranto. Trabajos previos han mostrado por análisis *in silico* e *in vitro* que en las proteínas de este grano se encuentran encriptadas secuencias capaces de ejercer diversas actividades biológicas como: antihipertensiva, antioxidante, antitrombótica, anticancerígena y recientemente también se ha reportado capacidad para inhibir la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), enzima que se encuentra involucrada en la regulación de la glucemia posprandial.

Tomando en cuenta los antecedentes respecto al potencial farmacológico que los hidrolizados del amaranto pueden tener, el objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad de diferentes fracciones proteínicas del grano de amaranto, para inhibir de forma *in vitro* e *in vivo* la DPP-IV, así como esclarecer la forma en la que estos péptidos realizan su proceso de inhibición con la finalidad de conocer la potencia de las fracciones, al mismo tiempo se caracterizaron fisicoquímicamente las fracciones peptídicas y purificaron de manera parcial los hidrolizados por cromatografía de filtración en gel, con la finalidad de evaluar la relación entre la inhibición de la DPP-IV y el peso molecular relativo, además de conocer la actividad de las fracciones seleccionadas se utilizó un modelo *in vivo* con ratones a los cuales se les indujo una diabetes por medio de STZ, donde se evaluó a través de una prueba oral de tolerancia a la glucosa, concentración de insulina y glucagón, evaluando el efecto durante una administración aguda y subaguda de los hidrolizados proteínicos.

Se encontró tres principales fracciones proteínicas correspondientes a *Alb1* 46%, *Glu* 22%, *Glo* 12% y una fracción que representó una baja concentración *Pro* <1%, representando así el 83% de la proteína total del grano. La hidrólisis con alcalasa bajo las condiciones de tiempo y relación enzima/sustrato estudiadas en el presente trabajo mostró una hidrólisis extensiva de

las proteínas donde la fracción que presentó mayor susceptibilidad al ataque proteolítico fue la fracción de *Glu* con un grado de hidrólisis de  $75 \pm 0.92\%$  (24 h) y la fracción *Alb1* fue la que presentó mayor resistencia al ataque proteolítico  $43 \pm 0.34\%$  (48 h) con a una relación E/S de 0.8 UA/g. Los perfiles electroforéticos revelaron que la hidrólisis de las diferentes fracciones proteínicas reducía las proteínas de elevado peso molecular desde las primeras horas de tratamiento enzimático, también se encontraron proteínas que presentaron resistencia al ataque proteolítico específicamente entre 20-24 kDa, de ahí su bajo grado de hidrólisis. Durante la evaluación del porcentaje de inhibición de la DPP-IV, se encontró que los mayores tiempos de hidrólisis mostraban una mayor capacidad para inhibir la DPP-IV, encontrándose que la fracción de *Glu* alcanzó a las 24 h de tratamiento proteolítico una mayor capacidad para inhibir la DPP-IV  $85 \pm 0.2\%$  y para *Alb1* y *Glo* de 48 h ( $45 \pm 0.2\%$  y  $63 \pm 0.5\%$ , respectivamente). Los hidrolizados proteínicos que presentaron mayor grado de inhibición de la DPP-IV se purificaron parcialmente por cromatografía de exclusión molecular donde se encontró que las fracciones con pesos moleculares 0.86, 0.65 y 0.45 kDa (para *Alb1*, *Glo* y *Glu*; respectivamente) mostraron la mayor potencia para inhibir la DPP-IV, siendo los valores de  $IC_{50}$  de  $1.98 \pm 0.01$ ,  $0.25 \pm 0.04$  y  $0.12 \pm 0.006$  mg/mL, para las fracciones proteínicas antes mencionadas respectivamente, con lo cual se evidenció una relación inversa entre el peso molecular y la potencia para inhibir la DPP-IV. Se evaluó el comportamiento cinético de los inhibidores y se encontró que las tres fracciones proteínicas purificadas mostraron inhibición del tipo competitiva, la fracción con mayor potencia *in vitro* fue la fracción *Glu*.III (0.45 kDa) presentando un valor de  $K_m$  0.75 mM, eficiencia catalítica  $5.6 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$  y una constante de inhibición ( $K_i$ ) de 0.11 mg/mL, esta fracción mostró que los péptidos generados por hidrólisis con alcalasa compiten con el sustrato por el sitio catalítico de la enzima, de forma *in vitro*.

La evaluación de las distintas fracciones proteínicas con animales con diabetes inducida, en el estudio agudo, reveló que a diferencia de la evaluación *in vitro* la fracción que mostró un efecto positivo sobre la reducción en la glucemia posprandial ( $\approx 26\%$  vs. el grupo control) fue la fracción *Glu* con una dosis de 300 mg/kg a los 30 min después de la administración de la carga oral de glucosa (2 g/kg), mostrando un aumento de insulina en tres veces (1.2 ng/mL) y una reducción en la concentración de glucagón en 30% comparado con el control ( $p < 0.05$ ).

Para el estudio subagudo (administración durante 30 días) se demostró que al igual que en administración aguda la fracción *Glu* fue la que presentó un efecto positivo en la reducción de glucosa posprandial de 17%, a su vez los niveles de insulina aumentaron a 2.25 ng/mL, dos veces más altos que los encontrados en el estudio agudo, sin embargo no se encontraron cambios en los niveles plasmáticos de glucagón comparado con el respectivo control. Los hidrolizados obtenidos a partir de la fracción de *Glu* por digestión con alcalasa y bajo las condiciones aquí reportadas podrían ser utilizados para el desarrollo de alimentos funcionales con actividad inhibitoria de la DPP-IV podrían funcionar como coadyuvantes en el control de la diabetes mellitus tipo 2, con la finalidad de mejorar la calidad de vida de las personas que padecen la enfermedad.

Hoy en día el amaranto no se considera un cultivo de alto valor agregado. Sin embargo, la identificación y caracterización de biomoléculas con actividad biológica, como las que se informan en el presente trabajo ayudaran a hacer un mejor uso de las propiedades nutricionales del amaranto e incentivar el cultivo de esta planta.

## SUMMARY

Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L), is a pseudocereal that shows protein content between 16-20%, this protein content is higher than the one found in most common cereals. Because of its remarkable protein content, amaranth has been subjected to several studies to find encrypted peptide sequences that may possess biological activities. However, just a few bioactive amaranth peptides have been identified and characterized. Some *in silico* and *in vitro* experiments have shown that these encrypted peptide sequences in the amaranth protein fraction are bioactive molecules with activities such as: antithrombotic, antihypertensive, anticarcinogenic, antioxidant, antiglycemic, among others. The antiglycemic property of amaranth peptides is related with the ability of these bioactive peptides to act as an inhibitor of the dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) enzyme. This enzyme is heavily involved in the postprandial glycemic regulation in humans.

Considering the pharmacological potential of hydrolyzed amaranth peptides with biological activity, the objective of this work was: (a) to test, *in vitro* and *in vivo*, the ability of different amaranth peptides, derived from the hydrolysis of amaranth, to inhibit the enzymatic activity of DPP-IV; (b) to clarify the mechanism of inhibition of DPP-IV by these amaranth peptides; (c) to characterize and partially purify these hydrolyzed peptides by gel filtration chromatography; (d) to identify the relationship between amaranth peptides inhibitory effect and their relative molecular mass; and finally (e) to test the biological activity of hydrolyzed amaranth peptides in an *in vivo* system, by administration of the hydrolysed amaranth protein extracts to STZ-induced diabetic mice, and evaluation of glucose tolerance, insulin and glucagon concentrations.

Four protein fractions were found in the amaranth seeds. The three main fractions were: *Alb1* 46%, *Glu* 22% and *Glo* 12%. An additional minor fraction was identified as *Pro* (<1%). These protein fractions made up to 83% of the total protein found in the amaranth seeds analyzed. Enzymatic hydrolysis of amaranth protein by using alcalase was extensive, however, the *Glu* fraction was easily hydrolysed, this fraction showed a degree of hydrolysis of  $75 \pm 0.92\%$  at 24 h. On the other hand, *Alb1* was highly resistant to the alcalase activity. This fraction

required a E/S= 0.8 AU/g and showed a degree of hydrolysis of  $43 \pm 0.34\%$  at 48 h. SDS-protein profiles indicated that the hydrolysis of the different amaranth protein fractions was faster and more effective on the proteins having a higher molecular mass when the enzymatic hydrolysis by alcalase was used. Conversely, proteins showing a molecular mass between 20-24 kDa were more resistant to the alcalase activity. After 24 h of hydrolysis, the fraction with the best capacity to inhibit DPP-IV was *Glu* ( $85 \pm 0.2\%$ ), meanwhile, *Alb1* and *Glo* showed an inhibitory effect of  $45 \pm 0.2\%$  and  $63 \pm 0.5\%$ , respectively, after 48 h of hydrolysis. The hydrolyzed amaranth protein extracts that showed the highest inhibition capacities were partially purified by molecular exclusion chromatography. It was found that peptides having a molecular mass of 0.86, 0.65 and 0.45 kDa, isolated from the fractions *Alb1*, *Glo* and *Glu*, respectively, were more effective to inhibit DPP-IV in the *in vitro* experiments. The  $IC_{50}$  for the *Alb1*, *Glo* and *Glu* peptides were  $1.98 \pm 0.01$ ,  $0.25 \pm 0.04$  and  $0.12 \pm 0.006$  mg/mL, respectively. Based on these results it was found that there was an inverse relationship between molecular mass and the inhibitory effect of the isolated peptides on the activity of DPP-IV. Moreover, these three peptides inhibit DPP-IV by a competitive mechanism. The most potent peptide, tested in the *in vitro* experiments, was Glu III (0.45 kDa). This peptide showed a catalytic efficiency of  $5.6 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ ,  $K_m = 0.75 \text{ mM}$  and a  $K_i = 0.11 \text{ mg/mL}$ .

Results obtained from the acute administration of amaranth protein fractions in the *in vivo* experiments, showed that the protein fraction having the most positive effect on reducing postprandial glycaemia (around 26% higher compared to the control group) was the *Glu* fraction. When 300 mg *Glu*/kg were administered to the mice units (having a glucose oral charge of 2g/kg), the insulin released increased three times (1.2 ng/mL) and glucagon concentration fell 30% compared to the control units ( $p < 0.05$ ). Sub-acute administration (30 day period) of amaranth protein fractions showed that the *Glu* fraction was the most effective to decrease postprandial glucose up to 17%. The protein fraction also increased the insulin content to 2.25 ng/L in the *in vivo* units tested, however, no significant changes were found on plasma glucagon levels.

Hydrolyzed amaranth protein extracts obtained from the *Glu* fraction by alcalase hydrolysis and under the conditions described in the present work, could be used to develop functional

foods having an inhibitory effect on DPP-IV. These functional food ingredients could help to treat diabetes type 2 and improve the quality of life of patients suffering from this type of diabetes.

Nowadays, amaranth is not considered as a high value-added crop. However, the identification and characterization of biomolecules with biological activity, like the ones reported in this work will help to make a better use of amaranth nutritional properties and to spread the cultivation of this plant.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>1. Generalidades</b>	<b>1</b>
1.1 Diabetes	1
1.1.1 Situación de la epidemia	1
1.1.2 Diabetes mellitus en México	4
1.1.3 Definición de diabetes mellitus	6
1.1.3.1 Signos y síntomas	6
1.1.3.2 Clasificación	7
1.1.3.2.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)	7
1.1.3.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	8
1.1.3.2.3 DM gestacional	11
1.1.3.2.4 Otros tipos específicos	11
1.1.4 Factores de riesgo para DM1 y DM2	11
1.1.4.1 Individuos de alto riesgo para desarrollar DM2	12
1.1.5 Diagnóstico de la diabetes	13
1.1.6 Tratamiento farmacológico de la DM2	14
1.1.6.1 Hipoglucemiantes Orales (HO)	15
1.1.6.1.1 Sensibilizadores de Insulina	15
1.1.6.1.1.1 Biguanidas	15
1.1.6.1.1.2 Tiazolidinedionas	16
1.1.6.1.2 Secretagogos de Insulina	17

1.1.6.1.2.1	Sulfonilureas	17
1.1.6.1.2.2	Meglitinidas	18
1.1.6.1.3	Inhibidores de alfa-glucosidasa	19
1.1.6.1.4	Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)	20
1.1.6.1.5	Análogos de la amilina	21
1.1.6.1.6	Terapias incretínicas	22
1.1.6.2	Insulina	25
1.2	Amaranto	27
1.2.1	Importancia Agronómica del Amaranto	28
1.2.2	Calidad nutricional de las proteínas del amaranto	28
1.2.3	Biopéptidos presentes en el grano de amaranto.	31
1.2.4	Inhibidores de serin proteasas en el grano de amaranto.	32
1.3	Dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).	34
1.3.1	Función de la DPP-IV	35
1.3.2	Estructura de la DPP-IV	36
1.4	Incretinas.	37
1.4.1	Péptido-1 similar al glucagón (GLP-1)	37
1.4.2	Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)	39
1.4.3	Inhibidores de la DPP-IV: efecto incretina	42
1.4.3.1	Inhibidores de la DPP-IV en alimentos	45
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>47</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS.</b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	<b>49</b>
4.1	Objetivo general.	49
4.2	Objetivos particulares.	49
<b>5.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>50</b>

5.1	Obtención de harina de amaranto desgrasada	50
5.2	Extracción de proteínas del grano de amaranto	50
5.3	Hidrólisis enzimática de las fracciones proteínicas	53
5.4	Grado de hidrólisis	53
5.5	Electroforesis SDS-PAGE	54
5.6	Electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE	56
5.7	Cromatografía de filtración en gel	58
5.8	Determinación de la actividad inhibitoria de la DPP-IV	58
5.9	Ensayo biológico	60
5.9.1	Animales y protocolos de investigación	60
5.9.2	Efecto agudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos	60
5.9.2.1	Inducción de diabetes con STZ	60
5.9.2.2	Administración de tratamientos	60
5.9.3	Efecto subagudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos	61
5.9.4	Obtención de suero y determinación de insulina y glucagón	62
5.10	Análisis estadístico	62
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>
6.1	Composición de las fracciones proteínicas	63
6.2	Caracterización fisicoquímica de los hidrolizados proteínicos	64
6.2.1	Grado de hidrólisis (GH)	64
6.2.2	Perfiles electroforéticos	67
6.3	Actividad inhibitoria de los hidrolizados sobre la DPP-IV	71
6.4	Purificación de los hidrolizados con mayor actividad inhibitoria de la DPP-IV	72
6.5	Cinética de inhibición de la DPP-IV por fracciones peptídicas	78

6.6	Efecto de los hidrolizados proteínicos del grano de amaranto en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (STZ)	82
6.6.1	Estudio de administración única (efecto agudo)	82
6.6.2	Efecto subagudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos	83
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>89</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>90</b>
<b>10.</b>	<b>APÉNDICES</b>	<b>111</b>
	APÉNDICE 1. Curvas patrón para ensayos espectrofotométricos	111
	APÉNDICE 2. Curva patrón de pesos moleculares para filtración en gel Sephadex G-50	114
	APÉNDICE 3. Cinética enzimática control de la DPP-IV	115
	APÉNDICE 4. Determinación de la dosis de hidrolizado proteínico sobre la glucemia de ratones diabéticos.	116
	APÉNDICE 5. Curvas estándar determinadas por ELISA.	117
	APÉNDICE 6. Regresiones lineales para la determinación del IC <sub>50</sub>	119
	APÉNDICE 7. Productos del trabajo	125

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estimaciones de prevalencia de la diabetes (20-79 años) por grupo de ingresos y edad, para el 2013. Clasificación según el Banco Mundial: IB (ingresos bajos), IMB (ingresos medio-bajos), IMA (ingresos medio-altos), IA (ingresos altos). Fuente: Guariguata *et al.*, 2014. 3
- Figura 2. Casos nuevos de diabetes tipo 2 en México 2000 a 2015. Fuente: Elaborada a partir de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. 5
- Figura 3. Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2. AGL = ácidos grasos libres; MODY = diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (por sus siglas en inglés). Fuente: Campbell, 2011. 10
- Figura 4. Estructura química de Metformina. 15
- Figura 5. Estructura química de la Rosiglitazona. 16
- Figura 6. Estructura química de la Glibenclamida. 17
- Figura 7. Estructura química de la Nateglinida 18
- Figura 8. Estructura química de la Acarbosa. 19
- Figura 9. Estructura química de la Dapagliflozina. 21
- Figura 10. Estructura química de la Pramlintida. 22
- Figura 11. Clasificación de las terapias incretínicas. DPP-IV, enzima dipeptidil-peptidasa IV; GLP-1, péptido-1 similar al glucagón; iDPP-IV, inhibidores de la DPP-IV; IgG4, inmunoglobulina G 4; LAR, liberación sostenida (del inglés *long-acting release*). Fuente: Jórdar, 2014. 24
- Figura 12. Semilla de amaranto en secciones: transversal (A) y longitudinal (B) vistas en un microscopio óptico. Fuente: Irving *et al.* (1981). 29
- Figura 13. Posibles secuencias bioactivas en proteínas de amaranto encontradas después de realizar una predicción científica de péptidos bioactivos presentes en proteínas de amaranto (*in Silico*). En primer lugar, se identificaron las secuencias de proteínas y luego se evaluaron los perfiles de péptidos activos utilizando la base de datos <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>. La frecuencia de aparición (A) de

fragmentos bioactivos con una actividad particular se calculó mediante la ecuación:  $A = a / N$ , donde "a" es el número de fragmentos formadores de residuos de aminoácidos con actividad dada en proteína y "N" es El número de residuos de aminoácidos de la proteína. Leyenda de la proteína: A = inhibidor de la alfa-amilasa; B = inhibidor de tripsina; C = proteína antimicrobiana; D = proteína 1 de transferencia de lípidos no específica; E = superóxido dismutasa [Cu-Zn]; F = proteína dedo de zinc RING; G = prosistemina; H = Cistatina; I = proteína de semilla; J = Glucosa - 1 - fosfato adenililtransferasa; K = Glucosiltransferasa; L = poliamina oxidasa; M = proteína de almacenamiento globulina 11S; N = almidón sintasa I unida a gránulos; O = Acetolactato sintasa. Fuente: Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015.

32

Figura 14. Procesos fisiológicos que son afectados por la actividad de la DPP-IV (Demuth *et al.*, 2005).

35

Figura 15. (a) Estructura tridimensional de la DPP-IV, (b) Residuos del sitio activo, destacando la orientación de la tríada catalítica Ser-His-Asp y la presencia de Glu-Glu que es necesario para la selección con el dipéptido y la interacción con inhibidores (Stephen, *et al.*, 2005).

36

Figura 16. Fisiología de la secreción y acción del GLP-1 sobre sus receptores en diferentes órganos y tejidos. SNC = Sistema Nervioso Central; GI: gastrointestinal (Campbell, 2011).

39

Figura 17. Fisiología de la secreción y acción del GIP en diferentes órganos y tejidos (Baggio y Drucker, 2007).

41

Figura 18. Estructuras químicas de inhibidores de la DPP-IV a) sitagliptina y b) vildagliptina

42

Figura 19. Efecto incretina estimulado por acción de las incretinas y su efecto en la glucemia posprandial (Campbell, 2011).

44

Figura 20. Ejemplos de hidrolizados de proteínas de: leche (A), origen animal (B) y plantas (C) que reportaron tener actividad inhibidora *in vitro* de DPP-IV. BSA, albúmina de suero bovino; GI, gastrointestinal; S. colagenasa, colagenasa de *Streptomyces*; WP, proteína de suero; WPC, concentrado de

proteína de suero; WPI, aislado de proteína de suero. Fuente: Lacroix y Li-Chan, 2016.	46
Figura 21. Método de extracción de albúmina 1, globulina, prolaminas y glutelinas del grano de amaranto (Soriano-Santos <i>et al.</i> , 1992; Barba de la Rosa <i>et al.</i> , 2010). *Todas las operaciones de centrifugado se llevaron a 13000g durante 20 min a 4 °C.	52
Figura 22. Reacción del la DPP-IV con el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA.	59
Figura 23. Grado de hidrólisis de las principales fracciones proteínicas del grano de amaranto; albúmina (Alb1), Globulina (Glo) y Glutelina (Glu), en función del tiempo.	66
Figura 24. Perfil electroforético (SDS-PAGE), de la fracción proteínica de Alb-1 y de sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas.	68
Figura 25. Perfil electroforético (SDS-PAGE), de la fracción proteínica de globulina (Glo) y de sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas.	69
Figura 26. Perfil electroforético (Tris-Tricina-SDS-PAGE) de la fracción proteínica Glutelina (Glu) y sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas	70
Figura 27. Inhibición de la DPP-IV por los distintos hidrolizados proteínicos del grano de amaranto; albúmina (Alb1), Globulina (Glo) y Glutelina (Glu).	72
Figura 28. Perfil de elusión por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 de los principales hidrolizados. a. albúmina 48 h; b. globulina 48 h; c. glutelina 24 h. STD, estándar de proteínas; kDa, peso molecular del estándar de proteínas.	74
Figura 29. Grafico de Lineweaver-Burk de el efecto de las fracciones peptídicas del grano de amaranto sobre velocidad de digestión de Gly-Pro-pNA por la DPP-IV. A.III, G.IV y Glu.III se obtuvieron mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-15) de Alb1H48, GloH48 y GluH24, respectivamente. La sitagliptina se utilizó como control.	79

- Figura 30. Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la glucosa en sangre, durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). (a) Cambios sobre la glucosa en sangre a través del tiempo y (b) Área bajo la curva (ABC) de la concentración de glucosa en sangre después de POTG. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ). 82
- Figura 31. Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la concentración de (a) Insulina en plasma y (b) Glucagón en plasma, 30 min después a la administración de los hidrolizados. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ). 83
- Figura 32. Efecto de la administración crónica (durante cuatro semanas) para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la glucosa en sangre, durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). (a) Cambios sobre la glucosa en sangre a través del tiempo y (b) Área bajo la curva (ABC) de la concentración de glucosa en sangre después de POTG. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ). 84
- Figura 33. Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la concentración de (a) Insulina en plasma y (b) Glucagón en plasma, 30 min después a la administración de los hidrolizados. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ). 85

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Prevalencia de la diabetes y número de personas con diabetes (20-79 años) por región de la FID para los años 2013 y 2035	2
Cuadro 2. Los diez principales países/territorios con la mayor cantidad de personas con diabetes (20-79 años), entre 2015 y 2040	4
Cuadro 3. Límites para el diagnóstico en el desorden del metabolismo de la glucosa (ADA, 2011)	14
Cuadro 4. Concentraciones de aminoácidos esenciales en granos de diferentes especies de amaranto en comparación con otros cultivos	30
Cuadro 5. Propiedades de los inhibidores de la DPP-IV disponibles en América y Europa, utilizados para el tratamiento de pacientes con DM2.	43
Cuadro 6. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE.	54
Cuadro 7. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.	55
Cuadro 8. Composición del Buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE.	56
Cuadro 9. Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.	56
Cuadro 10. Composición de los geles de electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.	57
Cuadro 11. Composición del búfer de muestra para electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.	57
Cuadro 12. Rendimiento sobre el fraccionamiento de las proteínas del grano de amaranto ( <i>Amarantus hypochondryacus</i> L.)	64

Cuadro 13. Clasificación de las especies producidas en la hidrólisis enzimática de proteínas.	72
Cuadro 14. Distribución de especies peptídicas en los distintos hidrolizados obtenidos por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50.	75
Cuadro 15. Valores de IC <sub>50</sub> de las fracciones peptídicas obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Saphadex G-15, de los hidrolizados que presentaron mayor actividad de inhibición sobre la DPP-IV	77
Cuadro 16. Parámetros cinéticos de el efecto de las fracciones peptídicas sobre la velocidad de digestión de Gly-Pro-pNA por la DPP-IV.	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
DPP-IV	Dipeptidil peptidasa - IV
GLP-1	Péptido-1 similar al glucagón
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
[E/S]	Enzima/Sustrato
IC <sub>50</sub>	Concentración media inhibitoria
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
UA/g	Unidades Anson/g
Alb1	Albúmina 1
Glo	Globulina
Glu	Glutelinas
Pro	Prolaminas
STZ	Estreptozotocina
GH	Grado de hidrólisis
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
POTG	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
PM <sub>r</sub>	Peso molecular relativo
[EI]	Complejo Enzima-Inhibidor
EC	Eficiencia catalítica

## 1. Generalidades

### 1.1 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (DeFronzo, 2004). Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Donnelly *et al.*, 2000).

#### 1.1.1 Situación de la epidemia

La diabetes mellitus es una de las mayores emergencias de salud global del siglo 21. Esta enfermedad es uno de los trastornos metabólicos más comunes en el mundo y la prevalencia de la diabetes en los adultos ha aumentado en las últimas décadas (Shaw *et al.*, 2010; Whiting *et al.*, 2011). La urbanización ha impulsado cambios drásticos en el estilo de vida y en particular en los países en desarrollo. Con estas transiciones rápidas vienen los aumentos en los factores de riesgo de enfermedades no transmisibles como la diabetes tipo 2 (Gordon, 2015). Las estimaciones de la carga actual y del futuro de la diabetes son importantes para asignar adecuadamente los recursos, impulsar políticas que promueven la salud e iniciar acciones para prevenir la diabetes en las generaciones futuras (Guariguata *et al.*, 2014).

Además de los 415 millones de adultos que se estima tienen actualmente diabetes, hay 318 millones de adultos con intolerancia a la glucosa, lo que los pone en alto riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro (IDF, 2015). Proyecciones reportadas por Guariguata *et al.* (2014) muestran que para el año 2035 el número de personas a nivel mundial con este padecimiento será de 591.9 millones. La prevalencia de la diabetes aumenta con la edad en todas las regiones (Cuadro 1) y por grupos de ingresos (Figura 1). La prevalencia más alta, esta correlacionada con la edad de las personas: de 60-79 años de edad (18.6%), aunque el

mayor número de personas con diabetes están en el grupo de edad de 40-59 años (184 millones). Se espera que estos patrones se mantengan durante los próximos 20 años.

En la Cuadro 1 se muestra la prevalencia y el número de personas con diabetes sobre una proyección realizada entre los años 2013 y 2035 para las regiones de la Federación Internacional de la Diabetes (FID).

**Cuadro 1.** Prevalencia de la diabetes y número de personas con diabetes (20-79 años) por región de la FID para los años 2013 y 2035

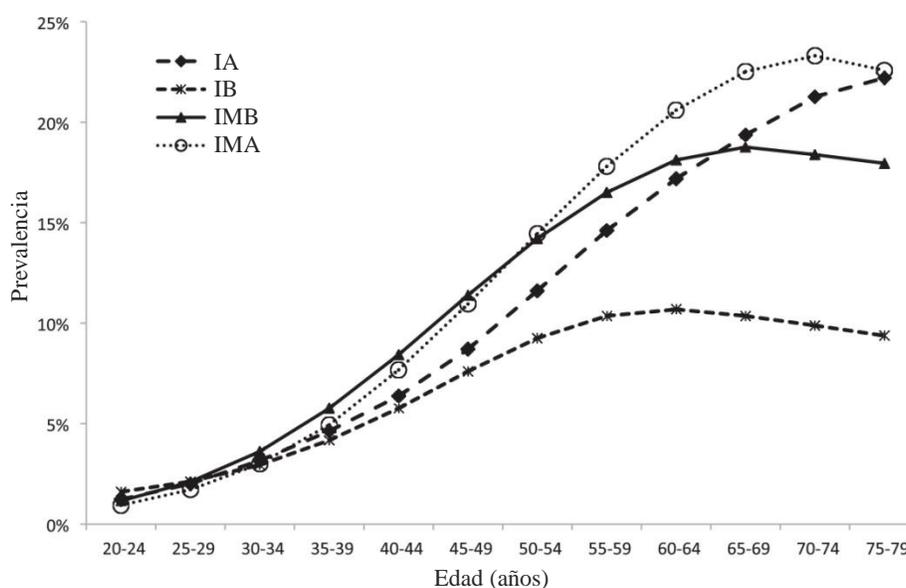
Región*	2013			2035			Incremento en el número de personas con diabetes %
	Población Millones	Número de personas con diabetes Millones	Prevalencia de diabetes comparativo %	Población Millones	Número de personas con diabetes Millones	Prevalencia de diabetes comparativo %	
AFR	407.8	19.8	5.7	775.5	41.4	6.0	109.1
EUR	658.7	56.3	6.8	668.7	68.9	7.1	22.4
MOAN	347.5	34.6	10.9	583.7	67.9	11.3	96.2
ANC	334.9	36.7	9.6	404.5	50.4	12.3	37.3
ACS	300.5	24.1	8.2	394.2	38.5	8.2	59.8
SEA	883.2	72.1	8.7	1216.9	123.0	9.4	70.6
WP	1613.2	138.2	8.1	1818.2	201.8	8.4	46.0
Mundial	4572.9	381.8	8.3	5861.7	591.9	8.8	55.0

\*La población y el número de personas de acuerdo a las siete regiones de la FID: AFR (África), EUR (Europa), MOAN (Medio Oriente y África del Norte), ANC (América del Norte y el Caribe), ACS (América Central y del Sur), SEA (Sureste de Asia), PO (Pacífico Occidental). Fuente: FID, 2015.

Existen diferencias regionales en la prevalencia de la diabetes a través de las siete Regiones de la FID y por grupo de ingreso (Cuadro 1 y Figura 1). El nivel más alto para la prevalencia por región, en la serie no ajustada, se encontró para América del Norte y el Caribe (11.0%). Sin embargo, después realizar el ajuste por edad el Medio Oriente y África del Norte presentan la prevalencia más alta con en el 10.9%. Mientras que la región de África tiene la menor prevalencia de adultos con diabetes (5.7%) y se proyecta para esta región el mayor aumento proporcional en el número de adultos con diabetes en 2035, con un incremento del 109%. En todas las regiones se proyecta tener un aumento en el número de personas adultas con diabetes que los proyectados para el crecimiento en la población

solo de adultos. En general, el número de adultos con diabetes aumentarán en un 55% para el año 2035.

En la Figura 1 se muestra la prevalencia específica con respecto a la edad para la diabetes cuando se divide por grupo de ingreso y muestra una prevalencia mucho menor de diabetes en los adultos mayores en los países de ingresos bajos (IB), en comparación con los países de mayores ingresos (IA). Esto puede ser el resultado de una serie de factores que incluyen: una mayor mortalidad en las personas con diabetes en estos países, o un efecto de cohorte debido a que las personas más jóvenes desarrollan diabetes.



**Figura 1.** Estimaciones de prevalencia de la diabetes (20-79 años) por grupo de ingresos y edad, para el 2013. Clasificación según el Banco Mundial: IB (ingresos bajos), IMB (ingresos medio-bajos), IMA (ingresos medio-altos), IA (ingresos altos). Fuente: Guariguata *et al.*, 2014.

A medida que aumenta la esperanza de vida, podemos esperar ver un mayor número de adultos con diabetes que viven en estos países ya que esto llevará a grandes aumentos que son proporcionales en los países con ingresos bajos y medio-bajos (IB y IMB) en la próxima generación. Además, la mayor prevalencia de diabetes entre los adultos más jóvenes en los países con ingresos bajos y medios-altos (IB y IMA) también impulsará un aumento a medida que las personas envejecen, los países se desarrollan, y aumenta la esperanza de vida. Sin mejoras relacionadas en el sistema de salud para la detección

temprana y el tratamiento, las tasas de complicaciones y muertes debidas a la diabetes también se puede esperar que aumente sustancialmente en estos países. Hasta que no se tenga un conocimiento en la prevención de la enfermedad, no se puede esperar un cambio en las curvas para los países de ingresos bajos y medio-bajos, dirigido hacia una disminución de la prevalencia de los grupos de edad más jóvenes, como la observada para los países de ingresos altos (Guariguata *et al.*, 2014).

### 1.1.2 Diabetes mellitus en México

En México la diabetes tipo 2 es una epidemia que va en ascenso acelerado. Entre las enfermedades crónico-degenerativas, ha mostrado el incremento más significativo en los últimos años (Moreno-Altamirano *et al.*, 2014).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son –en ese orden– los países con mayor número de diabéticos y se estima que para el año 2040 México hacienda un lugar en la estadística mundial, pasando del sexto al quinto país con mayor número de personas con diabetes (Cuadro 2).

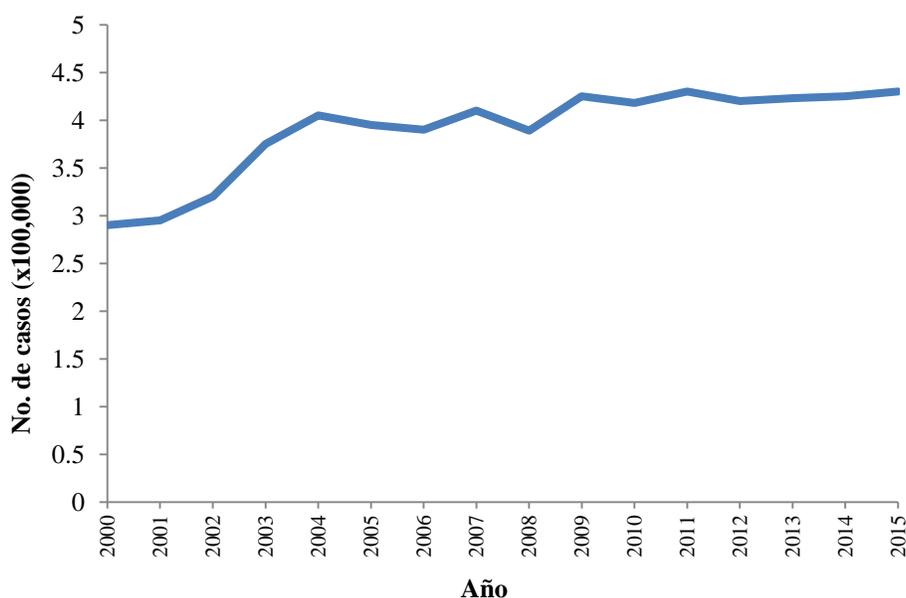
**Cuadro 2.** Los diez principales países/territorios con la mayor cantidad personas con diabetes (20-79 años), entre 2015 y 2040

Lugar	2015		Lugar	2040	
	País/territorio	Número de personas con diabetes (millones)		País/territorio	Número de personas con diabetes (millones)
1	China	109.6 (99.6-133.4)*	1	China	150.7 (138.0-179.4)
2	India	69.2 (56.2-84.8)	2	India	123.5 (99.1-150.3)
3	Estados Unidos de América	29.3 (27.6-30.9)	3	Estados Unidos de América	35.1 (33.0-37.2)
4	Brasil	14.3 (12.9-15.8)	4	Brasil	23.3 (21.0-25.9)
5	Rusia	12.1 (6.2-17.0)	5	México	20.6 (11.4-24.7)
6	México	11.5 (6.2-13.7)	6	Indonesia	16.2 (14.3-17.7)
7	Indonesia	10.0 (8.7-10.9)	7	Egipto	15.1 (7.3-17.3)
8	Egipto	7.8 (3.8-9.0)	8	Pakistán	14.4 (10.6-20.4)
9	Japón	7.2 (6.1-9.6)	9	Bangladés	13.6 (10.7-24.6)
10	Bangladés	7.1 (5.3-12.0)	10	Rusia	12.4 (6.4-17.1)

Fuente: FID, 2015. \*Los datos dentro de los paréntesis muestran el Intervalo de Confianza al 95%, calculado bajo el modelo estadístico de predicción.

Por otro lado, en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2016) se señala que la prevalencia de diabetes, por diagnóstico previo, es del 9.4% (7.2 millones de personas) y se estima que en el 2025 será del 12.3%. En el área urbana se observó una prevalencia del 10.2%, y en la rural del 7.5%. Las mujeres presentaron una prevalencia del 10.3% (3.9 millones) y los hombres del 8.4% (3.2 millones), y la edad más frecuente fue entre 50 y 69 años (61.2%).

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, en 2015 en México existían 11.5 millones de casos de diabetes, y la prevalencia en personas de 20-79 años es del 15.8% ajustado por edad y el 14.7% bruto. A partir del 2003, se han registrado alrededor de 400 mil casos nuevos de diabetes anualmente (Figura 2).



**Figura 2.** Casos nuevos de diabetes tipo 2 en México 2000 a 2015. Fuente: Elaborada a partir de: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.

### **1.1.3 Definición de diabetes mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades caracterizado por una hiperglucemia crónica, resultante de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, que afecta el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (ADA, 2011a). Los efectos de la DM a largo plazo están asociados a un gran número de complicaciones tales como enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedad renal, hipertensión, neuropatías (enfermedad de los nervios), ceguera (retinopatías) (Campbell, 2011). En el desarrollo de la DM están involucrados varios procesos patogénicos, lo cuales van desde la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, con la consecuente deficiencia en la secreción de insulina, hasta la generación de resistencia a insulina. La base de las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas es la acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco, resultado de la inadecuada secreción o disminución en la respuesta de los tejidos a la insulina en uno o más puntos de las vías de acción de esta hormona. El deterioro en la secreción de insulina y los defectos en su acción frecuentemente coexisten en el mismo paciente, no siendo clara cuál es la primera causa de la hiperglucemia (Expert Committee, 2003a; 2003b).

#### **1.1.3.1 Signos y síntomas**

La DM presenta síntomas característicos tales como: polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso, visión borrosa, náuseas, vómito, debilidad, incremento en la susceptibilidad a infecciones (por ejemplo vaginitis), irritabilidad, apatía, impotencia (en hombres), los signos que llevan al diagnóstico de la diabetes son, altos niveles de glucosa en sangre y orina, cetoacidosis y coma (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003 a y b).

Los efectos a largo plazo de la DM incluyen el desarrollo progresivo de complicaciones específicas; por ejemplo, las consecuencias vasculares de la diabetes consisten en anormalidades macrovasculares (macroangiopatía) y microvasculares

(microangiopatía). Las anomalías macrovasculares resultan en aterosclerosis con incremento en enfermedades cerebrovasculares e infarto del miocardio. Las afecciones neuropatológicas afectan al sistema autónomo y a los nervios periféricos y, junto con la insuficiencia circulatoria aterosclerótica en las extremidades, puede producir ulceración crónica y gangrena, en particular en los pies. Las anomalías microvasculares comprenden cicatrización proliferativa de la retina (retinopatía diabética) y enfermedad renal (nefropatía diabética). Las complicaciones microvasculares se explican en gran parte por la hiperglucemia crónica y algunas veces pueden prevenirse controlando esta última. Sin embargo, es poco probable que el control glucémico ayude en el caso de las anomalías macrovasculares. Los pacientes con DM tienen alta incidencia de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares; frecuentemente hipertensión, alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas y enfermedades dentales. El impacto social y emocional de la DM, así como la demanda de terapia efectiva, pueden provocar disfunción psicosocial en los pacientes y sus familiares (Edelstein *et al.*, 1997; Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, a y 2003 b).

### **1.1.3.2 Clasificación**

Se distinguen 4 tipos de diabetes mellitus (DM): tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos específicos entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células  $\beta$ , defectos genéticos en la acción de la insulina y asociada a otros síndromes, tales como: Down, Klinefelter, Cushing y Turner (Committee Report, 1997; WHO, 1999; Expert Committee, 2003a).

#### **1.1.3.2.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**

Antes conocida como DM dependiente de insulina o diabetes juvenil. La DM1 implica destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, resultando en ausencia de insulina. Los

marcadores de la destrucción inmune de las células  $\beta$  pancreáticas incluyen auto anticuerpos a insulina, descarboxilasa de ácido glutámico y fosfatasa de tirosina (IA-2 y IA-2 $\beta$ ). La enfermedad también tiene una fuerte asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad. El índice de este tipo de diabetes es realmente variable, presentándose principalmente en niños y en algunos adultos. Algunos pacientes, principalmente niños y adolescentes, pueden presentar cetoacidosis como la primera manifestación de la enfermedad. Otros, con una moderada hiperglucemia en ayuno que rápidamente cambia a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis, en presencia de alguna infección o de estrés. La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas tiene múltiples predisposiciones genéticas que también están relacionados con factores ambientales. Aunque los pacientes con DM1 son en su mayoría delgados, la presencia de obesidad es incompatible con el diagnóstico. Estos pacientes son propensos a otros desórdenes autoinmunes, tales como: enfermedad de Graves o Addison, tiroiditis de Hashimoto y anemia (Expert Committee, 2003 a y b).

#### **1.1.3.2.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**

Antes conocida como diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNID) o diabetes del adulto. La DM2 se caracteriza por obesidad y resistencia a la insulina, más que por destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas. Los pacientes que padecen este tipo de diabetes regularmente no requieren el uso de insulina en su tratamiento. Esta forma de diabetes regularmente no se diagnostica rápido ya que la hiperglucemia se desarrolla gradualmente y en sus etapas tempranas no alerta al paciente con los síntomas clásicos de la DM. Los pacientes con DM2, presentan aún células  $\beta$  pancreáticas funcionales, sin embargo, la insulina secretada es insuficiente para compensar los niveles de glucosa sanguínea después de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos o grasas. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes se incrementa con la edad, la obesidad y la ausencia de actividad física. Está frecuentemente asociada con una fuerte predisposición genética, a pesar de ello, la genética de esta forma de diabetes es aún poco clara (Expert Committee, 2003a).

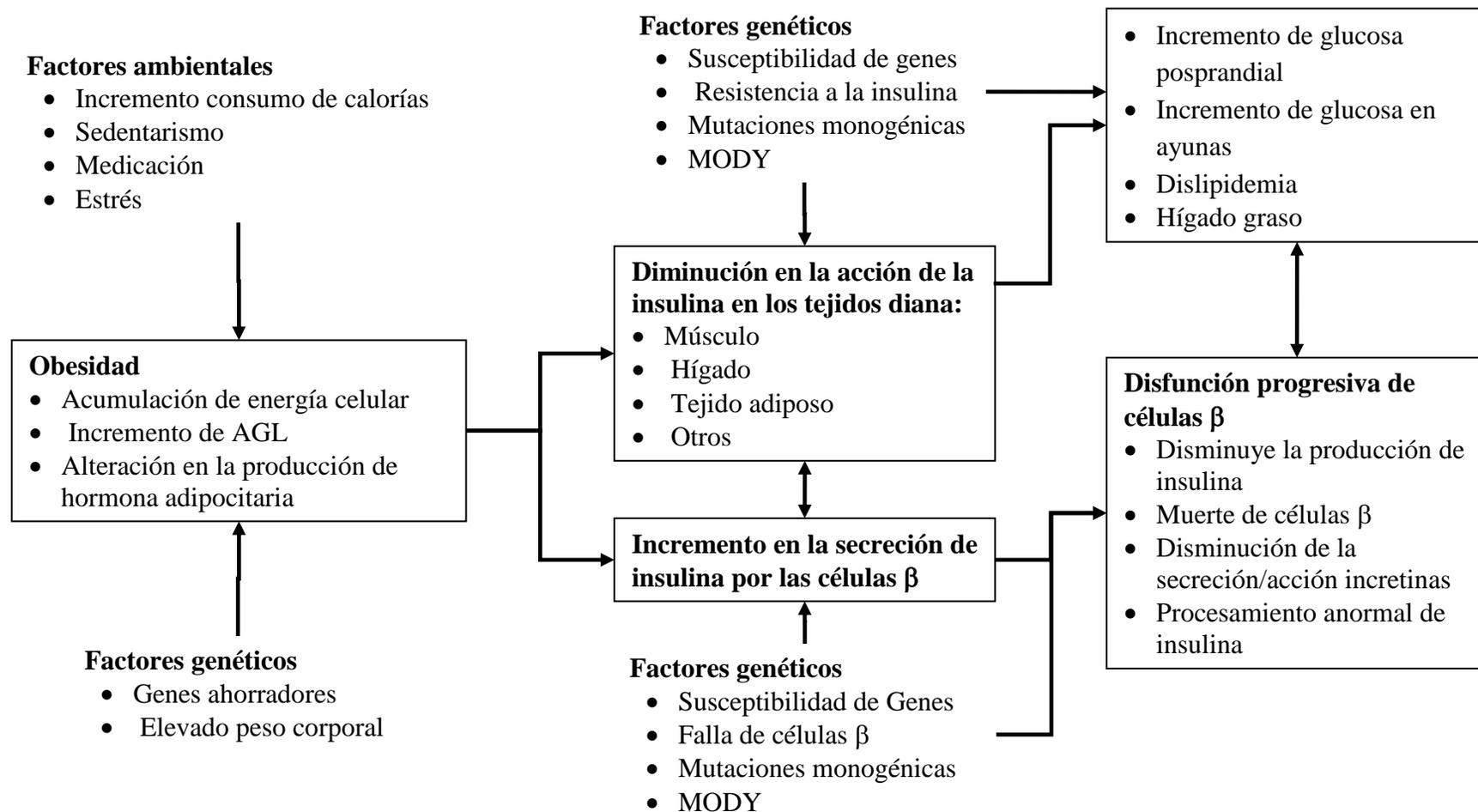
La DM2 implica, por lo tanto, alteración en la secreción de insulina y aumento de la resistencia a la acción de esta hormona, la cual en sus inicios la célula  $\beta$  pancreática deja de responder con incrementos adecuados en la secreción de insulina a los aumentos de la glucosa. Después, se produce elevación en la secreción de insulina, la cual se observa muy frecuentemente cuando existe la obesidad, exceso de consumo de grasas o inactividad física. En esta etapa intermedia el incremento en la insulinos secreción puede todavía ser suficiente, de tal suerte que la tolerancia a la glucosa se mantiene en límites normales; pero después progresa la deficiencia secretora de insulina y se genera resistencia a la insulina (Figura 3) (Committee Report, 1997; Campbell, 2011).

Con el paso del tiempo, el deterioro en la secreción de insulina empeora la tolerancia a la glucosa, aumentando la producción hepática de glucosa muy por encima de su requerimiento y se presenta la hiperglucemia en ayunas (Draznin, 1994).

La DM2 la padecen entre el 80 y el 90% de los pacientes con DM (WHO, 2003; Wild *et al.*, 2004). Sin embargo, existen notables variaciones de acuerdo a raza, país, grupo socioeconómico y presencia de otras condiciones como obesidad, dislipidemia e hipertensión (King *et al.*, 1998).

Este trabajo hace especial referencia a la DM2, la cual es la más común y generalmente aparece en la edad adulta, es decir, después de los 40 años de edad (Expert Committee, 2003 a y b).

Se estima que el 50% de los individuos con DM2 no han sido diagnosticados aún y el 20% de los pacientes que se diagnostican con DM2 presentan datos de complicaciones crónicas en el momento del diagnóstico. La DM2 es la enfermedad endócrina más frecuente y de las principales causas de mortalidad en la sociedad contemporánea; por sí misma es un problema de salud pública frecuente y creciente en México. En el ámbito mundial el predominio de la DM2 ha incrementado dramáticamente en los últimos años debido a la falta de actividad física, obesidad y cambios en los hábitos alimenticios (<http://www.who.int/diabetes/en/>; WHO, 2012).



**Figura 3.** Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2. AGL = ácidos grasos libres; MODY = diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (por sus siglas en inglés). Fuente: Campbell, 2011.

### **1.1.3.2.3 DM gestacional**

La DM gestacional (DMG) se puede definir como cualquier grado de intolerancia a la glucosa con reconocimiento durante el embarazo. La definición aplica sin considerar factores responsables como la insulina, la modificación en la dieta o si la condición persiste después del embarazo. En la mayoría de los casos de DMG, el metabolismo de la glucosa llega a ser adecuado después del parto (Expert Committee, 2003 a y 2003b).

### **1.1.3.2.4 Otros tipos específicos**

Defectos genéticos de las células  $\beta$  pancreáticas. La forma más común está asociada al factor de transcripción hepático (HNF-1 $\alpha$ ). Una segunda forma se encuentra asociada con mutaciones en el gen de glucocinasa. La tercera forma está asociada con la mutación en el gen.

### **1.1.4 Factores de riesgo para DM1 y DM2**

Los estudios realizados por diferentes autores, han demostrado que existen ciertos factores capaces de desencadenar esta enfermedad, entre los que se encuentran: los antecedentes familiares, la edad y algunos factores ambientales (obesidad, dieta rica en carbohidratos, estrés, tabaquismo y alcoholismo, entre otros), dentro de los principales factores de riesgo más comunes para la diabetes son (Expert Committee, 2003a):

- Historia familiar con antecedentes diabéticos (DM1, DM2),
- Historia familiar con enfermedades autoinmunes (DM1),
- Una disminución de la habilidad de la insulina para llevar a cabo su función, por lo que es incapaz de unirse a su receptor (DM2),
- Una disminución de la secreción de insulina por el páncreas (DM2),

- Madre muy joven o anciana (DM1),
- Ser mayor de 40 años (DM2),
- Presentar acumulación de grasa en la región abdominal del cuerpo (DM2),
- Altos niveles de colesterol o triglicéridos en sangre (DM2)

#### **1.1.4.1 Individuos de alto riesgo para desarrollar DM2**

Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la DM2 abarcan un gran número de factores (FID, 2015):

- ❖ Mayores de 40 años
- ❖ Sobrepeso u obesidad
- ❖ Con antecedentes de diabetes en familiares de primer grado
- ❖ Mujeres con antecedentes de hijos de más de 4 Kg. de peso al nacer o antecedentes obstétricos patológicos
- ❖ Menores de 50 años con enfermedad coronaria
- ❖ Antecedentes de diabetes gestacional
- ❖ Con alteraciones en los lípidos sanguíneos
- ❖ Infección por Hepatitis C
- ❖ Miembros de grupos étnicos con alta prevalencia de diabetes mellitus tipo 2, incluyendo personas de naciones del medio Oriente.
- ❖ Tratamiento crónico con corticoesteroides
- ❖ Receptores de trasplante de órganos sólidos
- ❖ Pacientes infectados de VIH tratados con terapia combinada de antirretrovirales
- ❖ Fibrosis pancreática
- ❖ Lipodistrofia (congénita o adquirida)
- ❖ Con hipertensión arterial
- ❖ Síndrome metabólico:
  - ▶ Circunferencia de cintura > 102 cm (H) y 88 cm (M),

- ▶ Triglicéridos  $\geq 150$  mg/dL,
- ▶ Colesterol-HDL  $< 40$  mg/dL (H) y  $< 50$  mg/dL (M)
- ▶ Tensión arterial  $\geq 130/85$  mmHg
- ▶ Glucosa en ayuno  $\geq 110$  mg/dL

### 1.1.5 Diagnóstico de la diabetes

Existen diferentes tipos de pruebas para diagnosticar diabetes, entre las cuales se encuentran: la glucosa plasmática en ayuno (GPA), prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), hemoglobina glucosilada (HbA1c o A1C). Sin embargo, estas pruebas presentan diferentes sensibilidades, ventajas y desventajas. Por ejemplo la GPA es menos sensible que la PTGO, debido a que esta última fue diseñada especialmente para detectar anomalías en el metabolismo de la glucosa en pacientes con niveles normales de GPA.

La PTOG ha llegado a ser conveniente para detectar alteraciones de los valores de glucosa sanguínea en pacientes que no han sido sometidos a ayuno. Esta prueba ha llegado a ser el “estándar de oro” de las pruebas para el diagnóstico de diabetes. Por su parte, la determinación de HbA1, es capaz de indicar un estado crónico de hiperglucemia, no siendo necesario un estado de ayuno para la realización de la prueba, la muestra sanguínea puede ser tomada en cualquier momento del día (Expert Committee, 2003 b).

En el Cuadro 3 se muestran los límites aceptados por la Asociación Americana de Diabetes para el diagnóstico en el desorden del metabolismo de la glucosa por dos métodos, parámetros que se han homologado con la finalidad de recibir un diagnóstico oportuno de cualquier desorden en metabolismo de la glucosa (ADA, 2011b)

**Cuadro 3.** Límites para el diagnóstico en el desorden del metabolismo de la glucosa

Condición	Método			
	Glucosa en ayuno*		Prueba oral de tolerancia a la glucosa; 75 g (Glucosa a las 2 horas)	
	mmol/L	mg/dL	mmol/L	mg/dL
Normal	< 5.6	< 100	< 7.8	<140
Alteración / Intolerancia a la glucosa	5.6 – 6.9	100 – 125	7.8 – 11.1	140 – 199
Diabetes	≥ 7.0	≥ 126	> 11.1	> 200

\*Ayuno: 8 horas o sin aporte energético. Fuente: ADA, 2011b.

### 1.1.6 Tratamiento farmacológico de la DM2

La diabetes mellitus al ser una enfermedad crónica debe ser necesaria una adaptación terapéutica continua ya que evoluciona espontáneamente hacia el empeoramiento de la hiperglucemia y la posible aparición de complicaciones tanto a nivel microvascular como macrovascular; las recomendaciones actuales se orientan hacia el tratamiento farmacológico efectivo con la finalidad de mantener una hemoglobina glucosilada (HbA1c) inferior al 7%. La dieta junto con la actividad física, constituye la base del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, cuando no es suficiente para alcanzar o mantener el objetivo terapéutico es necesario iniciar un tratamiento con un hipoglucemiante oral.

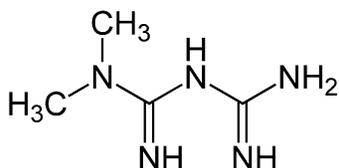
La posología de la monoterapia se ajusta de forma progresiva en función de la tolerabilidad y eficacia del tratamiento, si la monoterapia no permite alcanzar o mantener el resultado esperado, se recomienda verificar el cumplimiento del paciente, si la HbA1c se mantienen por encima de 7% será necesario recurrir a una asociación de dos o tres agentes hipoglucemiantes orales.

### 1.1.6.1 Hipoglucemiantes Orales (HO)

#### 1.1.6.1.1 Sensibilizadores de Insulina

##### 1.1.6.1.1.1 Biguanidas

La metformina (Figura 4) es la única biguanida disponible en el mercado. Reduce la resistencia a la insulina en el hígado y disminuye la producción de glucosa hepática, disminuyendo los niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) en 1-2% (11-22 mmol/mol). La metformina se asocia con una ligera pérdida de peso (Golay, 2008) y una mejoría en la dislipidemia (Valencia y Florez, 2014). La metformina es segura y eficaz en personas mayores con diabetes, no causa hipoglucemia y es la terapia de primera línea (AACE, 2013; ADA, 2014). La acidosis láctica es la reacción adversa más preocupante, pero es rara (incidencia de 9/100 000 personas-año) y el envejecimiento en sí mismo no parece ser un factor de riesgo (Stang *et al.*, 1999).



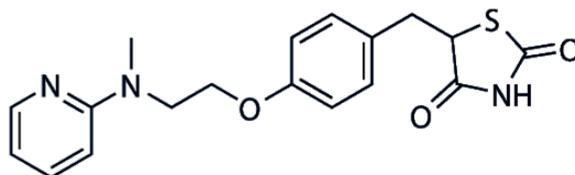
**Figura 4.** Estructura química de Metformina.

Las ventajas del uso de metformina en personas mayores se asocian con menor riesgo cardiovascular, incluso en aquellos con insuficiencia renal (Solini *et al.*, 2013). El uso de metformina se asocia también con menor mortalidad por cáncer (Bo *et al.*, 2012) y una mejor supervivencia en comparación con otros tratamientos para la diabetes (Currie *et al.*, 2012). Un beneficio potencial asociado al uso de la metformina es que disminuye la pérdida de masa muscular en personas mayores (Lee *et al.*, 2011).

### 1.1.6.1.1.2 Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas mejoran la sensibilidad a la insulina principalmente por que funcionan como agonistas receptor activado por proliferadores de peroxisomas tipo gamma (PPAR-gamma), reduciendo con ello la resistencia a la insulina en los músculos y adipocitos, aumentando así la captación periférica y la utilización de glucosa. Generalmente son bien tolerados y eficaces en personas mayores, con un efecto reductor de la glucosa dependiente de la dosis que conduce a una reducción de la HbA1c de ~ 1.5% (15.5 mmol/mol). Las tiazolidinedionas no conducen a hipoglucemia a menos que se utilicen conjuntamente con secretagogos o insulina. Se han utilizado en personas mayores con obesidad, particularmente en aquellos con contraindicaciones o intolerancia a metformina, y como terapia complementaria en personas mayores que tienen un control glucémico subóptimo, a pesar de los grandes requerimientos de insulina.

En este tipo de HO se encuentran las rosiglitazona (Figura 5), glitazonas ciglitazona, englitazona, pioglitazona y troglitazona (Katzung, 1999; Flores-Saénz *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Estructura química de la Rosiglitazona.

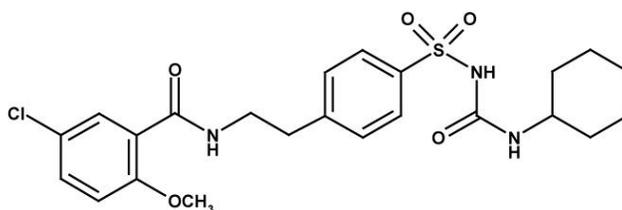
En comparación con los que utilizan pioglitazona, los adultos mayores que han utilizado rosiglitazona tienen un mayor riesgo de morbilidad cardiovascular y mortalidad (Graham *et al.*, 2010; Loke *et al.*, 2011). Por esta razón la pioglitazona sigue estando disponible en la mayor parte del mundo mientras que la rosiglitazona tiene una disponibilidad más restringida (Valencia y Florez 2014).

### 1.1.6.1.2 Secretagogos de Insulina

#### 1.1.6.1.2.1 Sulfonilureas

Las sulfonilureas se unen a un canal de potasio sensible al ATP en la célula  $\beta$ , dando como resultado subsecuente un incremento de calcio intracelular y la liberación de insulina. Son eficaces tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes que presentan diferentes mecanismos de acción. El efecto sobre la disminución de la HbA1c es  $\sim$  1-2% (11-22 mmol/mol) en monoterapia. Las sulfonilureas se han considerado como una terapia de primera línea en personas mayores delgadas con diabetes y un análisis comparativo de efectividad y seguridad mostró ventajas potenciales de su uso como monoterapia (Bolen *et al.*, 2007); Sin embargo, un porcentaje significativo de personas (hasta 10% al año) pierde el control glucémico con el tiempo.

Las sulfonilureas son los HO más empleados en la actualidad para el tratamiento de la DM2. La tolbutamida y la clorpropamida pertenecen a la primera generación, mientras que la glibenclamida (Figura 6), glipicida y glimepirida pertenecen a la segunda generación (Katzung, 1999).



**Figura 6.** Estructura química de la Glibenclamida.

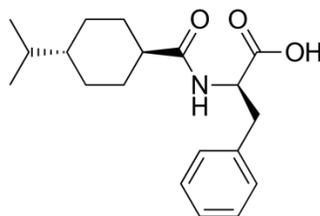
Un efecto secundario común asociado con las sulfonilureas es el aumento de peso, pero la reacción adversa más preocupante es la hipoglucemia. Glibenclamida (fuera de EUA) o gliburida (en EUA) se asocia con un riesgo significativo de hipoglucemia en adultos mayores y se recomienda evitar en este grupo de edad (AGS, 2015). La glipizida, la gliclazida y la glimepirida, entre otras, son sulfonilureas que pueden ser utilizadas en personas mayores. Todavía se recomienda precaución, especialmente en individuos con

insuficiencia renal y hepática, ya que el hígado es el sitio principal del metabolismo y son excretados por los riñones.

Además, se ha propuesto que la hipoglucemia asociada con sulfonilureas puede conducir a caídas y fracturas, pero los datos son limitados, como se ha informando en una revisión sistemática reciente (Lapane *et al.*, 2013).

#### 1.1.6.1.2.2 Meglitinidas

Las meglitinidas tienen un perfil de unión a células  $\beta$  distinto y estimulan la secreción de insulina desde la célula  $\beta$  mediante un mecanismo similar al de las sulfonilureas. Su rápida absorción y su efecto de duración de acción muy corta son las ventajas potenciales de estos fármacos, lo que conduce a una menor frecuencia de eventos hipoglucémicos en comparación con las sulfonilureas convencionales (Germino, 2011). Estos agentes pueden disminuir la HbA1c entre 1-2% (11-22 mmol / mol). En la actualidad, se hallan disponibles dos análogos para uso clínico, la repaglinida y la nateglinida (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura química de la Nateglinida

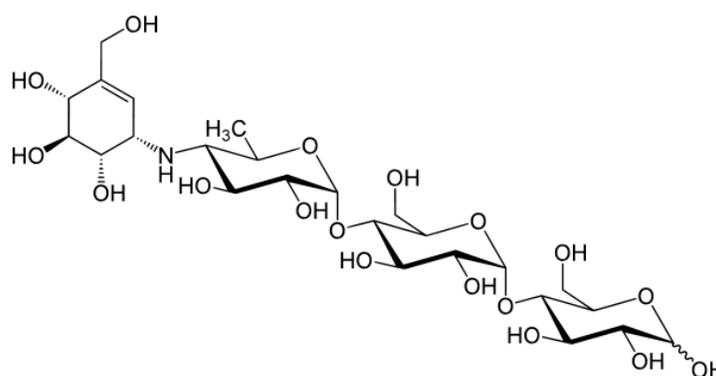
En las personas mayores, el tratamiento con nateglinida, solo o en combinación con metformina, es bien tolerado y produce mejoras significativas en el control glucémico (Schwarz *et al.*, 2008; Israel *et al.*, 2008). De forma similar, la nateglinida mejora la hiperglucemia posprandial cuando se añade a la combinación de insulina basal y metformina, pero aumenta la frecuencia de la hipoglucemia (Juurinen *et al.*, 2009). El

efecto reductor de la glucosa por la nateglinida es menos potente que el de la repaglinida, a pesar de sus efectos glucémicos similares posprandiales. Un ensayo clínico comparando estos agentes se encontró que la repaglinida en monoterapia es más efectiva que la monoterapia con nateglinida para reducir los valores de HbA1c y de glucosa plasmática en ayunas (Rosenstock *et al.*, 2004). Tanto la repaglinida como la nateglinida son metabolizadas principalmente por el hígado; Por lo tanto, deben utilizarse con precaución en individuos con disfunción hepática.

Las meglitinidas pueden ser una opción apropiada para las personas mayores que tienen hábitos alimenticios irregulares, y aquellos que tienen eventos hipoglucémicos frecuentes comparado con las sulfonilureas. Estas ventajas deben equilibrarse con el costo y la adherencia, particularmente en individuos con pérdida de memoria, polifarmacia y riesgo de hipoglucemia (repaglinida > nateglinida) (Stein *et al.*, 2013).

### 1.1.6.1.3 Inhibidores de alfa-glucosidasa

Los inhibidores de alfa glucosidasas disponibles en México, Canadá y Estados Unidos, son la acarbosa (Figura 8) y el miglitol (Katzung, 1999).



**Figura 8.** Estructura química de la Acarbosa.

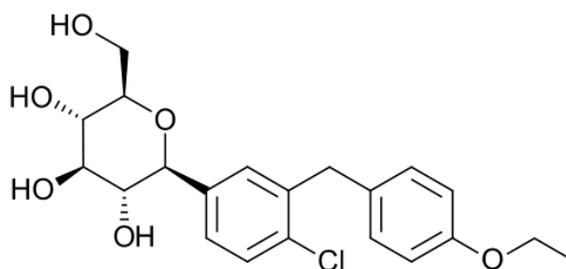
El miglitol y la acarbosa reducen el incremento de glucosa posprandial (reducción de los picos glucémicos) al reducir la descomposición y limitar la absorción de carbohidratos en el intestino. Su efecto general sobre los niveles de HbA1c son una baja reducción entre 0.5-1% (5.5-11 mmol/mol). La administración gradual de la dosis es crucial para minimizar los efectos secundarios gastrointestinales, ya que los carbohidratos residuales en la luz intestinal causan diarrea en el 25% de las personas que toman estos fármacos. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa pueden mejorar con seguridad los niveles de HbA1c en personas con sobrepeso que ya están tomando metformina (Phillips *et al.*, 2003). Se asocian con menor aumento de peso así como de menor frecuencia de hipoglucemia comparado con las sulfonilureas, presentan un perfil de seguridad cardiovascular mejor que otros agentes orales (Standl y Schenll, 2012). La hipoglucemia todavía puede ocurrir si estos agentes se usan en combinación con sulfonilureas o insulina. Es importante destacar que, en este contexto, la glucosa debe ser administrada rápidamente porque la absorción de otros carbohidratos se retrasará como resultado de este medicamento. La acarbosa tiene una absorción sistémica mínima, pero se produce algún metabolismo hepático y existe potencial para la hepatotoxicidad. La acarbosa está contraindicada en individuos con enfermedad hepática avanzada. Por el contrario, hasta un 50-90% de la dosis de miglitol puede ser absorbida pero no se metaboliza en el hígado. Miglitol se elimina a través del riñón, y por lo tanto no debe utilizarse en personas con insuficiencia renal. Miglitol está disponible en algunos países, como Estados Unidos y Canadá, pero puede no estar disponible en varios países de Europa y Asia. Voglibosa es el agente más reciente de esta clase, disponible en su mayoría en Japón, y aunque se ha encontrado que es efectivo, se necesitan más estudios.

#### **1.1.6.1.4 Inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2)**

Los inhibidores del SGLT2 reducen la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal, aumentando su excreción en la orina, reduciendo así las concentraciones plasmáticas de glucosa [reducción de HbA1c de 0.7-1.0% (7.7-11 mmol/mol)]. La reducción de los niveles de glucosa producida por los inhibidores del SGLT2 no depende de la acción de la insulina ni añade sobrecarga a las células  $\beta$ . Este enfoque terapéutico puede complementar las

acciones de otros agentes, y puede ser eficaz incluso en la diabetes refractaria (Chen y Leung, 2013). Los datos de los ensayos clínicos apoyan la seguridad general de los inhibidores de SGLT2, pero todavía hay preocupaciones relacionadas con su impacto a largo plazo sobre el riesgo cardiovascular y la carcinogenicidad (Burki, 2012).

Un ensayo clínico en individuos con diabetes tipo 2 con metformina demostró que, en comparación con la glimepirida añadida, el tratamiento con canagliflozina proporcionó una mayor reducción de la HbA1c y fue bien tolerado (Cefalu *et al.*, 2013). Canagliflozina y dapagliflozina (Figura 9) están aprobados en los EUA, Europa y Australia.



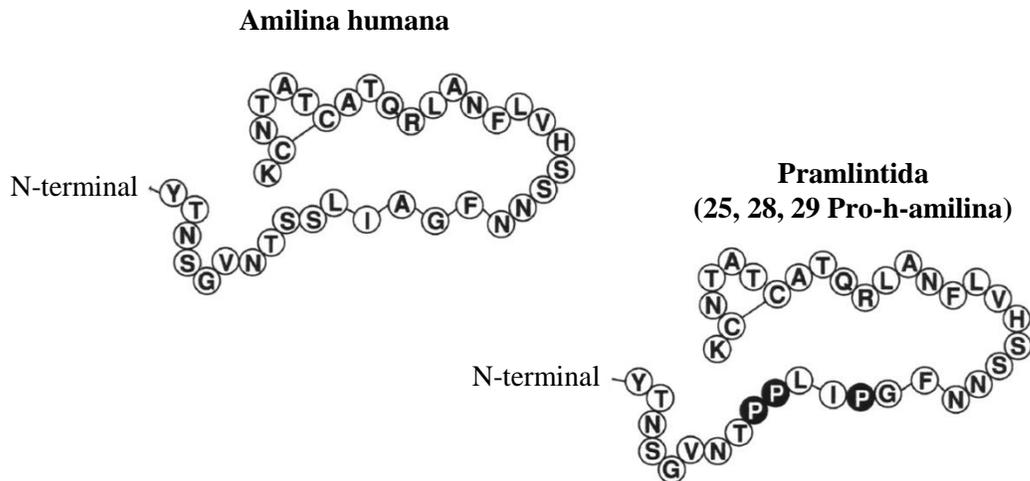
**Figura 9.** Estructura química de la Dapagliflozina.

Aunque estos agentes ofrecen una gran oportunidad para la intervención de la DM2 debido a su diferente sitio de acción, son nuevos en el ámbito clínico. La evaluación cuidadosa de las infecciones micóticas genitales y los eventos adversos osmóticos relacionados (poliuria y polaquiuria) está garantizada para adultos mayores (Valencia y Florez 2014).

#### 1.1.6.1.5 Análogos de la amilina

La Pramlintida es un análogo sintético de la amilina humana (Figura 10), una hormona producida en las células  $\alpha$  pancreáticas. Normalmente se co-secreta con insulina en respuesta a carbohidratos y aminoácidos que en estado postprandial producen: (i) supresión de la secreción de glucagón; (ii) retraso en el vaciado gástrico; y (iii) reducción

del apetito. Pramlintida está indicado como un complemento a la insulina y puede resultar en hipoglucemia grave debido a su capacidad para mejorar los efectos de la insulina (VanDeKoppel *et al.*, 2008)). Reduce los niveles de HbA1c en un 0.5-1% (5.5-11 mmol/mol) y, en contraste con la insulina, puede conducir a una pérdida de peso. Pramlintida está aprobado para su uso en los EUA, pero puede no estar disponible en otros países.



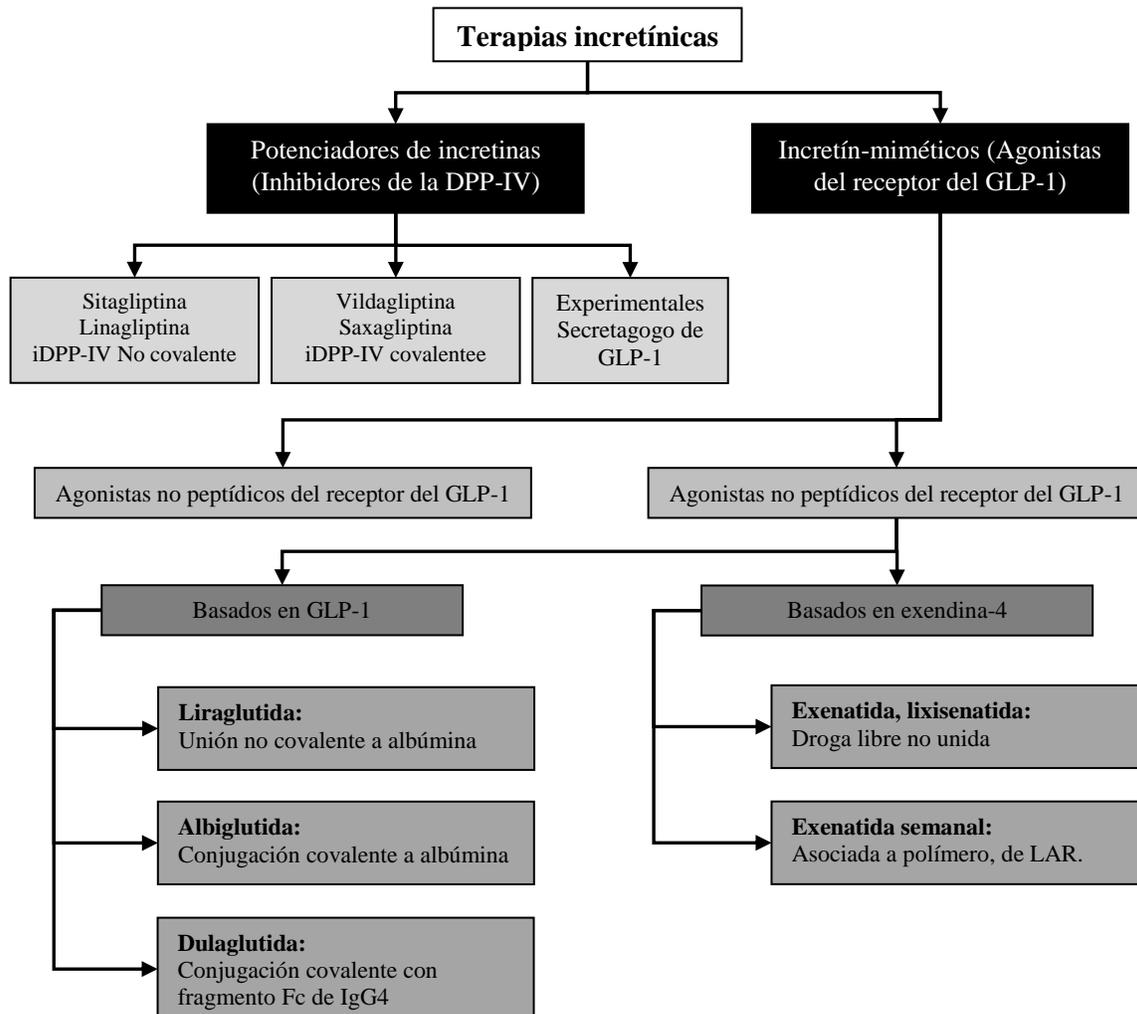
**Figura 10.** Estructura química de la Pramlintida.

#### 1.1.6.1.6 Terapias incretínicas

La secreción de insulina se estimula durante la absorción de alimentos debido a la liberación de hormonas intestinales incretínicas: el péptido-1 similar al glucagón (*glucagon-like peptide 1*, GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (*glucose-dependent insulintropic peptide*, GIP). Hasta un 50-70% de la liberación de insulina posprandial se debe al efecto incretínico. (Jórdar, 2014).

La terapia está centrada en prolongar el efecto de los agonistas del receptor de GLP-1, pudiéndose dividir en: potenciadores del GLP-1 (básicamente inhibidores de la DPP-IV y quizá en un futuro secretagogos del GLP-1) y GLP-1 miméticos ( $_{AR}$ GLP-1) (Figura 11).

El papel tan importante que tiene la hormona GLP-1 en la regulación de glucosa está limitado por dos obstáculos relevantes que reducen la vida media del GLP-1. El primero es la acción de la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV), que escinde un dipéptido de la porción N-terminal del GLP-1 exógeno y endógeno (Deacon *et al.*, 1995) y reduce la vida media del GLP-1 exógeno a menos de 2 minutos. Para evitar la degradación por la DPP-IV se han empleado agonistas del receptor de GLP-1 ( $ARGLP-1$ ) que incluyen moléculas naturales resistentes a la DPP-IV (como Exendina-4), análogos sintéticos del GLP-1 con una sustitución del segundo aminoácido por otro no reconocible por la DPP-IV (por ejemplo, Albiglutida que contiene glicina o CJC-1131 con D-alanina como segundo aminoácido) o análogos del GLP-1 conjugados con grandes moléculas que protegen el sitio de clivaje por la DPP-IV (por ejemplo, liraglutida que contiene un ácido graso de 16 carbonos conjugado con albúmina) (Cho *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2013). El segundo obstáculo deriva de que incluso estos  $ARGLP-1$  resistentes al ataque por la DPP-IV tienen un importante aclaramiento renal por su relativamente escaso tamaño. La unión a grandes moléculas transportadoras favorece el escape al filtrado glomerular: la liraglutida forma enlaces no covalentes con la albúmina a través de la acilación de la molécula con el ácido graso palmítico, la albiglutida está conjugada con albúmina humana recombinante y la dulaglutida, como ejemplo, está conjugada a un fragmento Fc modificado de la inmunoglobulina G (IgG4). Otra posibilidad es incorporar el  $ARGLP-1$  resistente a la DPP-IV a un polímero u otra estructura capaz de facilitar una liberación sostenida, por ejemplo la exenatida –derivado de la exendina-4– de liberación sostenida (LAR, siglas del inglés longacting release, en adelante exenatida semanal) puede administrarse semanalmente al incorporarla en una suspensión de microsferas biodegradables (ácido D, L-láctico-glicólico). También se están ensayando mini-bombas osmóticas del tamaño de un fósforo para su implante subcutáneo que liberan de forma continua exenatida u otros  $ARGLP-1$  (Cho *et al.*, 2012; Cho *et al.*, 2013).



**Figura 11.** Clasificación de las terapias incretínicas. DPP-IV, enzima dipeptidil-peptidasa IV; GLP-1, péptido-1 similar al glucagón; iDPP-IV, inhibidores de la DPP-IV; IgG4, inmunoglobulina G 4; LAR, liberación sostenida (del inglés *long-acting release*). Fuente: Jórdar, 2014.

Los GLP-1 miméticos peptídicos se dividen a su vez en análogos basados en GPL-1 (glutidas) y análogos basados en exendina-4 (xenatidas). El uso de pequeñas moléculas orales con efecto agonista en el receptor del GLP-1 que pudieran imitar la vía natural de absorción y distribución se está probando actualmente en animales (He *et al.*, 2012). No obstante, los potenciadores del GLP-1 más investigados y empleados en la clínica son los inhibidores de la DPP-IV, que aumentan las concentraciones de GLP-1 mediante la inhibición de su degradación (Drucker, 2007). El incremento en GLP-1 que producen es modesto –lo que justifica su menor potencia hipoglucemiante y su ausencia de beneficios

sobre el peso— y no son específicos del GLP-1 al inhibir la degradación de otros péptidos sensibles a la DPP-IV como, por ejemplo, el péptido insulínico glucosa- dependiente. Otras vías de investigación que buscan el aumento de la producción endógena de GLP-1 son la estimulación de receptores acoplados a proteínas G como GPR119 o TGR5 que se expresan en las células L productoras de GLP-1 (Thomas *et al.*, 2009).

La parte de los inhibidores de la DPP-IV se abordará con mayor profundidad en el apartado 1.4.3.

### **1.1.6.2 Insulina**

La diabetes es una enfermedad progresiva con pérdida continua de la función de las células  $\beta$ , y como parte de la historia natural de la enfermedad, la insulina se requiere cuando la dosis máxima de los agentes no insulínicos no logra alcanzar el objetivo personalizado para el individuo con DM2. Las personas mayores generalmente son excluidas en los estudios clínicos con insulina. Mannucci *et al.* (2011) mencionó un análisis de tres subgrupos que son los únicos informes publicados que incluían individuos mayores. Ellos encontraron que la adición de insulina a los tratamientos orales es generalmente segura y eficaz en la mejora del control metabólico, con un bajo riesgo de hipoglucemia. Sin embargo, esto puede no ser aplicable a todos los individuos, y la investigación adicional centrada en las personas mayores todavía se necesita para comprender mejor el régimen de insulina adecuada necesaria para alcanzar las metas glucémicas y reducir al mínimo el riesgo de hipoglucemia.

La insulina es liberada a través de las células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a diversos estímulos, tales como: altas concentraciones de ATP, glucosa, manosa, leucina y arginina (Katzung, 1999). De manera particular, la liberación de insulina estimulada por glucosa es resultado de un estado de hiperglucemia que incrementa los valores intracelulares del ATP, que provoca el bloqueo de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ). La disminución de la corriente eferente de potasio, a través de este conducto, origina la

despolarización de las células  $\beta$  y apertura de conductos de calcio sensibles a cambios de voltaje. El aumento de calcio intracelular que se presenta desencadena la secreción de la insulina (Doyle y Egan, 2003), para que ésta se una a los receptores de membrana de sus tres órganos blanco con el objetivo de introducir la glucosa a las células y, en caso de que se presente exceso, almacenarla en forma de glucógeno. Al unirse la insulina a receptores membranales en hepatocitos, provoca el incremento de la actividad de la glucógeno sintetasa y su unión a receptores de membrana en adipocitos y células musculares provoca la exocitosis y activación de los transportadores de glucosa, aumentando la captación de glucosa (Katzung, 1999; Silberberg y Van Breemen., 1990; Procks *et al.*, 2002).

La insulina es inyectada por debajo de la piel y es absorbida rápidamente. Existen varios tipos de insulina disponibles comercialmente y pueden ser clasificados de acuerdo a la velocidad con la que ejercen su acción y el tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo. Los tipos más comunes de insulina son los siguientes: a) insulina de acción ultra breve. Cuando la insulina (lispro) se inyecta por vía subcutánea, se absorbe rápidamente logrando concentraciones séricas máximas en una hora. El tiempo óptimo de la aplicación preprandial de este tipo de insulina es de 20 a 60 min y en pacientes con DM1 que reciben terapia intensa de insulina, permanece en torrente sanguíneo de 4 a 12 horas; b) insulina de acción breve. La insulina regular está asociada a zinc, es cristalina, soluble, de acción breve y sus efectos son evidentes 30 min después de la inyección subcutánea y, por lo general, permanece de 5 a 7 horas en el torrente sanguíneo. Es particularmente útil para el tratamiento intravenoso en el manejo de la cetoacidosis diabética y cuando los requerimientos de insulina cambian rápidamente, como después de una cirugía o durante infecciones agudas; c) insulinas de acción intermedia y de acción prolongada. Estos tipos de insulina al administrarse en forma subcutánea se absorben rápidamente con acción prolongada, alcanzando sus valores máximos plasmáticos entre la primera y tercera hora después de la aplicación y permanece en sangre por un periodo de 18-26 horas (Katzung, 1999).

Las terapias farmacológicas utilizadas actualmente para el control de la DM2, están basadas incluso en algoritmos matemáticos que se basan en el conocimiento integral del paciente, evolución de la enfermedad, etc. (Inzucchi *et al.*, 2015), el objetivo es hacer más

eficiente el uso de las terapias con las que actualmente se cuenta para mantener la glucemia dentro de los niveles normales. Los planes alimenticios presentan una de las principales vertientes para el buen funcionamiento de la terapia farmacológica, ya que dentro de los alimentos se encuentran sustancias con diferentes actividades que pueden además de nutrir mostrar efectos significativos a la salud, es por ello que durante años se han estudiado muchos componentes alimenticios con la finalidad de evidenciar su potencial sobre la salud.

## 1.2 Amaranto

El amaranto pertenece a la orden Caryophyllales, a la familia Amaranthaceae, la subfamilia Amaranthoideae y género *Amaranthus* (Grobelnik-Mlakar *et al.*, 2009; Délano-Frier *et al.*, 2011). La familia Amaranthaceae tiene 70 géneros y más de 80 especies. Las 3 principales especies que producen granos son *Amaranthus hypochondriacus* (nativo de México), *Amaranthus caudatus* (nativo de Perú) y *Amaranthus cruentus* (nativo de México y Guatemala) (Milán-Carrillo *et al.*, 2012b; López-Mejía *et al.*, 2014). Es una planta herbácea que se eleva de 0.3 a 5 metros de altura con un tallo erguido y una enorme inflorescencia. Las principales partes de la planta de amaranto son raíces, tallo, hojas, inflorescencias y semillas (Kigel, 1994; Rastogi y Shukla 2013). El grano de amaranto fue la base de la dieta humana en las civilizaciones precolombinas (Milán-Carrillo *et al.*, 2012a). Las civilizaciones Aztecas, Incas y Mayas usaban el amaranto en sus dietas (Pavlik 2012). *A. hypochondriacus* es la principal especie de amaranto cultivada en México desde la época precolombina, donde los aztecas utilizaban el amaranto como alimento. Además, usaban el amaranto en sus prácticas religiosas, y por eso, cuando los españoles llegaron a América, prohibieron el amaranto, ignorando sus características nutricionales y agrícolas. Los españoles prohibieron el amaranto porque las civilizaciones precolombinas lo usaron durante sus eventos religiosos, mezclando el amaranto con la sangre humana, porque creían que les daba fuerza (Borneo y Aguirre, 2008; Rastogi y Shukla, 2013).

### 1.2.1 Importancia Agronómica del Amaranto

El grano de amaranto ha presentado interés en los últimos 20 años debido a sus características nutricionales y agrícolas (Zapotoczny *et al.*, 2006; Khandaker *et al.*, 2010; Velarde-Salcedo *et al.*, 2013). El amaranto es una planta C4 (vía de Hatch-Slack), lo que significa que pierde menos agua por transpiración y utiliza el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de manera muy eficiente (Zapotoczny *et al.*, 2006; Délano-Frier *et al.*, 2011). La importancia agronómica del amaranto radica en que es una planta de rápido crecimiento, tiene tolerancia a las condiciones de sequía, puede crecer en suelos pobres y puede ser cultivada a lo largo del año (Brenner *et al.*, 2000; Avanza *et al.*, 2005). Estas características hacen del amaranto un cultivo importante que puede ser utilizado en regiones donde los cultivos convencionales no pueden crecer. Hoy en día, el amaranto se cultiva en muchas partes del mundo, incluyendo Sudamérica, África, India, China y Estados Unidos (Aguilar *et al.*, 2013).

### 1.2.2 Calidad nutricional de las proteínas del amaranto

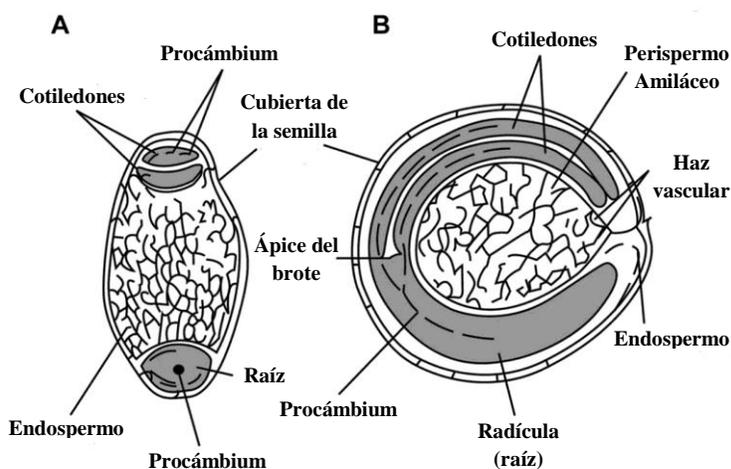
Las proteínas de origen animal como lo son del huevo, leche y carne son las mejores fuentes de proteína debido a que son alta calidad. Sin embargo, tienen un alto costo y en algunos casos producen algunas alergias o intolerancias. Las proteínas de origen vegetal pueden sustituir las de origen animal parcial o totalmente. Las proteínas vegetales se obtienen principalmente de semillas de leguminosas, cereales, oleaginosas y en baja proporción de hojas verdes. Las posibilidades de aprovechamiento en la industria de alimentos dependen tanto de su resistencia al procesamiento como de la presencia de compuestos anti-nutricionales en la fuente vegetal de interés (Tavano *et al.*, 2008, Shevkani *et al.*, 2014).

Este grupo de proteínas se han clasificado y agrupado en términos de solubilidad con el procedimiento de Osborne (1924) en: *albúminas* que se solubilizan en agua, *globulinas* que son solubles en soluciones salinas diluidas, *glutelinas* que son solubles en

soluciones ácidas y alcalinas, y *prolaminas* que se solubilizan en etanol, o según su función en: estructurales, de defensa o de almacenamiento.

La función biológica de las principales proteínas vegetales que se explotan comercialmente es formar parte del endospermo de la semilla, a la que nutren durante la germinación y desarrollo, procesos durante los que se modifican los niveles de las diferentes proteínas. El grupo proteínico preponderante varía de acuerdo al grupo de plantas del que se trate: en el caso de los cereales dominan las glutelinas, en las leguminosas las globulinas (Tovar-Pérez, 2012).

El grano de amaranto es fuente proteínica de alta calidad con un excelente balance de aminoácidos, mejor que el de los cereales y algunas leguminosas (Shevkani *et al.*, 2014). El contenido de proteína de los granos de amaranto ha sido reportado entre un 13% a 19%, además presenta una alta digestibilidad (90%), estas proteínas se encuentran en el embrión (65%, localizado en los 2 cotiledones) y sólo el 35% en el endospermo (Figura 12), mientras que en otros granos las proteínas se encuentran en el endospermo y son más pobres en aminoácidos esenciales (Grobelnik-Mlakar *et al.*, 2010).



**Figura 12.** Semilla de amaranto en secciones: transversal (A) y longitudinal (B) vistas en un microscopio óptico. Fuente: Irving *et al.* (1981).

Las proteínas del amaranto son ricas en lisina que van de 4.9 a 6.1 g de Lys/100 g de proteína, aminoácido limitante en los cereales (Grobelnik-Mlakar *et al.*, 2009). La proteína de amaranto también es una buena fuente de triptófano y aminoácidos que contienen azufre, que normalmente son limitantes en otros granos (Morales de León *et al.*, 2005; Awasthi *et al.*, 2011). En el Cuadro 4 se muestra una comparación de la composición de aminoácidos de diferentes especies de amaranto y algunos otros cultivos tales como maíz, trigo y avena (Senft, 1979; Betschart *et al.*, 1981, Becker *et al.*, 1986; Sánchez-Marroquin *et al.*, 1986, Dodok *et al.*, 1997). La composición equilibrada de aminoácidos del amaranto se aproxima al patrón óptimo de referencia de proteínas en la dieta humana según los requerimientos de la FAO/OMS.

**Cuadro 4.** Concentraciones de aminoácidos esenciales en granos de diferentes especies de amaranto en comparación con otros cultivos

Fuente de proteína	Aminoácidos (g/100 g de proteína)									
	Trp	Met/Cys	Thr	Ile	Val	Lys	Phe/Tyr	Leu	AAL <sup>A</sup>	AAE <sup>B</sup>
FAO/OMS (1973)	1	3.5	4	4	5	5.5	6	7	–	–
Amaranto (promedio) <sup>a</sup>	1.3	4.4	2.9	3	3.6	5	6.4	4.7	67	87
<i>A. cruentus</i> <sup>b</sup>	–	4.1	3.4	3.6	4.2	5.1	6	5.1	84	89
<i>A. cruentus</i> <sup>c</sup>	0.9	4.6	3.9	4	4	6	7.9	6.2	88	95
<i>A. cruentus</i> <sup>c</sup>	–	4.6	3.9	4	4.5	6.1	8.5	6.1	87	96
<i>A. caudatus</i> <sup>c</sup>	1.1	4.9	4	4.1	4.7	5.9	8.1	6.3	90	98
<i>A. hypochondriacus</i> <sup>d</sup>	1.8	4.6	3.3	2.7	3.9	5.9	8.4	4.2	34	88
<i>A. cruentus</i> <sup>e</sup>	1.4	4.1	3.4	3.6	4.2	5.1	6	5.1	73	91
Amaranto (promedio) <sup>a-e</sup>	1.3	4.5	3.5	3.6	4.2	5.6	7.3	5.4	75	91
Cebada <sup>a</sup>	1.2	3.2	3.2	4	4.7	3.2	8.2	6.5	83	97
Trigo sarraceno <sup>a</sup>	1.4	3.7	3.9	3.8	5.2	5.9	5.8	5.8	83	97
Maíz <sup>a</sup>	0.6	3.2	4	4.6	5.1	1.9	10.6	13	35	86
Avena <sup>a</sup>	1.2	3.4	3.1	4.8	5.6	3.4	8.4	7	62	92
Arroz <sup>a</sup>	1	3	3.7	4.5	6.7	3.8	9.1	8.2	69	94
Soya <sup>a</sup>	1.4	3.1	3.9	5.4	5.3	6.3	8.1	7.7	89	98
Trigo <sup>a</sup>	1.2	3.5	2.7	4.1	4.3	2.6	8.1	6.3	47	86

Fuentes: <sup>a</sup>Senft (1979); <sup>b</sup>Betschart *et al.*, (1981); <sup>c</sup>Becker *et al.*, (1986); <sup>d</sup>Dodok *et al.*, (1997); <sup>e</sup>Sánchez-Marroquin *et al.*, (1986). A = valor relativo de aminoácidos limitantes según los requerimientos de la FAO/OMS. B = valor relativo de aminoácidos esenciales según los requerimientos de la FAO/OMS. Adaptado de Grobelnik Mlakar *et al.*, (2009).

La combinación de harina de amaranto y maíz en una proporción de 50:50 casi alcanza la puntuación de 100 (Grobelnik-Mlakar *et al.*, 2009; Rastogi y Shukla 2013). Además, las proteínas de amaranto no contribuyen a intolerancias o reacciones alérgicas en personas con enfermedad celíaca o intolerancia al gluten, debido a que el amaranto es un grano sin gluten (Alvarez-Jubete *et al.*, 2010).

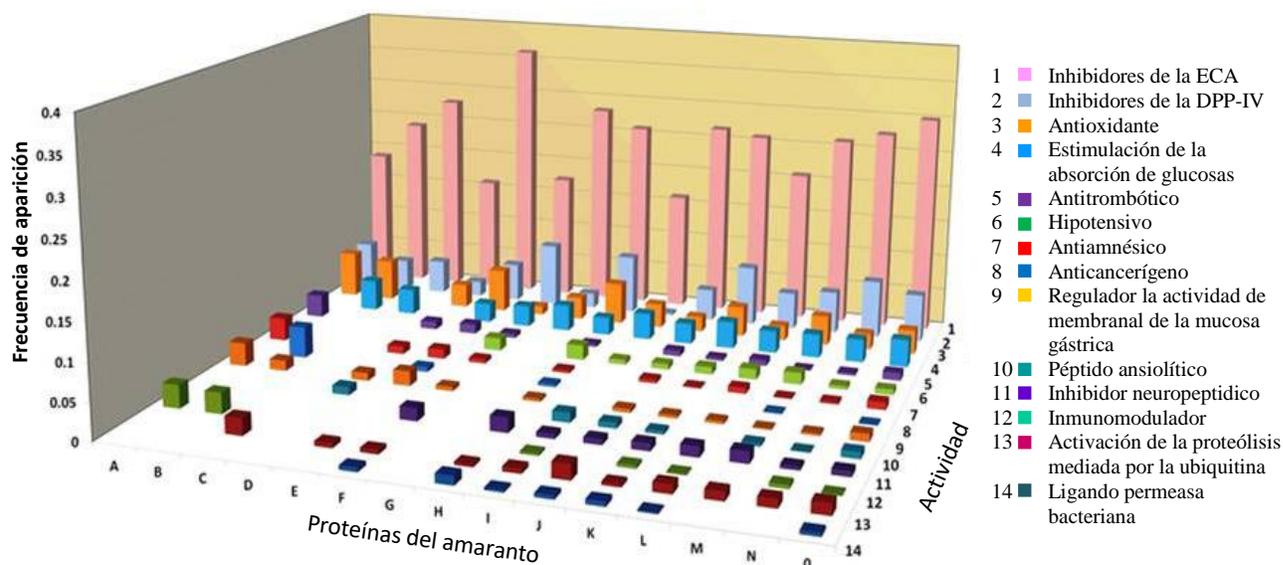
### **1.2.3 Biopéptidos presentes en el grano de amaranto.**

Existen estudios en los cuales se reportan a péptidos con actividad biológica encontrada en el grano de amaranto. Silva-Sánchez *et al.* (2008), publicaron un estudio teórico donde muestran que existen secuencias peptídicas en el grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) en la fracción de glutelinas, que pueden tener actividad de: inhibidores de enzimas (ECA, DPP-IV), antihipertensivas, antioxidante, neuropéptidos, etc. Mostrando una frecuencia de aparición de estas secuencias en un mayor porcentaje en inhibidores de enzimas y de particular interés de serin proteasas, por lo que de acuerdo a dichas secuencias los autores proponen que estos péptidos podrían inhibir a la enzima dipeptidil peptidasa IV, debido a que se encontró una frecuencia de aparición mayor en péptidos con actividad antihipertensiva.

Tovar-Peréz *et al.* (2009) encontraron fracciones péptidicas de globulina y albúmina-1, con capacidad para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) en granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), con esto se prueba que estos péptidos poseen actividad antihipertensiva que puede servir como coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión.

La Figura 13 muestra las diferentes proteínas de amaranto reportadas en la base de datos UniProt y su actividad biológica, así como la frecuencia de ocurrencia de péptidos para cada actividad biológica. La actividad del inhibidor de la ECA (enzima convertidora de la angiotensina) y la actividad del inhibidor de la DPP-IV fueron las actividades más

recurrentes presentes en las proteínas de amaranto, con una frecuencia de aparición  $A = 0.161-0.362$  y  $0.003-0.087$  respectivamente (Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015).



**Figura 13.** Posibles secuencias bioactivas en proteínas de amaranto encontradas después de realizar una predicción científica de péptidos bioactivos presentes en proteínas de amaranto (*in Silico*). En primer lugar, se identificaron las secuencias de proteínas y luego se evaluaron los perfiles de péptidos activos utilizando la base de datos <http://www.uwm.edu.pl/biochemia>. La frecuencia de aparición (A) de fragmentos bioactivos con una actividad particular se calculó mediante la ecuación:  $A = a / N$ , donde "a" es el número de fragmentos formadores de residuos de aminoácidos con actividad dada en proteína y "N" es El número de residuos de aminoácidos de la proteína. Leyenda de la proteína: A = inhibidor de la alfa-amilasa; B = inhibidor de tripsina; C = proteína antimicrobiana; D = proteína 1 de transferencia de lípidos no específica; E = superóxido dismutasa [Cu-Zn]; F = proteína dedo de zinc RING; G = prosistemia; H = Cistatina; I = proteína de semilla; J = Glucosa - 1 - fosfato adenililtransferasa; K = Glucosiltransferasa; L = poliamina oxidasa; M = proteína de almacenamiento globulina 11S; N = almidón sintasa I unida a gránulos; O = Acetolactato sintasa. Fuente: Montoya-Rodríguez *et al.*, 2015.

#### 1.2.4 Inhibidores de serin proteasas en el grano de amaranto.

Existen proteínas que funcionan como inhibidores de proteasas, estas se encuentran presentes en grandes cantidades en la mayoría de las semillas de plantas, y se ha observado que actúan como metabolitos secundarios contra las proteasas digestivas de las larvas de insectos y/o plagas microbianas. Muchos de estos inhibidores son, potencialmente, factores antinutricionales inactivando proteinasas del páncreas de animales superiores (Ryan, 1990).

El inhibidor de la familia I de inhibidores de serin proteasa nombrado así por ser descubierta en la papa (Laskowski y Kato, 1980), se encuentra ampliamente distribuida en semillas y tejidos vegetales de muchas familias de plantas, incluidas las Solanáceas (Wingate *et al.*, 1989 y Graham *et al.*, 1985), Leguminosas (Svendsen *et al.*, 1984 y Nozawa *et al.*, 1989), Cucurbitáceas (Krishnamoorthi *et al.*, 1990 y Ogata *et al.*, 1991) y Gramíneas (Boisen *et al.*, 1981; Williamson *et al.*, 1988 y Svendsen *et al.*, 1982). La familia también incluye un inhibidor en los animales sanguijuela *Eglin* (Seemüller *et al.*, 1980). La estructura tridimensional de *Eglin* y el inhibidor de la cebada (CI-2) se han resuelto, ambos en solución y cristales (Bode y Huber, 1992), y la interacción con enzimas se ha estudiado en detalle, utilizando complejos entre los inhibidores nativos y proteasas, incluyendo subtilisina y quimotripsina (Heinz *et al.*, 1992 y Jandu *et al.*, 1990). Tanto *Eglin* y CI-2, la mayoría de los inhibidores de la familia I, tienen residuos hidrofóbicos (Met, Leu o Ala) en la posición P<sub>1</sub>, que es considerada la posición de interacción entre el inhibidor y la proteasa respectiva (Laskowski y Kato, 1980). La existencia de inhibidores de serin proteasas, ya ha sido reportada (Wingate *et al.*, 1989 y Krishnamoorthi *et al.*, 1990) los inhibidores tienen Lys en esta posición (P<sub>1</sub>) y como era de esperarse son los inhibidores de tripsina, pero su perfil de inhibición no se ha caracterizado.

Hejgaard *et al.*, (1993) reportaron el hallazgo de un nuevo miembro del inhibidor de la papa perteneciente a la familia I de las serin proteinasas. Este inhibidor se conoce como ATSI (por sus siglas en inglés de Amaranth trypsin/subtilisin inhibitor) y fue aislado de *Amaranthus caudatus* L. ATSI tiene un pI= 8.3 y un masa molecular de 7887 Da que contiene 69 aminoácidos y muestra una semejanza del 33.51% con miembros de la familia I de inhibidores de otras familias de plantas.

Estudios realizados por análisis *in silico* por Silva-Sánchez *et al.* (2008) y Montoya-Rodríguez *et al.*, (2015) en el grano de amaranto han mostrado la identificaron secuencias de péptidos bioactivos en las fracciones de albúmina-1, globulina y glutelina, donde por simulación con enzimas gástricas, se mostraron secuencias con actividad inhibitoria enzimática, estas secuencias fueron encontradas en la base de datos UniProt; donde se encuentran secuencias de diversas proteínas del grano de amaranto y a su vez fueron evaluados utilizando la base de datos de BIOPEP para determinar el potencial bioactivo de

los péptidos. Dentro de estas secuencias encontraron las que pueden inhibir la actividad de la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). La enzima DPP-IV es una serin proteasa que modula la actividad biológica de varios péptidos, entre los más importantes están: péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Stephen *et al.*, 2005).

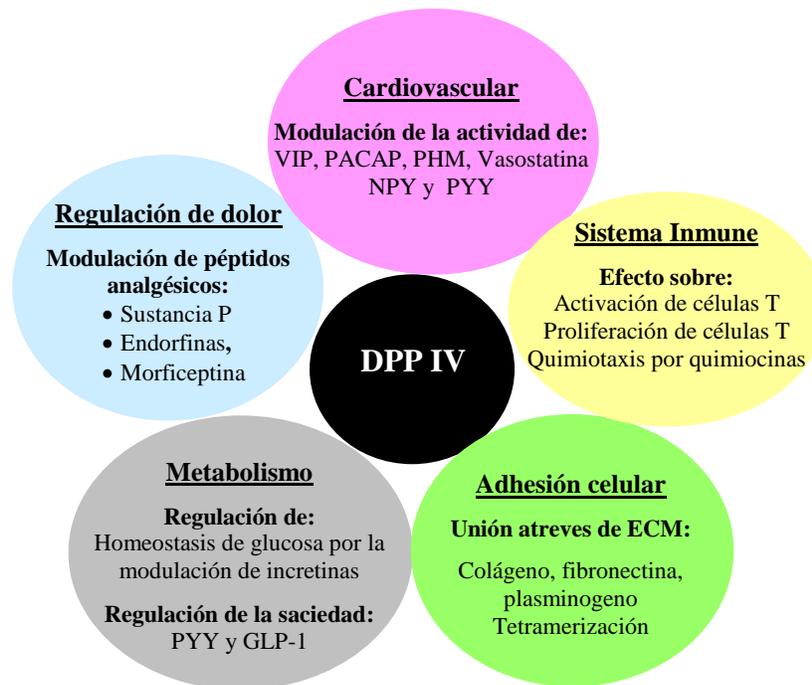
### 1.3 Dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

La enzima DPP-IV (EC 3.4.14.5, también DP 4, CD26, DPP IV, DPP-IV o DPP-4) fue descubierta en la década de los 60's como una aminopeptidasa (Hopsu-Havu y Glenner, 1966). En la década de los 70's, la enzima sirvió inicialmente como una proteína modelo para el estudio del mecanismo catalítico de serin peptidasas y para la investigación específica de los enlaces peptídicos con prolina (Demuth y Heins, 1995). En la década de 1980, se descubrió el potencial de la enzima para convertir péptidos bioactivos *in vitro*, que intensificó la búsqueda de su función *in vivo* (Yaron, 1987). En la década de los 90's se caracterizó por numerosos estudios sobre el papel de la DPP-IV, en la respuesta inmune, en particular, sobre la activación de células T, la transducción de señales y la proliferación de células T (Fleischer, 1994; Ulmer *et al.*, 1992 y Schön *et al.*, 1984).

Se observó que la DPP-IV degradaba al péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), hormonas llamadas incretinas, que tienen la función de regular los niveles de glucosa a través de la estimulación de insulina después de una carga oral de glucosa y reduciendo la liberación de glucagón (Demuth *et al.*, 2005). Fue el descubrimiento del papel de la enzima en la homeostasis de la glucosa que aceleró el diseño de los posibles agentes farmacológicos para el tratamiento de la más importante de las enfermedades metabólicas, la diabetes mellitus tipo 2, y condujo a la primera solicitud de patente para el uso de inhibición de la DPP-IV con el fin de reducir los niveles de glucosa en la sangre (Pauly *et al.*, 1996).

### 1.3.1 Función de la DPP-IV

La DPP-IV funciona como una serin proteasa que se une a un dipéptido de una cadena polipeptídica que contiene una prolina o alanina en la penúltima posición del extremo amino terminal. Los péptidos con residuos distintos a Pro o Ala en la penúltima posición también pueden ser sustratos de la DPP-IV pero de baja afinidad. En contraste, la DPP-IV no es selectiva con respecto a los residuos N-terminal y muestra algo de discriminación de varios residuos del lado principal. Una serie de péptidos biológicamente importantes son sustratos de la DPP-IV *in vitro* (Stephen *et al.*, 2005), en la Figura 14 se muestran los principales procesos fisiológicos afectados por la DPP-IV, uno de los eventos asociados a la inhibición de la DPP-IV es la estabilización del neuropéptido Y, lo cual implica a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) que se muestre una reducción significativa en el comportamiento de ansiedad en los animales de experimentación (Karl *et al.*, 2003).



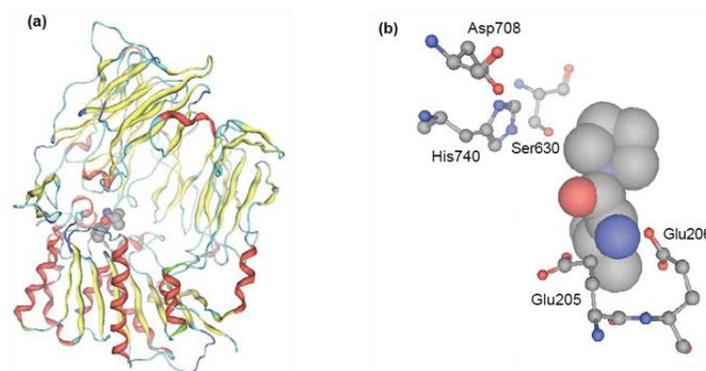
**Figura 14.** Procesos fisiológicos que son afectados por la actividad de la DPP-IV (Demuth *et al.*, 2005).

Los sustratos naturales de DPP-IV incluyen quimiocinas, citocinas, endomorfinas, hormonas de la familia de polipéptidos pancreáticos y casi todos los péptidos de la familia de PACAP/glucagon. Es de particular interés que la modulación de la actividad de la DPP-IV esté implicada en la homeostasis de glucosa y la activación y proliferación de células T.

Debido al impacto que ha tenido la función regulatoria de las hormonas incretinas (GLP-1 y GIP) por la DPP-IV, se ha buscado una gran cantidad de fármacos para inhibir su actividad y dar una mayor vida media a las hormonas antes mencionadas.

### 1.3.2 Estructura de la DPP-IV

DPP-IV es una glicoproteína de 110 kDa expresada en la superficie celular y distribuida ampliamente en todo el cuerpo. La DPP-IV es un homodímero funcional. La secuencia de consenso para DPP-IV es G-W-S-Y-G (Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly) y el sitio catalítico está formado por Ser630, Asp708 y His740 (Figura 15). Se ha demostrado que el estado de glicosilación de la enzima no es importante para la actividad enzimática, la dimerización, y la fijación adenosina desaminasa (Stephen *et al.*, 2005). El sitio catalítico está ubicado en una cavidad entre el dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa y un dominio de ocho hojas hélice.



**Figura 15.** (a) Estructura tridimensional de la DPP-IV, (b) Residuos del sitio activo, destacando la orientación de la tríada catalítica Ser-His-Asp y la presencia de Glu-Glu que es necesario para la selección con el dipéptido y la interacción con inhibidores (Stephen *et al.*, 2005).

Un complejo de la DPP-IV y el inhibidor de la Valpirrolidida demuestran que dos glutamatos (Glu<sub>205</sub>-Glu<sub>206</sub>) en el sitio activo desempeñan un papel importante en la unión del sustrato mediante la formación de un puente salino con el N-terminal de un sustrato péptidico.

## **1.4 Incretinas.**

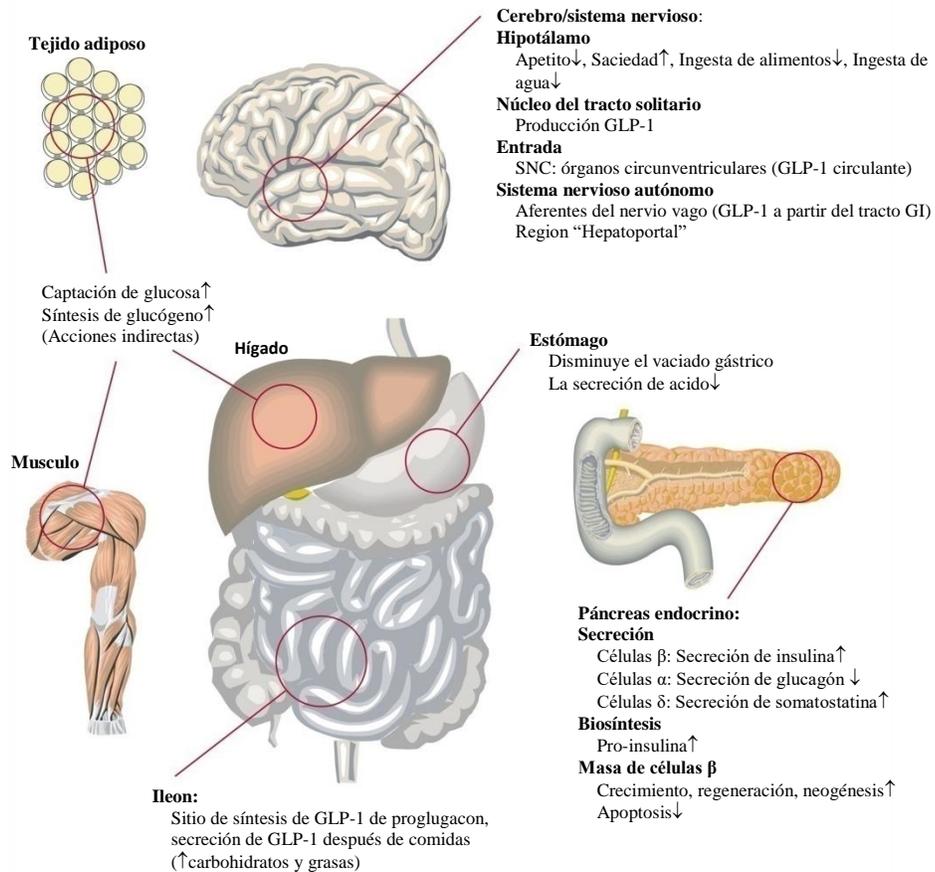
### **1.4.1 Péptido-1 similar al glucagón (GLP-1)**

El descubrimiento en la década de los 80's de que en los mamíferos además del glucagón se encontraba otra hormona con un secuencia peptídica similar a este, hizo que lo nombraran proglucagón, por lo que se inició la búsqueda de la función biológica de estos péptidos adicionales, y se demostró que el GLP-1 era probablemente el más potente agente insulínico, por lo que el interés creció en forma explosiva. Se ha demostrado que GLP-1 se libera en respuesta la ingesta de nutrientes por vía oral y actúa como hormona incretina, estimulando la secreción de insulina inducida por los alimentos. Desde el año de 1992 se demostró que el GLP-1 es también eficaz en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Deacon y Holst, 2002). El GLP-1 es un péptido de 20 ó 31 aminoácidos, derivado de una proteína mayor (proglucagón), que se secreta por las células L, localizadas sobre todo en la porción distal del tubo digestivo (íleon y colon) (Kim y Egan, 2008).

GLP-1 ha demostrado su eficacia en los diabéticos, pero tiene una vida fisiológica muy corta ( $t_{1/2} \approx 2$  min) debido a que la DPP-IV hidroliza el péptido activo (7-36 amida o 7-37) transformándolo en una forma inactiva (9-36 amida o 9-37). La investigación intensa en la industria farmacéutica tiene por objeto descubrir y desarrollar análogos estables de GLP-1, agonistas exógenos de la GLP-1 o moléculas pequeñas inhibidores de DPP-IV tales como péptidos (Stephen *et al.*, 2005).

La unión del GLP-1 a su receptor específico en células  $\beta$  pancreáticas conduce a la activación de la adenilato ciclasa y producción de cAMP. Posteriormente, el GLP-1 estimula la secreción de insulina a través de mecanismos que incluyen lo siguiente: (1) inhibición directa de los canales  $K_{ATP}$ , lo que conduce a la despolarización de la membrana celular; (2) aumento intracelular de los niveles de  $Ca^{2+}$  resultantes de la afluencia dependiente de GLP-1 sobre el  $Ca^{2+}$  extracelular a través de canales propios para  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje por lo que se muestra una activación de canales catiónicos no selectivos y la movilización de almacenes de  $Ca^{2+}$  intracelulares; (3) aumento en la síntesis de ATP mitocondrial, que conducen a la despolarización de la membrana; (4) cierre de los canales  $K^+$  ( $K_v$ ) dependientes de voltaje y consecuentes reducciones de las corrientes  $K_v$ , impidiendo así la repolarización de las células  $\beta$ ; y (5) efectos directos sobre la exocitosis de los gránulos de almacenamiento de insulina de células  $\beta$  que producen aumentos en ATP y  $Ca^{2+}$  intracelular (Baggio y Drucker, 2007).

En la Figura 16 se muestra la fisiología y acción del GLP-1, donde se puede observar la acción biológica de esta hormona intestinal y tanto en personas sanas como en aquellas con diabetes mellitus tipo 2 la concentración del GLP-1 aumenta su secreción tras la ingesta de alimentos y provoca una inmediata respuesta en el páncreas, estimulando la secreción de insulina dependiente de glucosa e inhibiendo la de glucagón. Además, el GLP-1 estimula la síntesis de insulina y sobre las células  $\beta$  tiene efectos tróficos promoviendo su crecimiento, proliferación y posterior diferenciación, así como su regeneración. También hay que considerar otras acciones de GLP-1 como la reducción de la secreción ácida del estómago y la disminución de su vaciado, a nivel de SNC reduce el apetito así como la ingesta de agua (Brubaker y Drucker, 2004).

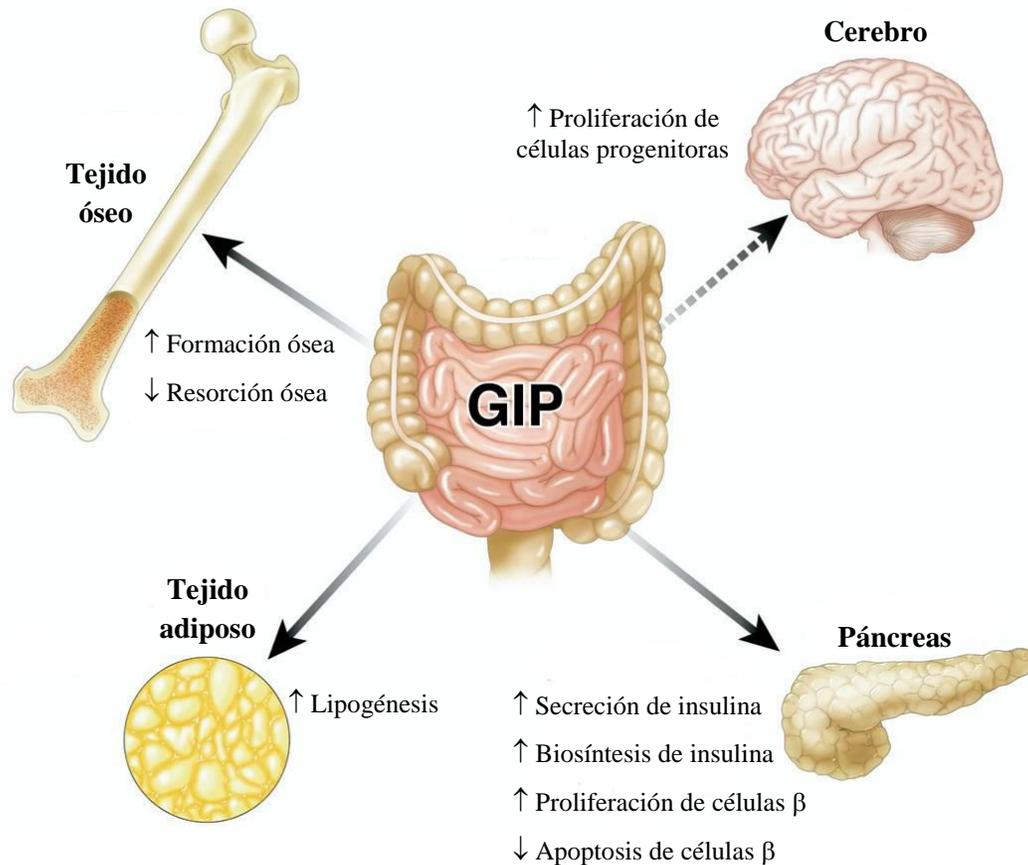


**Figura 16.** Fisiología de la secreción y acción del GLP-1 sobre sus receptores en diferentes órganos y tejidos. SNC = Sistema Nervioso Central; GI: gastrointestinal (Campbell, 2011).

### 1.4.2 Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)

El GIP es un péptido de 42 aminoácidos, derivado de una proteína mayor (ProGIP), que se secreta por las células endócrinas K, presentes sobre todo en la porción proximal del intestino (duodeno y yeyuno proximal) (Kim y Egan, 2008). Para GIP solo se ha encontrado una función bien establecida que es estimular la secreción de insulina en las células β, en respuesta a la ingestión de nutrientes (Ahrén, 2003).

A nivel del páncreas el GIP potencializa la secreción de insulina dependiente de la glucosa se manera análoga al GLP-1 e incluyen aumentos en cAMP, inhibición de canales  $K_{ATP}$ , aumentos de  $Ca^{2+}$  intracelular así como la estimulación de exocitosis. La estimulación de la secreción de insulina por GIP está mediada por la activación tanto de cAMP/PKA como de cAMP/Epac2, además de fosfolipasa A2 y vías de señalización de proteína quinasa específicas. (Kim *et al.*, 2005). A nivel del SNC GIP induce la proliferación de células progenitoras del hipocampo de forma *in vivo*, en animales de experimentación, ratones transgénicos que sobreexpresan la GIPR exhiben una coordinación sensoriomotora mejorada y memoria de reconocimiento en comparación con ratones de tipo salvaje. Por lo tanto, la acción GIP en el SNC puede desempeñar un papel en la proliferación de células progenitoras neurales y modificación del comportamiento (Nyberg, 2005). En el tejido adipocitario se ha observado que la ingestión de grasa es un potente estimulador de la secreción de GIP en los seres humanos y los niveles plasmáticos de GIP se incrementan en algunos individuos obesos. Los efectos anabólicos del GIP en la grasa incluyen estimulación de la síntesis y reesterificación de ácidos grasos, aumento de la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos estimulado por insulina, regulación positiva de la síntesis de la lipoproteína lipasa y reducción de la lipólisis estimulada por glucagón (Gault *et al.*, 2005). Zhong *et al.* (2007) mostraron que el GIP estimula el aumento de cAMP y los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en los osteoblastos cultivados y estos efectos se relacionan con la nueva formación ósea, incluyendo los aumentos de la actividad fosfatasa alcalina y colágeno tipo-1 ARNm, la masa ósea fue mayor en los ratones transgénicos que sobreexpresan GIP en comparación con los controles de tipo salvaje, además se encontró que el GIP también aumenta la densidad mineral ósea en ratas (Figura 17).



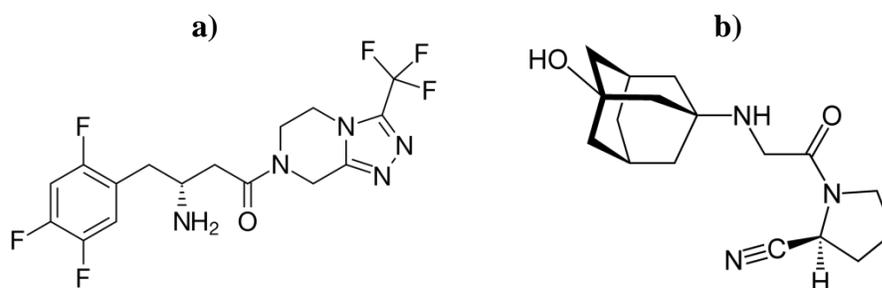
**Figura 17.** Fisiología de la secreción y acción del GIP en diferentes órganos y tejidos (Baggio y Drucker, 2007).

Las acciones reguladoras de la glucosa del GLP-1 y el GIP están mediadas por la unión y activación a sus respectivos receptores (GLP-1R y GIP-R), localizados en diversos tejidos, incluidas las células alfa y beta de los islotes pancreáticos (Gautier *et al.*, 2005).

Durante el ayuno, las concentraciones plasmáticas de GLP-1 y GIP son bajas; sin embargo, la secreción de GLP-1 y GIP aumenta rápidamente tras la ingestión de una comida. Después de ser secretados, el GLP-1 y el GIP son metabolizados rápidamente por la enzima DPP-IV. La vida media plasmática de estas incretinas es breve (alrededor de 2 minutos para el GLP-1 intacto y hasta 5 minutos para el GIP). Tras esta rápida degradación, los metabolitos del GLP-1 y el GIP se eliminan por el riñón (Gautier *et al.*, 2005).

### 1.4.3 Inhibidores de la DPP-IV: efecto incretina

Debido a la función biológica que presentan las incretinas (GLP-1 y GIP) se ha buscado prolongar su vida media, para ello se han desarrollado moléculas con capacidad de inhibir la DPP-IV (o gliptinas) con diferentes estructuras químicas (Figura 18) pero igual mecanismo de acción, así como fisiología de acción fisiológica primaria (Cuadro 5). Estos agentes inhiben la degradación del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), y por tanto, potencian la secreción de insulina dependiente de la glucosa (Figura 19). Los inhibidores de la DPP-IV inhiben la actividad de DPP-IV casi al 100% *in vitro*, manteniendo una inhibición del 80% durante todo el período de tratamiento *in vivo*, prolongando así la semivida de GLP-1 y reduciendo significativamente la HbA1c en general entre 0.7-0.8%, así la glucemia en el ayuno y posprandial. Existen diversos estudios sobre el riesgo en la administración de los inhibidores de la DPP-IV, sin embargo estos estudios no presentan evidencia significativa debido al número de pacientes en dichos estudios.



**Figura 18.** Estructuras químicas de inhibidores de la DPP-IV a) sitagliptina y b) vildagliptina

Un ensayo amplio que incluyó a la saxagliptina un inhibidor de la DPP-IV mostró que no existía riesgo o beneficio cardiovascular global (aunque el seguimiento fue corto, ligeramente más de 2 años) en comparación con placebo. Sin embargo, ocurrieron más hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca en el grupo de terapia activa (3.5% vs. 2.8%,  $P = 0.007$ ) (Scirica *et al.*, 2013). Alogliptina, otro inhibidor de la DPP-IV, tampoco presentó un riesgo cardiovascular excesivo demostrable en un período aún más corto (18 meses) en

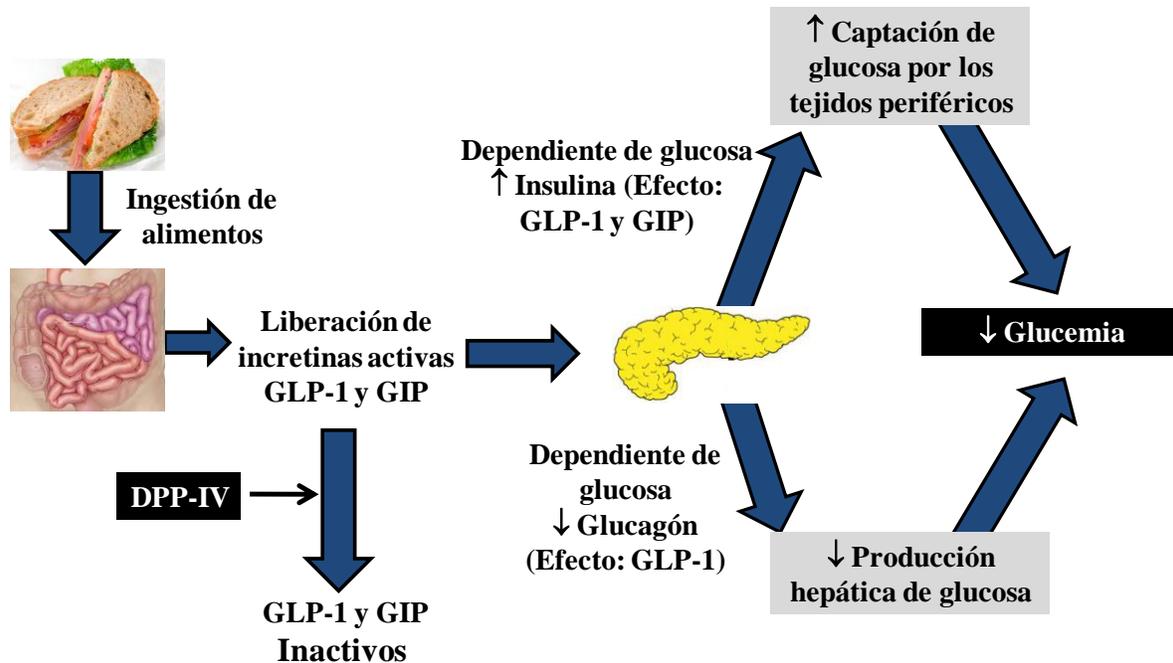
pacientes de alto riesgo (White *et al.*, 2013b). Una base de datos más amplia de interrogación no evidenció ninguna señal de enfermedad cardiovascular o insuficiencia cardíaca (White *et al.*, 2013a; White *et al.*, 2013b). Otros ensayos están en curso, y hasta que los resultados de estos se muestren, esta clase probablemente debería utilizarse con cautela, sobre todo, en pacientes con insuficiencia cardíaca preexistente. Un área de preocupación con esta clase de medicamentos, así como la otra categoría basada en las incretinas, por ejemplo los agonistas del receptor del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), ha sido la seguridad pancreática lo que respecta a un posible desarrollo de pancreatitis como a la neoplasia pancreática. Las pautas de prescripción para estos fármacos incluyen precauciones sobre su uso en individuos con antecedentes de pancreatitis. Si bien esto es razonable, los datos emergentes de grandes conjuntos de datos de observación (Egan *et al.*, 2014), así como de dos grandes ensayos cardiovasculares con inhibidores de la DPP-IV (Scirica *et al.*, 2013; White *et al.*, 2013b), no han encontrado tasas estadísticamente aumentadas de enfermedad pancreática.

**Cuadro 5.** Propiedades de los inhibidores de la DPP-IV disponibles en América y Europa, utilizados para el tratamiento de pacientes con DM2.

Clase	Compuesto	Mecanismo de acción	Acción fisiológica primaria	Ventaja	Desventajas	Costo*
Inhibidores de la DPP-IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sitagliptina</li> <li>• Vildagliptina<sup>†</sup></li> <li>• Saxagliptina</li> <li>• Linagliptina</li> <li>• Alogliptina</li> </ul>	Inhíbe la actividad de DPP-IV, incrementando las concentraciones de incretina activa postprandial (GLP-1, GIP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑Secreción de insulina (dependiente de la glucosa)</li> <li>• ↓Secreción de glucagón (dependiente de la glucosa)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No causan hipoglucemia</li> <li>• Bien tolerados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Angioedema / urticaria y otros efectos dermatológicos mediados por el sistema inmune</li> <li>• Pancreatitis aguda<sup>‡</sup></li> <li>• ↑Hospitalizaciones por insuficiencia cardíaca<sup>‡</sup></li> </ul>	Alto

\* El costo se basa en el miembro más bajo de la clase de hipoglucemiantes orales. <sup>†</sup> Sin licencia en los EUA. <sup>‡</sup>Desventajas que se encuentran en fase experimental. Fuente: Inzucchi *et al.*, 2015.

Los inhibidores de la DPP-IV utilizados para el tratamiento de la DM2 son bien tolerados, sin aumento de peso y muestran pocos efectos adversos, y de particular interés, no aumentan los episodios hipoglucémicos, ya que su mecanismo de acción es dependiente de la glucosa posprandial. Aunque diferentes por su estructura química y propiedades farmacocinéticas, los inhibidores de DPP-IV actualmente disponibles han demostrado una eficacia similar de disminución de la glucosa (Duez *et al.*, 2012).



**Figura 19.** Efecto incretina estimulado por acción de las incretinas y su efecto en la glucemia posprandial (Campbell, 2011).

En general, el uso de cualquier fármaco en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 debe equilibrar una eficacia en la disminución de la glucemia, los perfiles de efectos secundarios, la anticipación de beneficios adicionales, el costo y otros aspectos prácticos de la atención, como el programa de dosificación y los requisitos para la monitorización de la glucosa, son parámetros que se deben evaluar con la finalidad de que el paciente muestre una mejor calidad de vida.

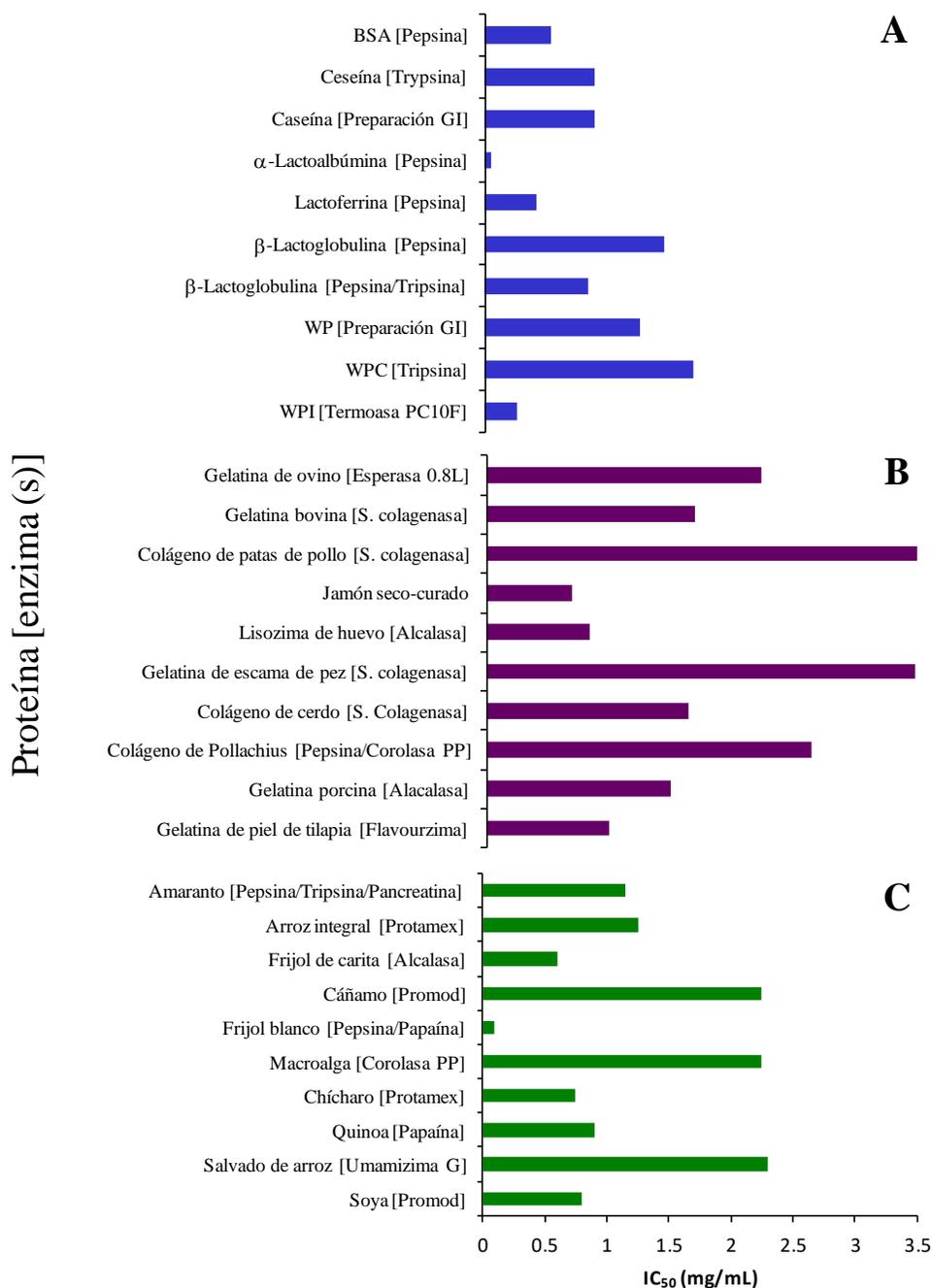
### 1.4.3.1 Inhibidores de la DPP-IV en alimentos

En la literatura se ha informado a través de análisis “*in silico*” la presencia de péptidos inhibidores de la DPP-IV en proteínas de origen alimentario como las proteínas del suero de leche (Tulipano *et al.*, 2011; Tulipano *et al.*, 2012), caseínas de la leche de vaca, colágeno de la carne de bovinos y colágeno del salmón (Lacroix y Li-Chan, 2012b); así como los que se han obtenido por hidrólisis enzimática de proteínas de la leche (Gunnarsson *et al.*, 2006; Lacroix y Li-Chan, 2012a), salvado de arroz (Hatanaka *et al.*, 2012), atún (Huang *et al.*, 2012), amaranto (Velarde-Salcedo *et al.*, 2013), gelatina de piel porcina (Huang *et al.*, 2014) y frijol (Mojica y González de Mejia, 2015).

Se han utilizado muchas proteasas con la finalidad de producir péptidos con la capacidad de inhibir a la DPP-IV. Incluyendo proteasas de grado alimenticio tales como Alcalasa, Flavourzima y Protamex derivadas de microorganismos, así como enzimas obtenidas a partir de animales (pepsina, tripsina, corolasa PP) y plantas (papaína, proteasa de calabaza). Además, también se ha informado que las digestiones de proteínas producidas por digestión gastrointestinal simulada *in vitro* son capaces de inhibir la actividad de DPP-IV, lo que sugiere que los péptidos inhibidores de DPP-IV pueden generarse *in vivo* durante el proceso de digestión.

En la Figura 20 se muestra una la efectividad de diversos hidrolizados proteínicos obtenidos por hidrólisis de proteínas de la leche, de origen animal y vegetal, donde se puede apreciar que de forma *in vitro* los hidrolizados van a mostrar mayor o menor potencia y esto dependerá del sitio de corte de la enzima utilizada para su generación, los péptidos que muestran un alto potencial de inhibición son los derivados de la hidrólisis de la  $\alpha$ -lactoalbúmina con pepsina obteniendo un valor de  $IC_{50}$  de 0.01 mg/mL, Jamón seco-curado mostró un valor de  $IC_{50}$  de 0.75 mg/mL, estos péptidos generados propiamente por el proceso de fermentación del producto y dentro de los péptidos de origen vegetal el frijol blanco (*Phaseolus vulgaris*) ha mostrado valores de  $IC_{50}$  de 0.15 mg/mL (Lacroix y Li-Chan, 2016) lo que indica que los péptidos más potentes, son los encontrados en la leche, sin embargo las proteínas de origen animal son de un valor económico elevado si se

comparan con las obtenidas de fuentes de proteínas de origen vegetal como lo son las de los frijoles.



**Figura 20.** Ejemplos de hidrolizados de proteínas de: leche (A), origen animal (B) y plantas (C) que reportaron tener actividad inhibitora *in vitro* de DPP-IV. BSA, albúmina de suero bovino; GI, gastrointestinal; S. colagenasa, colagenasa de *Streptomyces*; WP, proteína de suero; WPC, concentrado de proteína de suero; WPI, aislado de proteína de suero. Fuente: Lacroix y Li-Chan, 2016.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica de distribución mundial, con elevada morbilidad y mortalidad. El tratamiento primario consiste en mantener la glucemia en límites normales, con hemoglobina glucosilada (HbA1c) del 6 al 7%, sin efectos adversos como hipoglucemia. Actualmente existe una terapéutica que ha demostrado ser eficiente e inocua en la mayoría de los casos, pero sólo en forma temporal debido al curso progresivo de la enfermedad. Los medicamentos son conocidos como inhibidores de DPP-IV, que impiden la degradación de la incretinas, péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) y al péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). Estas hormonas tienen efectos benéficos en el control glucémico a través de efectos pancreáticos (función y masa celular) y extrapancreáticos (reducción del apetito y mayor captación de glucosa).

En el grano de *Amaranthus caudatus* L. se ha identificado y caracterizado un inhibidor de serin proteasas conocido como ATSI (amaranth trypsin/subtilisin inhibitor), mientras que en un hidrolizado trípico de albúmina-1, globulina y glutelina de *Amaranthus hypochondriacus* se identificaron péptidos y tripéptidos que teóricamente tendrían la capacidad de inhibir la actividad de la DPP-IV, sin embargo este tipo de estudios solo se han realizado de forma *in vitro* hasta el momento no existen pruebas *in vivo*, por lo que es necesario evaluar las actividades ya mencionadas en diversos modelos *in vivo* para los péptidos generados por hidrólisis enzimática de las diferentes fracciones del grano de amaranto, así como conocer la forma en la cual causan dicha inhibición enzimática.

Con lo que se podrían diseñar suplementos alimenticios de origen natural que coadyuven al control de la glucemia en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y de esta manera darle un valor agregado al cultivo de amaranto e incentivar su producción en el país.

### 3. HIPÓTESIS

*La hidrólisis de las proteínas de reserva del grano de amaranto, con alcalasa, podría generar secuencias de aminoácidos con capacidad inhibitoria de la enzima DPP-IV, como resultado de este evento, los hidrolizados podrían controlar la glucemia en ratones con diabetes inducida.*

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 Objetivo general.

Obtener y caracterizar hidrolizados de las proteínas de reserva del grano de amaranto que exhiban actividad inhibitoria de la Dipeptidil Peptidasa IV *in vitro* y observar su efecto hipoglucémico en ratones con diabetes inducida.

### 4.2 Objetivos particulares.

1. Aislar y purificar las albúminas, globulinas y glutelinas del grano de *Amaranthus hypochondriacus* L.
2. Hidrolizar las distintas fracciones proteínicas, con alcalasa, a diferentes tiempos y evaluar la capacidad de inhibición *in vitro* de la DPP-IV.
3. Determinar el peso molecular de las fracciones de péptidos con capacidad inhibitoria de la DPP-IV obtenidos en la hidrólisis enzimática de las principales fracciones proteínicas.
4. Purificar las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de DPP-IV.
5. Evaluar los parámetros cinéticos de las fracciones peptídicas con mayor actividad inhibitoria de DPP-IV ( $K_m$  y  $V_{máx.}$ ), así como el tipo de inhibición (competitiva, no competitiva, acompetitiva) y  $K_i$ .
6. Evaluar individualmente el efecto de los hidrolizados proteínicos del grano de amaranto, en la glucemia de ratones: sanos y con diabetes inducida.
7. Evaluar el efecto de los hidrolizados proteínicos del grano de amaranto, en la concentración de insulina y glucagón durante un estudio agudo y crónico en ratones sanos y diabetes inducida.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó grano de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus* adquirido en Tulyehualco, Ciudad de México. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico.

### 5.1 Obtención de harina de amaranto desgrasada

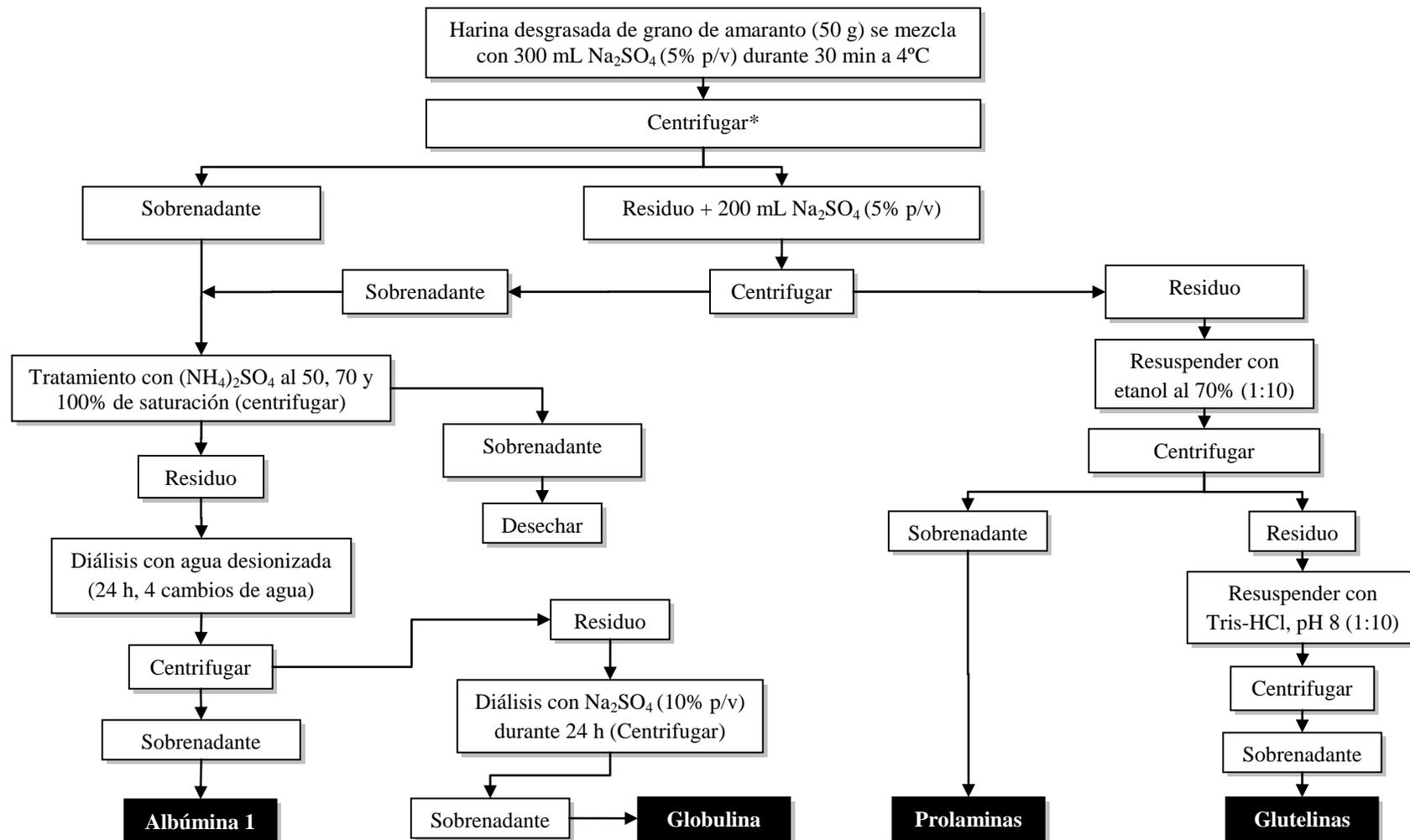
Los granos de amaranto se sometieron a una molienda utilizando un molino (KRUPS GX4100), tras la que la harina obtenida se pasó a través de un tamiz con tamaño de malla de 0.25 mm. La grasa contenida en la harina de amaranto fue extraída utilizando acetona (5 mL/g) en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h (3 repeticiones), seguido de filtración al vacío y un lavado con éter etílico (4 mL/g). La harina desgrasada fue colocada en una campana de extracción (durante 24 h) para permitir la evaporación de los solventes. Nuevamente se hizo pasar a través del tamiz (0.25 mm) y se almacenó a 4°C. El análisis químico proximal de la harina desgrasada se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (2000). El contenido de los componentes fue (g/100g de harina desgrasada): humedad ( $10.86 \pm 0.12$ ), cenizas ( $3.27 \pm 0.06$ ), proteína cruda ( $\%N \times 5.87 = 15.38 \pm 0.18$ ), extracto etéreo ( $0.22 \pm 0.01$ ), fibra cruda ( $4.91 \pm 0.08$ ) y extracto libre de nitrógeno, calculado por diferencia ( $65.36 \pm 0.06$ ).

### 5.2 Extracción de proteínas del grano de amaranto

En la Figura 21 se muestra las fracciones de albúmina 1 (*Alb1*) y globulina (*Glo*) que se extrajeron siguiendo la metodología reportada por Soriano-Santos *et al.*, (1992), así como las fracciones de prolaminas (*Pro*) y glutelinas (*Glu*) cuyo procedimiento se realizó de acuerdo a lo reportado por Barba de la Rosa *et al.*, (2010). La harina desgrasada del grano de amaranto (50g) se mezcló con 300 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% p/v) y se agitó durante 30

min a 4°C. La suspensión se centrifugó a 13000g por 20 min a 4°C. La muestra se separó en sobrenadante y residuo, a este último se le añadieron 200 mL de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% p/v), se agitó durante 30 min y se centrifugó a 13000g por 20 min. La proteína solubilizada (mezcla de sobrenadantes) se precipitó con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 50, 70 y 100% de saturación.

La proteína precipitada se separó por centrifugación (13000g por 20 min a 4°C) y se dializó con agua desionizada (utilizando una membrana Spectra/Por, Spectrum con un tamaño de corte MWCO: 6 – 8 kDa) durante 24 h (con 4 cambios de agua), seguido por centrifugación en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante obtenido contiene la fracción proteínica soluble en agua; Albúminas (*Alb1*). El precipitado recuperado se dializó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10% p/v) durante 24 h y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción proteínica soluble en soluciones salinas; Globulinas (*Glo*). Para las fracciones de prolaminas y glutelinas se realizó un proceso de solubilización simple, al residuo obtenido durante la solubilización con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5% p/v), se resuspendió en etanol al 70% (1:10; proteína:solvente), seguido por centrifugación, esta fracción soluble en etanol al 70% se etiquetó como Prolaminas (*Pro*), al residuo se procedió a resuspender en Tris-HCl, pH 8, 0.1 M (1:10; proteína:solvente), a esta última fracción soluble en bases débiles se etiquetó como Glutelinas (*Glu*). El contenido de nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 2000) utilizando un factor de conversión de 5.87 y la proteína por el método de Bradford (1976), previa elaboración de una curva patrón de albúmina sérica bovina (Apéndice 1-A).



**Figura 21.** Método de extracción de albúmina 1, globulina, prolaminas y glutelinas del grano de amaranto (Soriano-Santos *et al.*, 1992; Barba de la Rosa *et al.*, 2010). \*Todas las operaciones de centrifugado se llevaron a 13000g durante 20 min a 4 °C.

### 5.3 Hidrólisis enzimática de las fracciones proteínicas

La hidrólisis de *Alb1*, *Glo* y *Glu* se llevó a cabo con alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*; actividad específica de 2.4 UA/g, Sigma-Aldrich) a pH 7.4 y 50°C. Se utilizaron las condiciones estudiadas por Tovar-Pérez (2009). Para lo cual se analizaron diversos tiempos de hidrólisis todos a una relación E/S de 0.8 UA/g para las tres fracciones proteínicas analizadas en este trabajo.

El ensayo se realizó en buffer de fosfatos (0.5 M, pH 7.4), añadiendo 600  $\mu$ L de solución de *Alb1*, *Glo* o *Glu* (5 mg/mL) seguido de incubación a 50°C por 5 min. Posteriormente se añadió alcalasa para obtener las relaciones E/S correspondientes. Después de transcurrido el tiempo de digestión, la enzima fue inactivada añadiendo 100  $\mu$ L de solución de fenilmetilsulfonil (PMSF; 2 mg/mL en etanol) seguido por centrifugación a 5000g por 20 min. Se utilizó un blanco para cada fracción proteínica, al cual se le añadieron todos los reactivos pero no se sometió a hidrólisis.

### 5.4 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) de la reacción se determinó por cuantificación de los grupos amino primarios que reaccionan con ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) produciendo un cromóforo, que puede ser detectado a una longitud de onda de 340 nm (Adler-Nissen, 1979).

El ensayo consistió en añadir alícuotas (125  $\mu$ L) del hidrolizado correspondiente en tubos de ensaye que contenían 1 mL de buffer de fosfatos 0.5 M, pH 8.2. Posteriormente se agregó 1 mL de solución de TNBS (1 mg/mL en agua) y la mezcla se incubó a 50°C durante 1h (en oscuridad). Después de la incubación, la reacción se detuvo por adición de 2 mL de HCl (0.1 N). Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min y se midió la absorbencia a 340 nm.

El GH se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%GH = (h/h_{tot}) \times 100$$

Donde  $h$  es el número de enlaces peptídicos que se hidrolizaron y  $h_{tot}$  el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa (*Alb1*, *Glo* y *Glu*), el cual se determinó por hidrólisis con HCl 6 N a 120°C durante 24 h. Ambos  $h$  y  $h_{tot}$  son expresados en meq L-Leucina/g proteína, previa elaboración de una curva patrón de L-Leucina (Apéndice 1-B).

### 5.5 Electroforesis SDS-PAGE

El análisis electroforético de las proteínas y sus respectivos hidrolizados se realizó en mini-placas (Modelo Mini-Protean III, Bio-Rad) de acuerdo al método de Laemmli (1970) [Cuadro 6]. Utilizando un gel concentrador y un gel de separación (4 y 12% p/v de poliacrilamida, respectivamente) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) como se muestra en el Cuadro 7.

**Cuadro 6.** Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE.

Solución	Tris (M)	Glicina (g/L)	pH	SDS (% p/v)
0.5 M Tris-HCl	0.5	-	6.8 <sup>c</sup>	-
1.5 M Tris-HCl	1.5	-	8.8 <sup>c</sup>	-
Buffer de corrida	0.12	72	8.3	0.5
SDS	-	-	-	10
Acilamida-Bisacilamida	Acilamida (% p/v)		Bisacilamida (% p/v)	
30% T <sup>a</sup> , 2.67% C <sup>b</sup>	29.2		0.8	

<sup>a</sup>% Mezcla acilamida-bisacilamida.

<sup>b</sup>% Entrecruzamiento de acilamida-bisacilamida.

<sup>c</sup>% Ajustar pH con HCl concentrado.

Cada muestra se diluyó (1:1) en buffer de muestra (Cuadro 8) seguido de calentamiento en agua en ebullición durante 2 min. Se aplicaron 20  $\mu$ L de cada muestra (2 mg/mL) y la electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante 45 min. Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (0.1% p/v) en metanol-ácido acético (40 y 10% v/v, respectivamente) durante 1 h, y se destiñeron en solución de metanol-ácido acético (40 y 10% v/v, respectivamente) durante 3 h. El peso molecular de las subunidades se determinó aplicando 10  $\mu$ L de un estándar (MW Low-Range, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) con la siguiente composición: deshidrogenasa glutámica (55 kDa); ovoalbúmina (45 kDa); gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa); anhidrasa carbónica (29 kDa); inhibidor de tripsina (20 kDa);  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa); aprotinina (6.5 kDa).

**Cuadro 7.** Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE.

Solución o reactivo	Gel concentrador (4%) <sup>a</sup>	Gel de separación (12%) <sup>a</sup>
Agua desionizada	6.1 mL	3.5 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS (10% p/v)	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Acrilamida-bisacrilamida (30% T, 2.67% C)	1.3 mL	4.0 mL
Desgasificar al vacío	Durante 20 min	Durante 20 min
Persulfato de amonio (10% p/v) <sup>b</sup>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L

<sup>a</sup>% p/v de poliacrilamida.

<sup>b</sup> Preparar el mismo día.

**Cuadro 8.** Composición del buffer de muestra para electroforesis SDS-PAGE.

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4.0
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0
Glicerol	0.8
SDS (10% p/v)	1.6
2- $\beta$ -mercaptoetanol	0.4
Bromofenol (0.05% p/v)	0.2

### 5.6 Electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE

Las fracciones de *Alb1*, *Glo* y *Glu* y sus respectivos hidrolizados también se aplicaron a geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y tricina para el análisis electroforético de acuerdo al método de Schagger y Von Jagow (1987) [Cuadro 9]. Utilizando un gel concentrador, un gel espaciador y un gel de separación (Cuadro 10). La electroforesis se realizó en mini-placas (Modelo Mini Protean III, Bio-Rad). Cada muestra se diluyó (1:1) en buffer muestra (Cuadro 11) seguido de calentamiento en agua en ebullición durante 2 min. Se aplicaron 20  $\mu$ L de cada muestra (2 mg/mL) y la electroforesis se llevó a cabo a 90 V durante 2.5 h.

**Cuadro 9.** Soluciones stock para la preparación de geles de electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Solución	Tris (M)	Tricina (M)	pH	SDS (% p/v)
Buffer ánodo	0.2	-	8.9 <sup>c</sup>	-
Buffer cátodo	0.1	0.1	8.25	0.1
Buffer gel	3.0	-	8.45 <sup>c</sup>	0.3
Acrilamida-Bisacrilamida	Acrilamida (% p/v)		Bisacrilamida (% p/v)	
49.5% T <sup>a</sup> , 3% C <sup>b</sup>	48		1.5	

<sup>a</sup>% Mezcla acrilamida-bisacrilamida.

<sup>b</sup>% Entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida.

<sup>c</sup>% Ajustar pH con HCl concentrado.

Los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (0.1% p/v) en metanol-ácido acético (40 y 10% v/v, respectivamente) durante 1 h, y se destiñeron en solución de metanol-ácido acético (40 y 10% v/v, respectivamente) durante 3 h. El peso molecular de las subunidades se determinó aplicando 10  $\mu$ L de un estándar (MW Ultra Low-Range, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) con la siguiente composición: ovoalbúmina (45 kDa); gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa); anhidrasa carbónica (29 kDa); triosa-fosfato-isomerasa (26.6 kDa); mioglobina (17 kDa);  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa); aprotinina (6.5 kDa); insulina, cadena  $\beta$  (3.5 kDa).

**Cuadro 10.** Composición de los geles de electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Solución o reactivo	Gel concentrador (4% T, 3% C)	Gel espaciador (10% T, 3% C)	Gel de separación (16.5% T, 3% C)
Acrilamida-bisacrilamida (49.5% T, 3% C)	1 mL	2 mL	3.3 mL
Buffer gel	3.1 mL	3.3 mL	3.3 mL
Glicerol	-	-	1.1 mL
Desgasificar al vacío	Durante 20 min	Durante 20 min	Durante 20 min
Añadir agua desionizada para obtener un volumen final de:	12.5 mL	10 mL	10 mL
Persulfato de amonio (10% p/v) <sup>a</sup>	150 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
TEMED	15 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

<sup>a</sup>Preparar el mismo día.

**Cuadro 11.** Composición del buffer de muestra para electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4.0
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0
Glicerol	1.0
SDS (4% p/v)	1.6
2- $\beta$ -mercaptoetanol	0.2
Bromofenol (0.5% p/v)	0.2

## 5.7 Cromatografía de filtración en gel

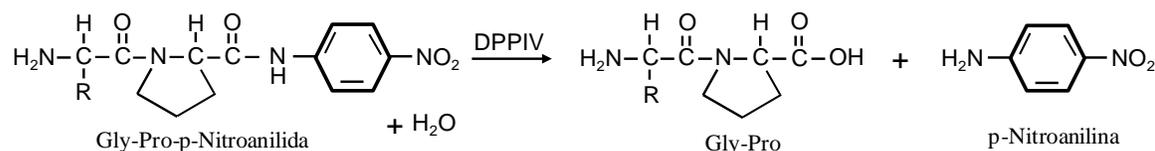
Los hidrolizados de *Alb1*, *Glo* y *Glu* se caracterizaron con base a su peso molecular relativo ( $M_w$ ) utilizando una columna Sephadex G-50 (1.5 x 30 cm, Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrada previamente con un buffer de fosfatos: 32.5 mM  $K_2HPO_4$  – 2.6 mM  $KH_2PO_4$ , 0.4 M de NaCl, 20 mM de 2- $\beta$ -mercaptoetanol y 3.1 mM de azida de sodio (pH 7.5,  $\Gamma = 0.5$ ). Para la determinación del volumen vacío ( $V_o$ ) y volumen total ( $V_t$ ) de la columna se utilizó azul de dextrano (2 mg/mL) y DNP-alanina (0.5 mg/mL), respectivamente.

Se inyectó 500  $\mu$ L de muestra (5 mg/mL) y la elución se realizó con el mismo buffer a un flujo de 0.3 mL/min. Se colectaron fracciones de 1.5 mL y la absorbencia se detectó a 214 nm. Las fracciones obtenidas se clasificaron con base en su  $M_w$  en: proteína (>10 kDa); proteosomas (5 – 10 kDa); peptonas (1 – 5 kDa); péptidos (0.25 – 1 kDa) y aminoácidos (0.075 – 0.2 kDa) de acuerdo a Guadix *et al.*, (2000) y Chang *et al.*, (2007). El  $M_w$  de las fracciones se determinó mediante la elaboración de una curva patrón, aplicando 125  $\mu$ L de un estándar (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) con la siguiente composición: triosa-fosfato-isomerasa (26.6 kDa); mioglobina (17 kDa);  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.2 kDa); aprotinina (6.5 kDa); insulina (3.5 kDa); bradicinina (1.06 kDa; Apéndice 2). Finalmente, se calculó el área bajo la curva de las fracciones (picos) obtenidas para estimar el porcentaje (%) que representa cada especie en el hidrolizado crudo, utilizando el software SigmaPlot®, v. 12.0.

## 5.8 Determinación de la actividad inhibitoria de la DPP-IV

La actividad de la enzima DPP-IV (D7052; Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA, de riñón de cerdo) se determinó por un método espectrofotométrico. Utilizando como sustrato Gly-Pro-pNA (G0513 de Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA). Para esto se utilizaron microplacas de 96 pocillos midiendo el incremento en la absorbencia a 405 nm con un lector

de ELISA (Bio Tek  $\mu$  QUANT; Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA.). La actividad enzimática se determinó utilizando una concentración final de 0.1 mM de Gly-Pro-pNA en buffer 100 mM de Tris, pH 8.0 (buffer A) a 37°C (Kojima *et al.*, 1980). Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu$ mol p-nitroanilina por min bajo las condiciones del ensayo (Figura 22). Para calcular los  $\mu$ mol p-nitroanilina se procedió a realizar una curva patrón de p-nitroanilina (N2128 de Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA) bajo las mismas condiciones del ensayo (Apéndice 1-C). La cinética de estudio control se realizó utilizando 0.05 – 5 mM de Gly-Pro-pNA en el buffer A a 37 °C, el valor de Km para Gly-Pro-pNA se estimó en  $0.22 \pm 0.01$  mM (Apéndice 3). Los hidrolizados liofilizados se disolvieron en el buffer A. La disolución del hidrolizado (50  $\mu$ L) se mezclaron con 100  $\mu$ L de 1.0 mM Gly-Pro-p-nitroanilida (contenida en el buffer A). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 20 min, seguido por la adición de 50  $\mu$ L de DPP-IV (diluida en bufer A; obteniendo 4 mU de concentración final). La mezcla reacción se monitoreo durante 15 min y los datos registrados se presentaron frente al tiempo y la actividad de la DPP-IV se cuantificó a partir de la parte lineal de la curva. La mezcla de reacción se detuvo adicionando 100  $\mu$ L de un buffer 1 M de acetato de sodio (pH 4.0). El porcentaje de inhibición se determinó en relación a la velocidad obtenida sin fracciones peptídicas. Los valores de concentración inhibitoria media-máxima (IC<sub>50</sub>) se calcularon representando gráficamente el logaritmo de la concentración del hidrolizado (mg/mL) frente a la actividad inhibitoria de la DPP-IV (%).



**Figura 22.** Reacción del la DPP-IV con el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA.

## **5.9 Ensayo biológico**

### **5.9.1 Animales y protocolos de investigación**

Para todos los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones macho cepa CD1 de 20-40 gramos de peso corporal, ocho semanas de edad. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) quien se apega a los lineamientos contemplados en la NOM-062-ZOO-1999. El suministro de agua y alimento a los animales fue *ad libitum*, excepto cuando se requirieron condiciones de ayuno.

### **5.9.2 Efecto agudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos**

#### **5.9.2.1 Inducción de diabetes con STZ**

Animales sanos (n=30) con acceso libre a agua y alimento a los cuales se les provocó una diabetes químicamente inducida. Se realizó el procedimiento reportado por Ventura-Sobrevilla *et al.* (2011) para lo cual los animales sin ayuno recibieron dos dosis de 40 mg/kg administrados vía intraperitoneal de estreptozotocina (STZ), la cual fue disuelta en buffer de citratos estéril (0.1 M, pH 4.5), preparada justo antes de su administración. Se trabajó con una solución de 13.7 mg STZ/mL y se administraron 0.1 mL por cada 10 g de peso. El desarrollo de diabetes fue confirmado hiperglucemia ( $\geq 150$  mg/dL) y pérdida de peso en ratones sin ayuno, dos semanas después de la administración de la STZ. La STZ fue administrada en un lapso no mayor a 15 min después de su resuspensión con buffer de citratos.

#### **5.9.2.2 Administración de tratamientos**

Para encontrar la cantidad de hidrolizado liofilizado el cual causaba una respuesta sobre la glucemia de los animales de estudio se procedió a evaluar distintas dosis de

hidrolizado, el cual fue reportado como concentración de proteína, se consideró que durante una administración aguda, en la cual realizará una reducción de la glucemia entre un 15 y 20% de los animales de experimentación (n=5), mostraría la respuesta útil para el presente estudio (Apéndice 4).

Para el ensayo agudo se utilizó una dosis de 300 mg/kg de hidrolizado proteínico de las diferentes fracciones proteínicas (*Alb-1*, *Glo*, *Glu*). Los extractos fueron disueltos al momento de la administración con agua desionizada que fue usada como vehículo. La prueba realizada para la evaluación de los hidrolizados fue una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) dividiendo en cinco grupos (n=5), los cuales el grupo uno llamado control solo se administró solución fisiológica, el grupo dos llamado control positivo a cual se le administro en fármaco inhibidor de la DPP-IV: Sitagliptina (580 mg/kg), los tres grupos restantes se les administró los tres diferentes hidrolizados con la dosis antes mencionada. La POTG se realizó mediante la administración de los hidrolizados, seguido de la administración oral de glucosa (2g/kg), cada evento se efectuó cada 30 min. Los niveles de glucosa se midieron después de la carga oral cada 30 min hasta las 2 horas (Matsuyama-Yokono et al., 2009). La glucemia fue determinada con un glucómetro (Accu- Chek®, Roche), tomando una muestra de sangre de la vena caudal, mediante punción con efracción de la epidermis de la cola del animal.

### **5.9.3 Efecto subagudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos**

El tratamiento subagudo se realizó durante 30 días de la administración de los hidrolizados proteínicos, el procedimiento de la POTG, la determinación de la glucemia en este estudio fue el mismo que el presentado en el tratamiento agudo.

#### **5.9.4 Obtención de suero y determinación de insulina y glucagón**

Después de medir las glucemias, los animales fueron anestesiados con pentobarbital. La sangre fue recolectada del seno orbital, después fue centrifugada a 1000 x g por 10 min a 4 °C, finalmente el suero fue separado y almacenado a -70°C. La concentración de insulina y glucagón sérico fueron determinados siguiendo las instrucciones del fabricante mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) adquirido de ALPCO® (80-INSMS-E01 y 48-GLUHU-E01; respectivamente). Las curvas estándar obtenidas por ambos kits se muestran en el apéndice (5-A y 5-B).

#### **5.10 Análisis estadístico**

Cada dato representa la media de tres muestras que se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey y el nivel de significancia empleado fue  $\alpha = 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Composición de las fracciones proteínicas

En el Cuadro 12 se muestra el rendimiento obtenido en la extracción de las principales fracciones de proteínas del grano de amaranto, esta separación proteínica revela que el mayor contenido de proteína se encuentra en la fracción de albúminas (46 %), seguido de la fracción de glutelinas (22%) y por último la fracción de globulinas (12%), la fracción de prolaminas no superó el 1% del contenido de proteína esto expresado por cada 100 g de proteína, este contenido de proteína es similar a lo reportado por diferentes autores (Gorinstein *et al.*, 1991a; Martinez *et al.*, 1997) donde mencionan que el grano de amaranto según la clasificación Osborne (1924) se compone de tres grandes fracciones proteínicas: albúminas, glutelinas y globulinas que representan 51, 24 y 16% respectivamente y una fracción menor soluble en alcohol o prolamina entre 1.4 y 2.0%. Mientras que las prolaminas representan las principales proteínas de almacenamiento en cereales tales como trigo o maíz, las proteínas de almacenamiento de las plantas dicotiledóneas son principalmente albúminas y glutelinas (Gorinstein *et al.*, 2002; Drzewiecki *et al.*, 2003). Este cambio de las fracciones proteínicas del grano de amaranto (también llamado pseudocereal) comparado con otros cereales, es debido a que en el germen y el endospermo del grano de amaranto se encuentra el 65 y 35% respectivamente del total de la proteína, en comparación con el contenido promedio de proteína (15 y 85%) respectivamente, en la mayoría de los cereales. Debido a que el contenido de prolaminas encontradas en este estudio no son representativas, no se tomaron en cuenta para continuar analizando.

Según Gorinstein *et al.* (1999) las proporciones de proteína para el amaranto son similares a las del arroz. Usando microscopía electrónica de barrido (SEM) y electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), Gorinstein *et al.* (2004) encontraron una estrecha similitud entre las fracciones proteínicas de amaranto y soja. Además diversos autores (Gorinstein *et al.*, 2001; Gorinstein *et al.*, 2004) han reportado diferencias en la composición

prolaminas comparando con diversos cereales, mientras que la fracción de glutelina mostró algunas similitudes con el maíz.

**Cuadro 12.** Rendimiento en el fraccionamiento de la proteínas del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.)

Fracción proteínica <sup>a</sup>	g/100g de harina desengrasada	g/100g de proteína
Albúmina 1	6.49 ± 0.51	46.41 ± 3.71
Globulina	1.69 ± 0.12	12.08 ± 1.32
Prolamina	0.13 ± 0.00	0.98 ± 0.05
Glutelina	3.13 ± 0.28	22.4 ± 2.01

<sup>a</sup> Determinado por el método de Bradford (1976).

## 6.2 Caracterización fisicoquímica de los hidrolizados proteínicos

La hidrólisis enzimática de las proteínas modifica sus propiedades moleculares, produciendo principalmente disminución del peso molecular, aumentó de la carga y liberación de grupos hidrofóbicos. Estas características moleculares del hidrolizado determinarán evidentemente el uso que se le quiera dar al mismo. Por lo cual, es de gran importancia evaluar estos cambios moleculares, ya que reflejarán varias propiedades físicas y químicas de las moléculas, y que repercutirán en sus propiedades bioactivas de los mismos. Estas propiedades pueden ser detectadas mediante varios métodos analíticos (grado de hidrólisis, cromatografía de exclusión molecular, hidrofobicidad, entre otros) (Tovar-Pérez, 2012).

### 6.2.1 Grado de hidrólisis (GH)

Como ya se ha mencionado, el GH se utiliza como un parámetro para el seguimiento de la proteólisis y es el indicador más empleado para la comparación entre hidrolizados

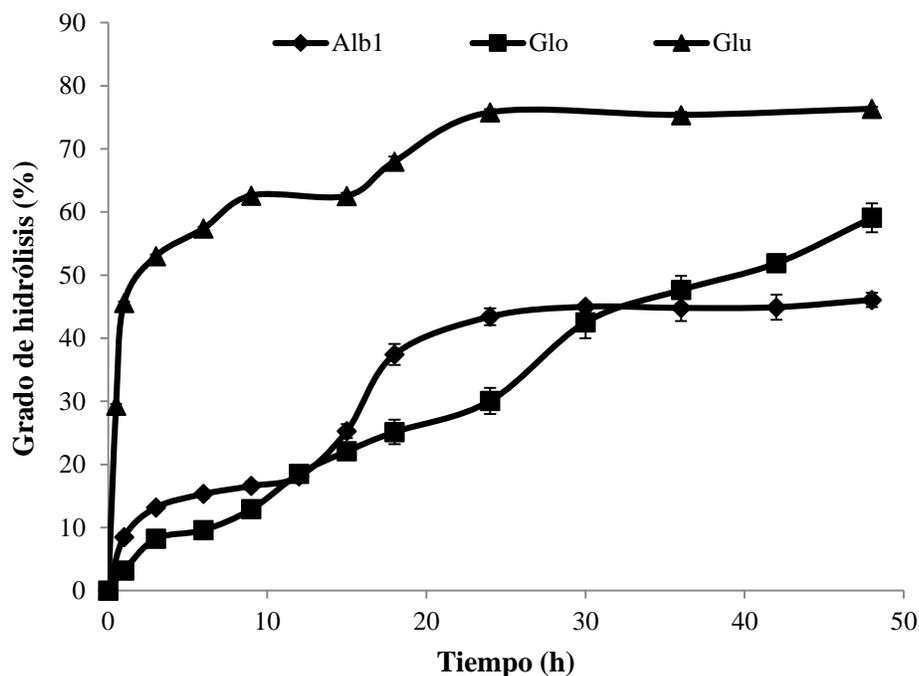
enzimáticos de proteína. El GH alcanzado va a depender significativamente ( $p < 0.05$ ) del tiempo de hidrólisis ( $t$ ) y la relación E/S, debido a que a mayor tiempo se garantizará que los choques moleculares entre el sustrato y la enzima ocurran con una mayor probabilidad, en su defecto la relación E/S indica la cantidad de sustrato que se requiere para que la enzima este 100% saturada con el S, esto garantiza que siempre se estará realizando la catálisis sin embargo esto no quiere decir que mientras más grande sea el valor de la relación se van alcanzar mejores resultados sobre el GH, por efecto de saturación (Cheison *et al.*, 2010).

El grado de hidrólisis se determinó para los tres tipos de proteínas extraídos (*Alb1*, *Glo* y *Glu*), el estudio se realizó durante 48 h (monitoreando: 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 48h), donde se pudo observar que la fracción de albúmina-1 alcanzó un máximo GH de  $43 \pm 0.34\%$  a las 24 horas de hidrólisis después de este tiempo el GH no mostró cambios significativos  $p > 0.05$ , con respecto a la globulina el máximo grado de hidrólisis ocurrió a las 48 h ( $58 \pm 0.51\%$ ) de tratamiento enzimático después de este tiempo no mostró diferencia significativa  $p > 0.05$  (datos no mostrados), lo cual demuestra que *Alb1* y *Glo* fueron más resistentes a la hidrólisis con alcalasa, en comparación con *Glu* que mostró un grado de hidrólisis elevado  $75 \pm 0.92\%$  a las 24 h después de este tiempo no se encontraron diferencias significativas  $p > 0.05$  (Figura 23).

La fracción proteínica *Glu* fue menos resistente a la hidrólisis con alcalasa desde la primera hora de tratamiento. Las fracciones *Alb1* y *Glo* mostraron un comportamiento similar a la hidrólisis con alcalasa a partir de las 14 h de tratamiento enzimático, los tiempos prolongados de hidrólisis ( $\geq 24$  h) fueron requeridos debido a que en el grano de amaranto existe la presencia de inhibidores de serinproteasas y la proteasa utilizada en este estudio (alcalasa) pertenece a este grupo de enzimas. Por lo tanto, bajo las condiciones de hidrólisis ensayadas para las fracciones proteínicas estudiadas se obtuvieron predominantemente hidrolizados extensivos, es decir con GH superior al 10% (Benítez *et al.*, 2008; Vioque *et al.*, 2001).

Barba de la Rosa *et al.* (2010) mostró que la hidrólisis de *Glu* con tripsina no cambió después de 4 h de tratamiento. La hidrólisis limitada de proteínas ya había sido observada por

(Orsini *et al.*, 2011; Ventureira *et al.*, 2012), los cuales hidrolizaron un aislado de proteína de amaranto usando alcalasa durante 20 min (GH = 1.7%) y 4 h (GH = 9.5%) por lo que solo pidieron lograr una hidrólisis parcial muy baja. Además, también se ha reportado que la globulina-P está asociada con cuerpos proteínicos que no permiten un fácil acceso a las enzimas hidrolíticas. Konishi *et al.* (1991) observaron que *Glo* no es tan susceptible a la proteólisis como *Alb* debido a que el primero se puede encontrar dentro de diversos cuerpos proteicos y esto ralentiza la proteólisis durante las primeras 12 h. Condés *et al.* (2009) encontraron que un polipéptido de 45 kDa de la globulina 7S era más resistente a la acción de la tripsina (serinproteasa) y Vecchi y Añón (2009) informaron una gran resistencia a la hidrólisis con alcalasa de los polipéptidos hidrófobos B de la globulina 11S.



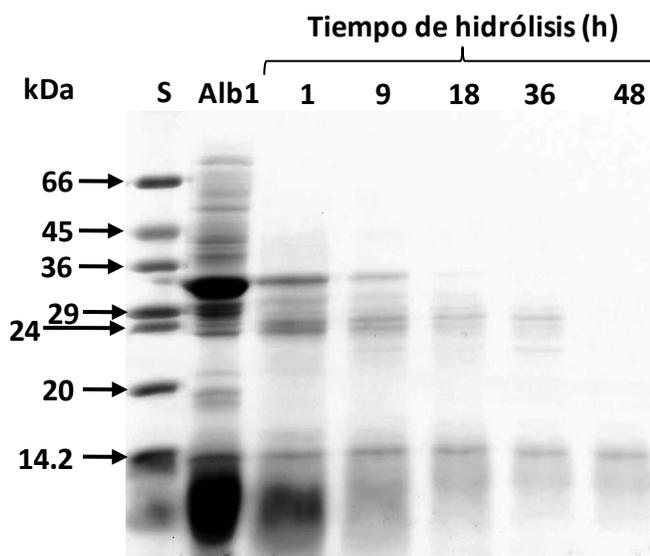
**Figura 23.** Grado de hidrólisis de las principales fracciones proteicas del grano de amaranto; albúmina (Alb1), Globulina (Glo) y Glutelina (Glu), en función del tiempo.

### 6.2.2 Perfiles electroforéticos

Los hidrolizados de las fracciones proteínicas mostraron perfiles electroforéticos (SDS-PAGE) distintos a los obtenidos en las proteínas sin hidrolizar. Observándose que algunas subunidades presentan una disminución progresiva en la intensidad de las bandas, otras desaparecen como resultado de la proteólisis con alcalasa y algunas proteínas presentan resistencia al ataque proteolítico.

La Figura 24 se presenta el perfil electroforético de la fracción de albúmina-1, donde se pueden apreciar proteínas con pesos moleculares entre 78 y 10 kDa, una banda principal a los 34 kDa misma que algunos autores han descrito como una proteína que resiste condiciones reductoras del medio y bandas con menores pesos moleculares relativos en el rango de 10 a 18 kDa (Gorinstein *et al.*, 1991b, Barba de la Rosa *et al.*, 1992a, Drzewiecki *et al.*, 2003). También en la misma figura se puede apreciar una proteína con un peso molecular relativo de 78 kDa, misma que ha sido reportada por diversos autores (Gorinstein *et al.*, 2001; Barba de la Rosa *et al.*, 2009). Marcone *et al.* (1994) describieron que la albúmina-1 del grano de amaranto es un homododámero de 133 kDa con 12 subunidades de bajo peso molecular relativo, y que dichas unidades se encuentran mantenidas por enlaces no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.), estos autores no encontraron evidencia de enlaces covalentes disulfuro (S-S) entre las subunidades, es por ello que el gel mostrado para la fracción de albúmina-1 corresponde a todo lo reportado por diferentes autores.

Al observar la hidrólisis de la proteína original (Alb1) se puede apreciar que ocurrió una digestión proteolítica a la primera hora de tratamiento donde las proteínas de peso molecular entre 10 y 78 kDa desaparecen o reducen su intensidad esto se puede notar en los carriles donde se colocó los hidrolizados de *Alb1* por el sistema proteolítico de alcalasa, donde se puede observar una hidrólisis del tipo extensiva.



**Figura 24.** Perfil electroforético (SDS-PAGE), de la fracción proteínica de Alb-1 y de sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas.

En la Figura 25 se muestra el perfil electroforético para la fracción proteínica de las globulinas, donde se puede apreciar que en la proteína original *Glo*, existen proteínas con pesos moleculares entre 70 y 15 kDa, mismos que otros autores han reportado para la globulina donde se reporta que la globulina 11S es un homohexámero que está constituido por subunidades con pesos moleculares relativos entre 52 y 59 kDa, cada una de las cuales consiste en una proteína ácida (34 a 36 kDa, pI 5.6) y una básica (22 a 24 kDa, pI 9.2) unidas por puentes disulfuro (–SS–) (Konishi *et al.*, 1985; Barba de la Rosa *et al.*, 1992a; Barba de la Rosa *et al.*, 1992b; Valdez-Ortiz *et al.*, 2005), se observó que la fracción de 22 kDa mostró ser resistente al ataque proteolítico, esto debido a los cuerpos proteínicos de inclusión que dificultan el ataque proteolítico (Konishi *et al.*, 1991). Juan *et al.* (2007), mostraron patrones electroforéticos de 11 especies de amaranto, para ello realizaron en condiciones desnaturalizantes y reductoras donde encontraron 3 fracciones principales con pesos moleculares relativos entre 50 - 64 kDa, 33 - 37 kDa y 18 - 25 kDa respectivamente, esto indica que los perfiles obtenidos para la globulina extraída bajo las condiciones mencionas

corresponde a lo reportado por otros autores. Las estructuras espaciales (secundaria) de la fracción de globulinas consiste en 31% de hélices  $\alpha$ , 27% de hojas  $\beta$  y 42% de estructura aperiódica, sin embargo la globulina-P (una fracción de proteína menor se puede extraer con agua del residuo de harina después de haber extraído la globulina con sales, esta globulina P está compuesta de una estructura secundaria 16% de hélices  $\alpha$ , 41% de hojas  $\beta$  y 53% de estructura aperiódica este hecho hace que esta segunda fracción proteínica llamada globulina-P, contiene superficies menos hidrofóbicas que las albúminas (Drzewiecki *et al.* 2003; Tandang-Silvas *et al.* 2012; Gorinstein *et al.* 2001).

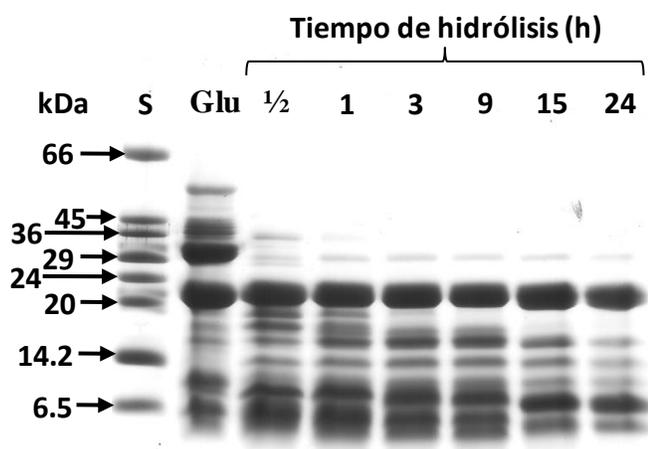


**Figura 25.** Perfil electroforético (SDS-PAGE), de la fracción proteínica de globulina (Glo) y de sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas.

En la Figura 26 se muestra el perfil electroforético para la fracción de glutelinas realizado en geles Tris-Tricina-SDS-PAGE, donde se pueden apreciar bandas con pesos moleculares relativos de 50, 35, 22 kDa al igual que lo reportado por Barba de la Rosa *et al.* (2000), en este estudio a diferencia de los realizados por otros autores se realizaron geles con una resolución entre 100 – 1 kDa (Schägger y Von Jagow 1987), por lo que en estos geles se pueden apreciar dos bandas principales con pesos moleculares entre 15-17 kDa.

Los perfiles electroforéticos de la fracción de las glutelinas del grano de amaranto forman los patrones más claros en condiciones reductoras con varias proteínas que han sido claramente separadas ya que pueden usarse para identificar conformaciones híbridas de amaranto y especies silvestres. Muchas especies de glutelinas de amaranto muestran polimorfismo no solo en la posición de las bandas de los patrones, sino también en su intensidad (Džunková *et al.*, 2011). Parte de las subunidades de la fracción de glutelinas del grano amaranto (pI 5.7 a 6.3) muestran homología estructural con las subunidades ácidas de globulina (Vasco-Méndez y Paredes-López 1994). Debido a lo anteriormente descrito es de esperarse que los patrones de glutelinas encontrados en este trabajo presenten ciertas diferencias a los perfiles reportados por otros autores.

Se puede apreciar que la hidrólisis de las glutelinas mostró resistencia al ataque sobre todo a la subunidad de 22 kDa, en comparación con las proteínas de peso molecular entre 35 y 50 kDa, las proteínas entre 15 y 17 kDa mostraron una disminución en la intensidad, efecto que se puede observar con mayor potencia a las 24 h.



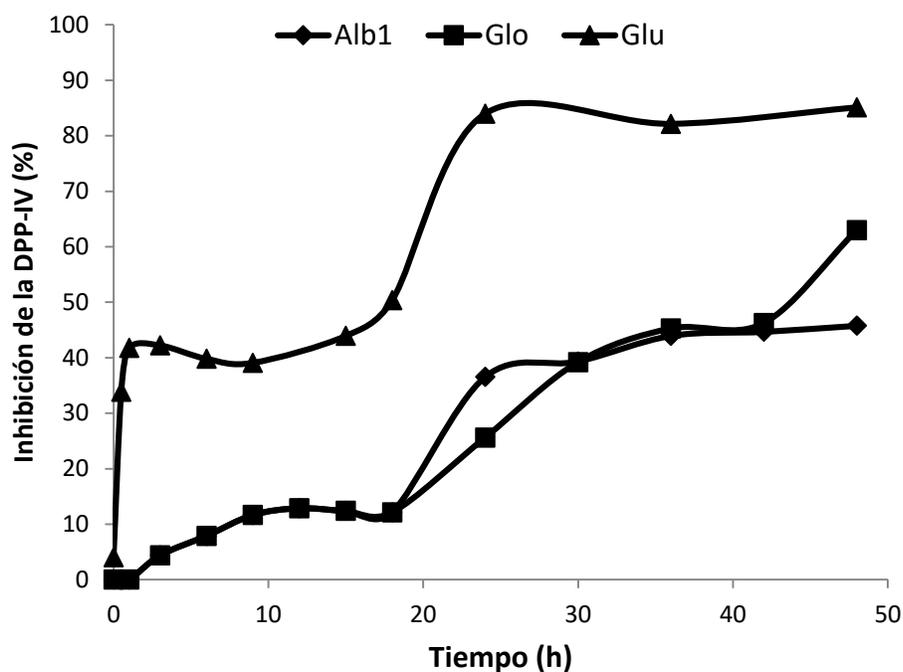
**Figura 26.** Perfil electroforético (Tris-Tricina-SDS-PAGE) de la fracción proteínica Glutelina (Glu) y sus respectivos hidrolizados con alcalasa (E/S=0.8 UA/g). kDa: peso molecular del estándar de proteínas; S: estándar de proteínas

### 6.3 Actividad inhibitoria de los hidrolizados sobre la DPP-IV

Se evaluó la actividad inhibitoria de los hidrolizados proteínicos de las tres fracciones proteínicas hidrolizadas, a lo largo de las mismas 48 h de actividad proteolítica de la alcalasa con la finalidad de poder observar los cambios ocurridos a medida que el grado de hidrólisis aumentaba.

El la Figura 27 se muestra la actividad inhibitoria de los hidrolizados sobre la DPP-IV, se encontró que mientras mayor es el GH en Alb1 y Glo, se liberan más péptidos con actividad inhibitoria de DPP-IV. La inhibición más grande de la DPP-IV se observó por los hidrolizados Alb1 y Glo de 48 h ( $45 \pm 0.2\%$  y  $63 \pm 0.5\%$ , respectivamente) y para Glu 24 h ( $85 \pm 0.2\%$ ). Se observó que la hidrólisis de Glu liberó péptidos que inhibían fuertemente la actividad de DPP-IV desde la primera hora de tratamiento. Velarde-Salcedo *et al.* (2013) identificaron varios péptidos inhibidores de DPP-IV, obtenidos a partir de hidrolizados de amaranto mediante un análisis de digestión con tripsina *in silico* y predijeron sus modos de unión a nivel molecular. Silva-Sánchez *et al.* (2008) por un análisis de bioinformática mostraron que la fracción de glutelinas del amaranto podría tener capacidad de generar péptidos con capacidad de inhibir enzimas en particular del tipo de las serinproteasas, estos resultados mediante un análisis *in silico* mediante una digestión triptica.

La proteasa utilizada en este estudio fue la alcalasa (Subtilisina) obtenida de *Bacillus licheniformis*, no presenta un sitio de corte específico como las proteasas que se han estudiado en los análisis de bioinformática, esta enzima hidroliza enlaces peptídicos donde se encuentre aminoácidos hidrofóbicos, por tal razón en el presente estudio encontramos mayor potencia sobre la inhibición de la DPP-IV de forma *in vitro* debido a que la exposición de residuos hidrofóbicos liberados durante la proteólisis disminuye significativamente la actividad de la DPP-IV (Patil *et al.*, 2015), ya que estos residuos interactúan en conjunto con la secuencia de dos glutamatos (Glu<sub>205</sub>-Glu<sub>206</sub>) en el sitio activo de la DPP-IV y desempeñan un papel importante en la unión del sustrato, donde este proceso se da mediante la formación de un puente salino con el N-terminal de un sustrato peptídico y así causar su inhibición (Stephen, 2005).



**Figura 27.** Inhibición de la DPP-IV por los distintos hidrolizados proteínicos del grano de amaranto; albúmina (Alb1), Globulina (Glo) y Glutelina (Glu).

#### 6.4 Purificación de los hidrolizados con mayor actividad inhibitoria de la DPP-IV

La purificación parcial se realizó sobre una columna empacada con Sephadex G-50, con la finalidad de conocer la composición de especies producidas por acción enzimática se utilizó la clasificación mostrada en el Cuadro 13.

**Cuadro 13.** Clasificación de las especies producidas en la hidrólisis enzimática de proteínas.

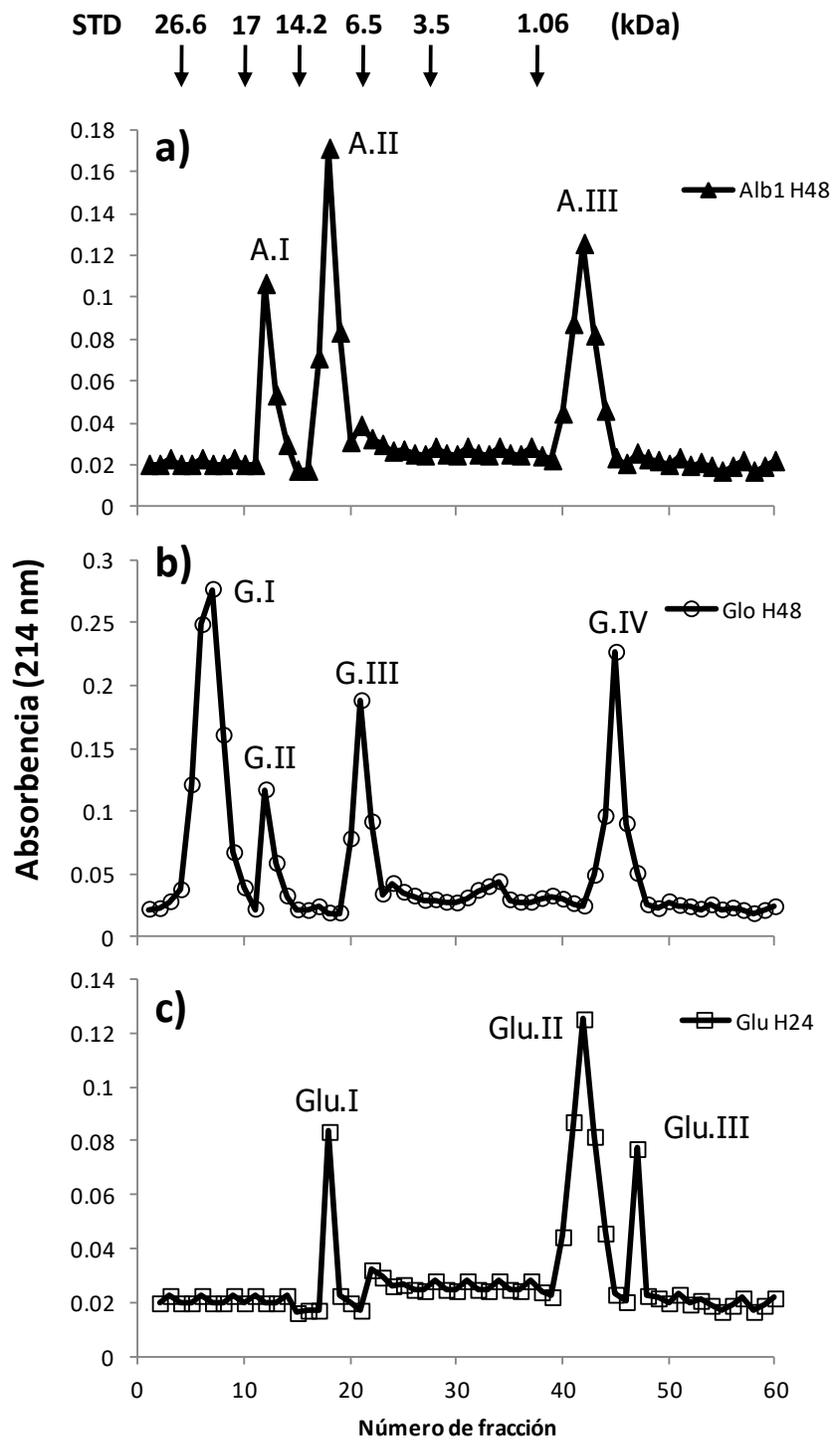
Especie	Peso molecular (kDa)	Relación NA/NT <sup>a</sup>
Proteínas	>10	< 0.01
Proteosas	5 – 10	< 0.01
Peptonas	1 – 5	0.1 – 0.5
Péptidos	0.2 – 1	0.5 – 0.8
Aminoácidos	0.075 – 0.2	0.8 – 0.9

Fuente: Guadix *et al.*, 2000; <sup>a</sup>NA: nitrógeno amínico, NT: nitrógeno total.

En la Figura 28 se muestran los perfiles cromatográficos de los hidrolizados de albúmina-1 y globulina ambos de 48 h (Alb1H48 y GloH48, respectivamente) de tratamiento enzimático y glutelina de 24 h (GluH24), donde se puede apreciar que el hidrolizado Alb1H48 consta de tres fracciones con pesos moleculares 15, 8.45 y 0.86 kDa para A.I, A.II y A.III respectivamente (Figura 28a), estas fracciones corresponden a las bandas encontradas en los geles de electroforesis donde se aprecian las dos primeras fracciones (15 y 8.5 kDa; Figura 24), esto es debido a que el sistema utilizado SDS-PAGE, no puede resolver para pesos moleculares menores a 10 kDa (Laemmli, 1970).

También se encontró que la composición de las especies de acuerdo a su peso molecular fue 41.1 % proteosas, 40.09% péptidos y 18% proteínas (Cuadro 14) esto revela que durante la hidrólisis realizada a la fracción Alb1H48 se liberaron una gran cantidad de péptidos, sin embargo existían aun una gran cantidad de proteosas y proteínas.

El perfil cromatográfico de la fracción GloH48 mostró 4 fracciones derivadas de la hidrólisis enzimática con alcalasa cuyos pesos moleculares son: 24, 14.9, 6.3, 0.65 kDa para G.I, G.II, G.III y G.IV; respectivamente (Figura 28b), las primeras tres fracciones se pueden apreciar en el gel SDS-PAGE realizado para la fracción de globulina (Figura 25), la composición de este hidrolizado proteínico mostró una composición de 55.7 % proteína, 24.6% de péptidos y 19.7 % de proteosas, mostrando un menor porcentaje de péptidos en comparación con el hidrolizado de albúmina, por último el hidrolizado GluH24 mostró tres fracciones con pesos moleculares de 11.2, 0.73 y 0.45 kDa para Glu.I, Glu.II y Glu.III respectivamente (Figura 28c) la composición peptídica de este hidrolizado fue 80.2% de péptidos y 19.8 % de proteosas, lo cual nos indica que esta es la fracción proteínica que genera una mayor cantidad de especies con pesos moleculares entre (0.25 y 1 kDa), bajo las condiciones de estudio la fracción de glutelinas fue la que mostró una mayor capacidad para inhibir a la enzima DPP-IV (Figura 27), esto podría ser atribuible a que la composición de las fracciones seleccionadas GluH24 mostró especies moleculares de menor tamaño, según lo reportado por Velarde-Salcedo *et al.* (2013) las especies que pueden causar inhibición son di, tri, tetra e incluso algunos octapéptidos siendo justamente los que se encuentran en mayor proporción en GluH24.



**Figura 28.** Perfil de elución por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50 de los principales hidrolizados. a. albúmina 48 h; b. globulina 48 h; c. glutelina 24 h. STD, estándar de proteínas; kDa, peso molecular del estándar de proteínas.

Oseguera-Toledo *et al.* (2014), mostraron secuencias peptídicas con capacidad de inhibir la DPP-IV en diversas fuentes de alimentos hidrolizados por diversas proteasas y encontraron que los péptidos responsables de la inhibición son aquellos que presentan una actividad de hidrofobicidad entre 6 – 12 kcal/mol, estos péptidos son: IP, LP, IPA, IPI, GPGA, IPAVF, PIGPCYE, PGVGGPLG. Dentro de estas secuencias reportadas el tripéptido IPI ha sido identificado como Diprotina A, conocido desde hace mucho como inhibidor de la DPP-IV incluso hoy en día comercializado como tal para estudios de laboratorio y que se ha observado que funciona como un inhibidor no covalente que se une transitoriamente al sitio catalítico de la DPP-IV y bloquea la degradación de cadenas polipeptídicas más grandes como lo son las incretinas (Wiedeman y Trevillayn, 2003).

**Cuadro 14.** Distribución de especies peptídicas en los distintos hidrolizados obtenidos por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-50.

Fracción proteínica	Especie peptídicas* (%)				
	Proteína (>10 kDa)	Proteosas (5 – 10 kDa)	Peptonas (1 – 5 kDa)	Péptidos (0.25 – 1 kDa)	Aminoácidos (0.075 – 0.2 kDa)
Alb1H48	18	41.1	NP	40.09	NP
GloH48	55.7	19.7	NP	24.6	NP
GluH24	NP	19.8	NP	80.2	NP

\*El porcentaje relativo de cada especie peptídica está determinada por la relación entre el área de la fracción de PM correspondiente y el área total. NP, no presentó especies con el peso molecular mostrado (bajo las condiciones de estudio).

Posteriormente se evaluó la capacidad inhibitoria de la DPP-IV de manera individual sobre las fracciones separadas por cromatografía de exclusión molecular, con la finalidad de observar si existía o no correlación entre la capacidad de inhibición por las distintas fracciones proteínicas y el peso molecular relativo.

En el Cuadro15 se muestran los valores de IC<sub>50</sub> de las principales fracciones obtenidas por cromatografía, donde se puede apreciar que las fracciones compuestas por especies con un

peso molecular relativo  $>10$  kDa (proteína), así como las proteínas originales, no mostraron actividad inhibitoria sobre la DPP-IV. Estas fracciones son A.I, G.I, G.II y Glu.I con pesos moleculares de 15, 24, 14.9, 11.2 kDa respectivamente, las fracciones compuestas por proteosas (5 – 10 kDa), mostraron actividad inhibitoria de la DPP-IV, para la fracción A.II (8.45kDa) y G.III (6.3 kDa) valores de  $IC_{50}$  de  $8.34 \pm 0.09$  y  $5.6 \pm 0.1$  mg/mL y las fracciones compuestas por péptidos (0.25 – 1 kDa) como son: A.III, G.IV, Glu.II y Glu.III con un peso molecular 0.86, 0.65, 0.73 y 0.45 kDa (respectivamente) mostraron valores de  $IC_{50}$  de  $1.98 \pm 0.01$ ,  $0.25 \pm 0.04$ ,  $1.95 \pm 0.08$  y  $0.12 \pm 0.006$  respectivamente (Apéndice 6 A-F), lo encontrado en este estudio demuestra una relación directa entre el peso molecular y la potencia para inhibir la DPP-IV, ya que los pesos moleculares entre 0.25 - 1 kDa podrían contener especies desde di hasta octapéptidos con una alta probabilidad de inhibir la DPP-IV (Korhonen, 2009). La potencia en términos del valor  $IC_{50}$  depende de muchas variables tales como: la proteasa utilizada, el tiempo de reacción, la relación E/S, la fuente proteínica, etc.

Se han empleado una gran variedad de enzimas para producir péptidos inhibidores de DPP-IV a partir de proteínas de origen alimentario, incluyendo proteinasas de grado alimenticio tales como alcalasa, flavourzyme y protamex que son derivadas de microorganismos, así como enzimas obtenidas a partir de fuentes animales (pepsina, tripsina, Corolasa PP) y plantas (papaína, proteasa de calabaza) (Lacroix y Li-Chan, 2016). Desde el estudio realizado por Silva-Sánchez *et al.* (2008), donde demostraron por un análisis de bioinformática que la fracción de glutelinas del grano de amaranto, de la misma especie utilizada en este estudio, contenía secuencias encriptadas que podían ser liberadas mediante una hidrólisis trípica, estudios posteriores como el realizado por Velarde-Salcedo *et al.* (2013) mostraron que la digestión trípica del grano de amaranto generaba hidrolizados, con un incremento dependiente de la dosis, sobre la actividad inhibidora de la DPP-IV y que tenían valores de  $IC_{50}$  entre 1.2 y 20 mg/mL, en comparación con el presente estudio donde se obtuvieron fracciones peptídicas con una potencia de hasta 10 veces mayor, con la fracción Glu.III ( $IC_{50}$   $0.12 \pm 0.006$  mg/mL, con un PMr de 0.45 kDa), esto indica que la hidrólisis con alcalasa genera péptidos con una potencia mayor que los generados por una hidrólisis trípica. Estos mismos autores mencionaron que las fracciones donde se generan péptidos con

capacidad de inhibir la DPP-IV por digestión trípica sobre la globulina 11S son: f (1-13), f (18-39), f (69-81), f (92- 143).

**Cuadro 15.** Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones peptídicas obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Saphadex G-15, de los hidrolizados que presentaron mayor actividad de inhibición sobre la DPP-IV

Fracción peptídica	IC <sub>50</sub> * (mg/ml)
<b>Alb1H48</b>	ND♦
A.I	ND
A.II	8.34 ± 0.09 <sup>*b</sup>
A.III	1.98 ± 0.01 <sup>a</sup>
<b>GlobH48</b>	ND
G.I	ND
G.II	ND
G.III	5.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
G.IV	0.25 ± 0.04 <sup>a</sup>
<b>GluH24</b>	ND
Glu.I	ND
Glu.II	1.95 ± 0.08 <sup>b</sup>
Glu.III	0.12 ± 0.006 <sup>a</sup>
<b>Diprotina A</b>	8.43 ± 0.29 µg/mL
<b>Sitagliptina</b>	9.41 ± 0.15 ng/mL

\*El valor de IC<sub>50</sub> fue determinado por análisis de regresión lineal del % inhibición vs. log de la concentración de péptido (mg/mL).

♦No detectado bajo las condiciones del ensayo.

\* Los datos representan la media ± la desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado.

Letras diferentes en la misma columna y por fracción proteínica (Alb1H48, GlobH48 y GluH24), indican diferencia significativa (p<0.05)

Un estudio realizado por Montoya-Rodríguez *et al.* (2015), muestra por primera vez las secuencias peptídicas obtenidas por análisis *in silico* de la fracción de globulina 11S del grano de amaranto, utilizando como proteasa alcalasa, donde reportan por lo menos 15 secuencias

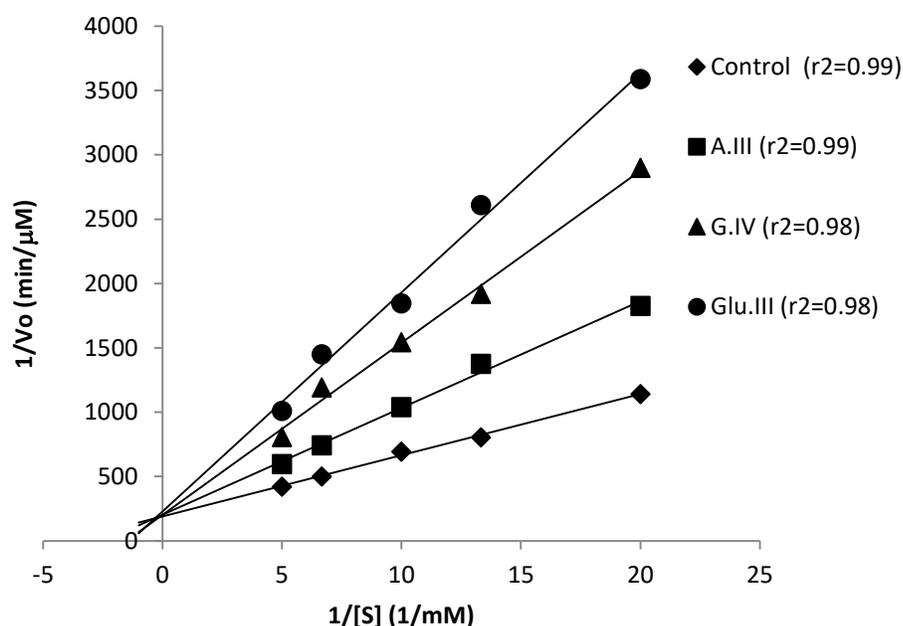
peptídicas liberadas por la hidrólisis como son: WA, IP, IPI, LAG, PPT, WASGF, NAQL, LAGR, WPALE, TALEPT, PAIRSLPI, EAFGLKFNRPETTLFRS, estas secuencias reportadas por el estudio de bioinformática pone en evidencia que los péptidos que muestran potencial de inhibición de la DPP-IV comprenden entre 2 a 17 residuos aminoácidos (Nongonierma y FitzGerald, 2016) y que los péptidos con mayor potencial muestran un secuencia general de Xaa-Pro y Xaa-Ala (del extremo N-terminal), donde Xaa indica cualquier aminoácido, sin embargo estudios realizados por análisis *in silico* basados en la alineación de secuencias peptídicas con actividad inhibidora de la DPP-IV, han mostrado péptidos inhibidores potentes que contienen generalmente un aminoácido de cadena ramificada o un residuo aromático con un grupo polar en la cadena lateral (principalmente triptófano, Trp, W) en su extremo N-terminal o un resto de prolina en su posición P1 (Nongonierma y FitzGerald, 2014; Tulipano *et al.* 2015).

### 6.5 Cinética de inhibición de la DPP-IV por fracciones peptídicas

Los parámetros de la cinética de inhibición de la DPP-IV se evaluaron a través del modelo planteado por Michaelis-Menten y por el método de dobles recíprocos descrito por Lineweaver-Burk. De este modo, se evaluó de manera *in vitro* el tipo de inhibición enzimática que presentaban las fracciones con mayor actividad inhibidora de la DPP-IV, es decir, las fracciones con el valor IC<sub>50</sub> más bajo obtenido: A.III, G.IV y Glu.III. Todos estos hidrolizados mostraron un modo de inhibición competitiva (Figura 29).

Velarde-Salcedo *et al.* (2013) describieron algunos péptidos de la globulina 11S del grano de amaranto que interactúan con la región de sitio activo de DPP-IV, bloqueando así el acceso al sustrato, los autores mencionados describen tres péptidos de tamaño más grande (13 residuos) estos péptidos encontrados impedían la formación de la estructura activa dimérica de la DPP-IV, lo que resultaba en la inhibición de la enzima, sin embargo en nuestro estudio las fracciones seleccionadas están por debajo de 1 kDa, por lo que los resultados aquí mostrados indican que los hidrolizados de bajo peso molecular compiten por el sitio activo de la enzima,

es decir que el inhibidor y el sustrato se excluyen mutuamente, frecuentemente debido a una verdadera competición por el mismo sitio, por lo que cuando se realiza el estudio de cinética enzimática al aumentar la cantidad de sustrato existirá una mayor probabilidad de que la enzima se encuentre con moléculas de sustrato, debido a ello este tipo de inhibición se aprecia en la Figura 29 donde la  $V_{max}$  a concentraciones grandes de sustrato no se ve afectada sin embargo el valor de  $K_m'$  incrementa debido a la parcial inhibición a bajas concentraciones de sustrato y esto se observa al final de la cinética como un efecto de saturación hiperbólica y esta inhibición sigue el comportamiento matemático descrito por Michaelis-Menten (Segel, 1993)



**Figura 29.** Gráfico de Lineweaver-Burk de el efecto de las fracciones peptídicas del grano de amaranto sobre velocidad de digestión de Gly-Pro-pNA por la DPP-IV. A.III, G.IV y Glu.III se obtuvieron mediante cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-15) de Alb1H48, GloH48 y GluH24, respectivamente. La sitagliptina se utilizó como control.

Las simulaciones de acoplamiento molecular de la acción inhibitoria de globulina del grano amaranto han demostrado que la estructura activa de DPP-IV existe como un dímero con dos dominios; formando un dominio propulsor de ocho sitios con una cavidad de 30-45 Å entre cada monómero, donde los inhibidores se unen al sitio catalítico (Wiedeman, 2007).

Velarde-Salcedo *et al.* (2013) mostraron que la interacción entre los péptidos de globulina 11S del grano de amaranto y la DPP-IV se daba principalmente a través de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

En el Cuadro 16 se muestran los parámetros cinéticos de las diferentes fracciones de los hidrolizados proteínicos que presentaron un mayor potencial inhibitorio sobre la actividad de la DPP-IV. Dado que se trata de un modo de inhibición competitiva, el valor  $V_{max}$  es aproximadamente el mismo ( $\approx 0.0047 \mu\text{M}/\text{min}$ ) esto se encontró cuando se alcanzaba una cinética de orden cero. Debido a que en los estudios de cinética enzimática la concentración del hidrolizado ensayado permanece constante, mientras que la concentración del sustrato aumenta para promover la interacción con el sitio catalítico, se pudo observar el tipo de inhibición competitiva. Con respecto al valor de  $K_m$  en este tipo de inhibición presentada por los hidrolizados analizados, se puede apreciar que los valores de  $K_m$  aparente ( $K_m'$ ) aumentan, este aumento no significa que el complejo [EI] tenga una afinidad menor por el sustrato, ya que EI no tiene afinidad en absoluto por el sustrato, mientras que la afinidad de la enzima [E] (libre) que es la única forma en la que puede unirse al sustrato no varía, por lo que el aumento de  $K_m'$  se debe a la distribución de la enzima disponible entre las formas de afinidad plena y afinidad nula (Segel, 1993).

La eficiencia catalítica (EC) es un parámetro cinético que se utiliza comúnmente para saber cuál es el mejor sustrato para una enzima, se determina por medio de la relación  $K_{cat}/K_m$  o  $V_{max}/K_m$  (Eisenthal *et al.*, 2007), en este trabajo se determinó por medio de la segunda relación, este parámetro indica la eficiencia catalítica de la enzima a concentraciones de sustrato por debajo de los niveles de saturación y en este caso nos indica como se ve afectado la EC por efecto de la inhibición ya que EC representa el paso de unión de la enzima y el sustrato y cualquier molécula que esté afectando esta unión causara un descenso en este parámetro en este estudio se encontró un descenso desde 11.9 a  $5.76 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ , lo que indica que el hidrolizado que está impidiendo en un mayor grado la formación del complejo [ES] es Glu.III. Es difícil comparar los parámetros cinéticos de inhibición de la DPP-IV obtenidos de

varias proteínas debido a que no existe una forma estandarizada de expresar estos parámetros cinéticos. A veces se han descrito diferentes valores de la actividad inhibitoria de la DPP-IV para el mismo dipéptido, que puede atribuirse no sólo a diferentes condiciones experimentales, sino también al sustrato y la fuente de enzima utilizados para evaluar la actividad inhibitoria de la DPP-IV (Lacroix y Li- Chan, 2012b).

**Cuadro 16.** Parámetros cinéticos del efecto de las fracciones peptídicas sobre la velocidad de digestión de Gly-Pro-pNA por la DPP-IV.

Parámetro cinético	Control	A.III	G.IV	Glu.III	Sitagliptina*
Km o Km' (mM)	0.25 <sup>a</sup>	0.41 <sup>b</sup>	0.66 <sup>c</sup>	0.75 <sup>d</sup>	1.22 <sup>f</sup>
V <sub>max</sub> o V <sub>max</sub> ' (μM/min)	0.0052 <sup>a</sup>	0.0049 <sup>a</sup>	0.0049 <sup>a</sup>	0.0043 <sup>a</sup>	0.0045 <sup>a</sup>
EC* (x10 <sup>-6</sup> )	20.8 <sup>d</sup>	11.9 <sup>c</sup>	7.39 <sup>b</sup>	5.76 <sup>b</sup>	3.67 <sup>a</sup>
Ki (mg/mL)		5.61 <sup>b</sup>	0.21 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	2.86 x 10 <sup>-6</sup> (nM)

\*Datos obtenidos experimentalmente bajo las mismas condiciones del ensayo.

\*Eficiencia catalítica (min<sup>-1</sup>)

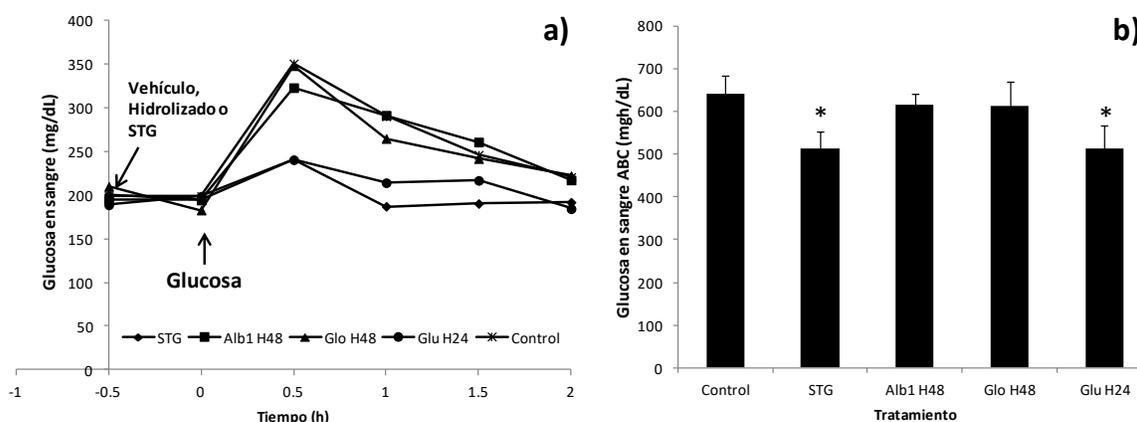
Letras diferentes en la misma fila indican diferencia significativa (p<0.05).

Glu.III fue la fracción de hidrolizado que proporcionó la actividad inhibitoria de DPP-IV más alta (Ki 0.11 mg/mL), que fue inferior a la de STG (Ki 2.86 x 10<sup>-6</sup> ng/mL). Esto explica la eficacia del tratamiento con fármacos sintéticos hipoglicemiantes para pacientes con diabetes mellitus tipo 2. La potencia encontrada en este estudio para los hidrolizados proteínicos debe considerarse ya que una inhibición prolongada de la DPP-IV puede inactivar quimiocinas, neuropéptidos y otras hormonas peptídicas, lo que conduce a una amplia gama de efectos fisiológicos, como angioedema, pancreatitis y artritis, sin mencionar su respuesta insulínica (Mateucci y Giampietro, 2011; Crickx *et al.*, 2014). Los compuestos naturales con actividad inhibitoria de la DPP-IV pueden ser utilizados como parte de un tratamiento complementario a la terapia farmacológica debido a que aumentan el tiempo de vida media de las incretinas, sin riesgo de hipoglucemia, un efecto secundario común de los fármacos antidiabéticos clásicos (Nauck, 2011).

## 6.6 Efecto de los hidrolizados proteínicos del grano de amaranto en ratones diabéticos inducidos por estreptozotocina (STZ)

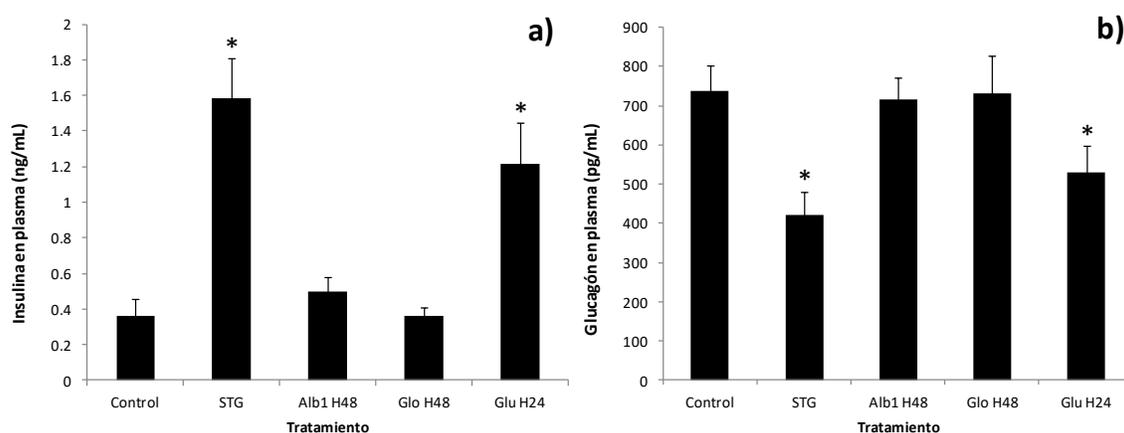
### 6.6.1 Estudio de administración única (efecto agudo)

Alb1H48, GloH48 y GluH24 se administraron a ratones diabéticos inducidos por STZ en una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). Se encontró que una dosis de 300 mg/kg de GluH24 podría inhibir la actividad de DPP-IV debido a que logró reducir el nivel de glucosa en plasma ( $\approx 26\%$ , efecto mostrado a los 30 min, después de la administración oral de glucosa) en la hiperglucemia de ratones diabéticos. Este efecto fue similar al observado en el grupo STG (sitagliptina) utilizado como control positivo (Figura 30a). Además, la administración oral de 300 mg/kg de Alb1H48 y GloH48, que había mostrado capacidad inhibidora de DPP-IV *in vitro*, no presentó efecto sobre el nivel de glucosa en plasma en el ensayo biológico. La Figura 30b muestra el área bajo la curva de la POTG; donde se puede apreciar que STG y GluH24 fueron claramente capaces de reducir el nivel de glucosa en plasma ( $p < 0.05$ ) en ratones diabéticos, después de una administración única del hidrolizado proteínico.



**Figura 30.** Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la glucosa en sangre, durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). (a) Cambios sobre la glucosa en sangre a través del tiempo y (b) Área bajo la curva (ABC) de la concentración de glucosa en sangre después de POTG. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

De forma similar, la administración oral de GluH24 aumentó el nivel de insulina en plasma 3 veces, comparado con el control ( $p < 0.05$ , Figura 31a), además se observó que los niveles de glucagón plasmático disminuyeron en  $\approx 30\%$  ( $p < 0.05$ , Figura 31b), bajo las mismas condiciones del estudio agudo. Los niveles plasmáticos de insulina y glucagón están directamente relacionados con la hormona GLP-1, por lo que se está demostrando de manera *in vivo* que se está realizando una inhibición de la DPP-IV, ya que este comportamiento fue similar al proporcionado por STG, que es un fuerte inhibidor de la DPP-IV.

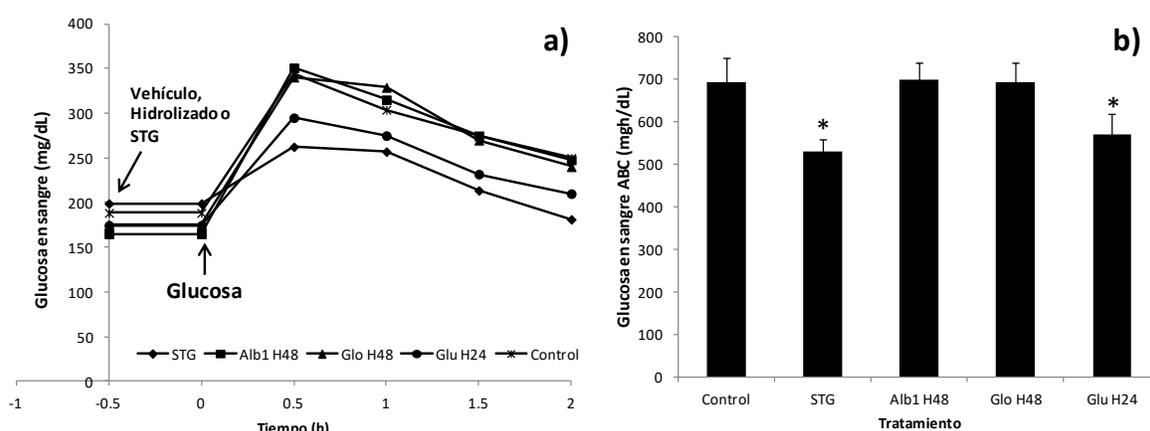


**Figura 31.** Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la concentración de (a) Insulina en plasma y (b) Glucagón en plasma, 30 min después a la administración de los hidrolizados. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 6.6.2 Efecto subagudo de los hidrolizados de amaranto sobre la glucemia de ratones diabéticos

De igual manera se probaron las fracciones Alb1H48, GloH48 y GluH24 (300 mg/kg) en un estudio de dosificación crónica diaria (30 días), donde se observó que la ingestión de Alb1H48 y GloH48 no produjo ningún efecto en los niveles de glucosa en plasma en ratones

diabéticos inducidos por STZ. De la misma manera que en el estudio agudo, sólo GluH24 redujo los niveles de glucosa plasmática ( $\approx 17\%$ , efecto mostrado a los 30 min, después de la administración oral de glucosa) en ratones diabéticos inducidos por STZ ( $p < 0.05$ , Figura 32a). La Figura 32b muestra el área bajo la curva de la POTG, de también se puede observar que existe una reducción en los niveles de glucosa de forma similar para GluH24 y STG, la determinación del área bajo la curva, es un parámetro de comparación entre tratamientos a lo largo del tiempo y nos indica si un tratamiento determinado es estadísticamente significativo, por lo que en este estudio su uso nos mostró que GluH24 a un nivel de significancia de 0.05 es diferente negativamente al grupo denominado control.

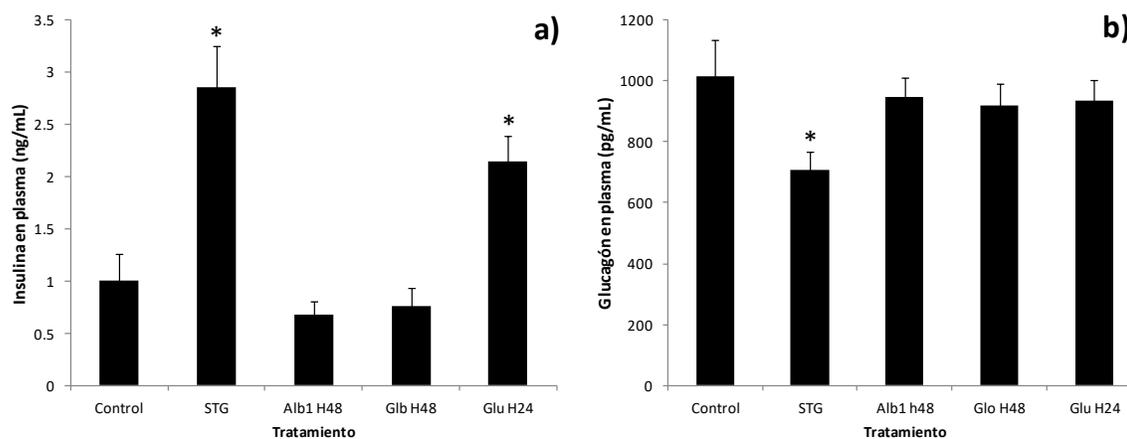


**Figura 32.** Efecto de la administración crónica (durante cuatro semanas) para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) la glucosa en sangre, durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG). (a) Cambios sobre la glucosa en sangre a través del tiempo y (b) Área bajo la curva (ABC) de la concentración de glucosa en sangre después de POTG.

\*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

Los niveles plasmáticos de insulina fueron dos veces más altos (2.25 ng/mL, Figura 33a) que los observados en el estudio agudo (1.25 ng/mL). Sin embargo, los niveles plasmáticos de glucagón, a diferencia del estudio agudo, no disminuyeron en el estudio subagudo; por el contrario, aumentaron (548 a 983 pg/mL, respectivamente; Figura 33b), sin embargo este aumento no fue significativo ( $p < 0,05$ ) con el grupo control de ratones diabéticos inducidos por STZ. Observando este resultado, parece que la inhibición crónica de la DPP-IV

por los péptidos GluH24 desencadenó la reducción de los niveles de glucosa plasmática debido a que la insulina en plasma aumentó. Simultáneamente, GluH24 indujo no sólo la secreción plasmática de insulina, sino también la secreción plasmática de glucagón. Para este fenómeno planteamos la hipótesis de que con el fin de compensar la reducción del nivel de glucosa en plasma, es liberado el glucagón. Velarde-Salcedo *et al* (2013), encontraron que los hidrolizados, obtenidos de todas las fracciones de proteína de amaranto, tienen actividad inhibidora *in vitro* de DPP-IV, estos autores informaron que los péptidos liberados de amaranto en específico de la fracción de glutelina (Glu) y utilizando digestión gastrointestinal simulada, observaron que estos presentarían actividad inhibidora *in vitro* de DPP-IV.



**Figura 33.** Efecto de la administración única para la evaluación de los hidrolizados proteínicos del amaranto (Alb1H48, GloH48 y GluH24) sobre la concentración de (a) Insulina en plasma y (b) Glucagón en plasma, 30 min después a la administración de los hidrolizados. \*Indica diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

Además, se encontró que GluH24 mostró la mayor capacidad inhibitoria hasta ahora registrado contra la DPP-IV en STZ-inducida por ratones diabéticos como un modelo de sistema de diabetes. Este es el primer esfuerzo para evaluar el efecto de los hidrolizados de proteína de amaranto en la actividad inhibidora de DPP-IV usando ratones diabéticos inducidos por STZ.

Los estudios de inhibición *in vivo* de la DPP-IV por hidrolizados proteínicos obtenidos de fuentes alimentarias, es escasa, la mayoría de los estudios han sido realizados de forma *in vitro*, esto debido a la complejidad de los sistemas vivos y estandarización de los estudios, sin embargo un estudio realizado por Mochida *et al.* (2010) mostraron que un hidrolizado del grano de maíz en especial de la proteína Zeína, una proteína del grupo de las prolaminas, obtenido mediante la enzima papaína y administrado a ratas antes de una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) aumentaba la secreción de insulina 2.4 veces a los 15 min disminuyendo así los niveles de glucosa en sangre en comparación con las ratas control (estudio agudo). Además, la administración del hidrolizado de zeína provocó incrementos tanto en las concentraciones totales como en las concentraciones activas de la incretina GLP-1, encontrándose que la última respuesta estaba correlacionada con cambios en los niveles de insulina y glucosa. Estos hallazgos sugirieron que los péptidos derivados de la zeína ejercen su efecto anti-hiperglucémico a través de su capacidad para inducir la secreción de GLP-1 e inhibir la actividad de DPP-IV.

Por otra parte un estudio subagudo realizado por Huang *et al.* (2014) en hidrolizados obtenidos a partir de la proteína gelatina de piel porcina obtenidos la acción de la Flavourzima, proteasa obtenida del *Aspergillus oryzae*, que presenta actividad tanto endoproteasa como exopeptidasa, estos autores estudiaron la administración diaria (42 días) de los hidrolizados con peso molecular < 1 kDa y lo compararon con una administración de Sitagliptina, un inhibidor comercial de la DPP-IV, ambas administraciones mostraron niveles reducidos de glucosa en sangre durante una POTG en comparación con las ratas diabéticas del grupo control. Después de la administración crónica, tanto las ratas tratadas con el hidrolizado como las tratadas con sitagliptina mostraron una reducción de la actividad de la DPP-IV (50% y 75%, respectivamente), así como un aumento de la insulina plasmática (aproximadamente 6 veces) así como de la incretina GLP-1 (activo), en comparación con el grupo control diabético. Por otra parte, en este estudio al igual que en nuestra investigación, no se observó diferencia significativa en los niveles plasmáticos de glucagón entre el control y las ratas diabéticas tratadas con los hidrolizados de proteína gelatina de piel porcina.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ La composición proteínica del grano de amaranto fue albúmina 1 46%, glutelina 22%, globulina 12% y prolamina < 1% obteniendo un alto rendimiento de nitrógeno proteínico (91 – 94 %). Todas las fracciones aquí encontradas representaron el 82% de la proteína total del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).
- ❖ El GH alcanzado depende significativamente ( $p < 0.05$ ) del tiempo de hidrólisis y para una relación E/S (0.8 UA/g), se observó un incremento a medida que aumentaba el tiempo de reacción. El mayor GH se obtuvo para albúmina 1 (43%, 24 h), globulina (58%, 48h) y globulina (75%, 24h).
- ❖ La hidrólisis *in vitro* de las distintas fracciones proteínicas mostraron inhibición de la DPP-IV de 45 y 63% a 48 h para albúmina 1 y globulina, respectivamente y de 85% a 24 h para glutelina, se encontró una relación directa y positiva entre el GH y la inhibición de la DPP-IV.
- ❖ La composición peptídica de los hidrolizados Alb1H48 (41% proteosas, 40% péptidos y 18% proteínas), GloH48 (55% proteínas, 24% péptidos y 19% proteosas) y GluH24 (80.2% péptidos y 19% proteosas).
- ❖ Se encontró que las fracciones de menor peso molecular, obtenidas por cromatografía de exclusión molecular, presentaron una mayor potencia para inhibir la DPP-IV. Los valores de  $IC_{50}$  para la fracciones A.III (0.86 kDa), G.IV (0.65 kDa) y Glu.III (0.45 kDa) fueron 1.98 mg/mL, 0.25 y 0.12 mg/mL (respectivamente).
- ❖ Las fracciones A.III, G.IV y Glu.III, presentaron un tipo de inhibición competitiva, debido a que los gráficos de Lineweaver-Burk mostraron que la  $V_{max}$  ( $\approx 0.0047$   $\mu\text{M}/\text{min}$ ) no se veía afectada por la presencia del inhibidor, además se observó que la eficiencia catalítica se veía afectada por la inhibición de efectuada por los

---

hidrolizados, la fracción que mostró una mayor capacidad de inhibición fue Glu.III con un valor de  $K_i$  de 0.11 mg/mL.

- ❖ La administración de los hidrolizados proteínicos (300 mg/kg) en animales con diabetes inducida por STZ, para el estudio agudo, mostró una reducción de la glucemia del 26% a la media hora después de la administración oral de glucosa (2 g/kg) solo para la fracción GluH48 además de un aumento en los niveles de insulina plasmática (1.25 ng/mL) y una reducción de glucagón (548 pg/mL).
- ❖ El estudio subagudo (crónico) mostró que después de la administración de los hidrolizados proteínicos (300 mg/kg) durante 30 días, existió una reducción de la glucemia de 17% a la media hora después de la administración oral de glucosa (2 g/kg) solo para la fracción GluH48, además también se encontró que existía un aumento de insulina plasmática (2.25 ng/mL) valor que fue dos veces más alto que en el estudio agudo (1.25 ng/mL), en este estudio no se mostró una reducción de los niveles plasmáticos de glucagón, esto se encontró debido a los niveles elevados de insulina que podrían estar manteniendo estadios de glucemia por debajo de los niveles normales y es debido a esto que los niveles se mostraron incluso superiores que en el estudio agudo, siendo de 983 y 520 y pg/mL (para el estudio subagudo y agudo, respectivamente).
- ❖ El presente trabajo muestra las bases científicas de la evaluación de la actividad inhibitoria *in vivo* de la DPP-IV, encontrando resultados altamente prometedores, para la generación de alimentos funcionales y así coadyuvar al mantenimiento de los niveles de glucosa en personas con diabetes mellitus tipo 2.

## 8. RECOMENDACIONES

- ❖ Optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática modificando la relación [E/S] y tiempo de hidrólisis, utilizando distintas enzimas proteolíticas, con la finalidad de definir el mayor GH a un menor tiempo haciendo más eficiente el uso de la enzima para cada sustrato determinado.
- ❖ Realizar la purificación de las especies peptídicas obtenidas durante la hidrólisis enzimática por cromatografía de intercambio iónico para observar el efecto de hidrofobicidad sobre la inhibición de la DPP-IV para poder mejorar así la actividad inhibitoria para obtener valores de IC<sub>50</sub> menores.
- ❖ Continuar realizando cinéticas enzimáticas de inhibición con la finalidad de caracterizar los tipos de inhibición causada por los hidrolizados proteínicos para observar su potencial de inhibición de la DPP-IV.
- ❖ Proteger los hidrolizados obtenidos por medio de la microencapsulación con la finalidad de que puedan soportar la hidrólisis gástrica y puedan ser absorbidos por las paredes del epitelio intestinal.
- ❖ Diseñar una planta piloto para la producción de hidrolizados de las proteínas de reserva del grano de amaranto para su posible incorporación en alimentos industrializados.
- ❖ Diseñar alimentos funcionales que contengan los hidrolizados de glutelina del grano de amaranto, para poder ser utilizados por personas con diabetes mellitus tipo 2.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- ADA. (2011a). American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **34**, S62-S69.
- ADA. (2011b). American Diabetes Association. Standards of care. Causes and diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **34** (suppl 1), S12-S15.
- ADA. (2014). American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2014. *Diabetes Care*, **37**(Suppl. 1), S15–S80.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**, 1256 – 1262.
- Alvarez-Jubete, L., Arendt, E.K. and Gallagher, E. (2010). Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Food Science and Technology*, **21**, 106–113.
- American Association of Clinical Endocrinologist (AACE) 2013. Comprehensive diabetes management algorithm. *Endocrine Practice*, **19**, 327–335.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemists.
- Awasthi, C.P., Kumar, A., Singh, N. and Thakur, R. (2011). Biochemical composition of grain amaranth genotypes of himachal pradesh. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, **24**, 141–144.
- Baggio, L. L and Drucker D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, **132**, 2131–2157.
- Barba de la Rosa, A. P., Barba Montoya, A., Martínez-Cuevas, P., Hernández-Ledesma, B., León-Galván, M. F., De León-Rodríguez, A. and González, C. (2010). Tryptic amaranth

---

glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide*, **23**, 106–111.

Barba de la Rosa, A.P., Fomsgaard, I.S., Laursen, B., Mortensen, A.G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J. and De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, **49**, 117–121.

Barba de la Rosa, A.P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O. and Viroben G. (1992a). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 931–936.

Barba de la Rosa, A.P., Paredes-Lopez, O. and Gueguen, J. (1992b). Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 937–940.

Becker, R., Irving, D.W. and Saunders, R.M. (1986). Production of debranned amaranth flour by stone milling. *Food Science and Technology*, **19**, 372–374.

Benítez, R., Ibarz, A. and Pagan, J. (2008). Hidrolizados de Proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, **42**, 227 – 236.

Betschart, A.A., Irving, D.W., Shepherd, A.D. and Saunders, R.M. (1981). *Amaranthus cruentus*: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components, and the effects of temperature on nutritional quality. *Journal of Food Science*, **46**, 1181-1184.

Bo, S., Ciccone, G., Rosato, R., Villois, P., Appendino, G., Ghigo, E. and Grassi, G. (2012). Cancer mortality reduction and metformin: a retrospective cohort study in type 2 diabetic patients. *Diabetes, obesity and metabolism*, **14**, 23–29.

- Bolen, S., Feldman, L., Vassy, J., Wilson, L., Yeh, H.C., Marinopoulos, S., Wiley, C., Selvin, E., Wilson, R., Bass, E.B. and Brancati, F.L. (2007). Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, **147**, 386–399.
- Borneo, R. and Aguirre, A. (2008). Chemical composition, cooking quality, and consumer acceptance of pasta made with dried amaranth leaves flour. *LWT – Food Science and Technology*, **41**, 1748–51.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248 – 254.
- Brubaker, P.L. and Drucker, D.J. (2004). Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*, **145**, 2653-2659.
- Campbell, R. K. (2011). Clarifying the role of incretin-based therapies in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clinical Therapeutics*, **33**, 551–527.
- Cefalu, W.T., Leiter, L.A., Yoon, K-H., Arias, P., Niskanen, L., Xie, J., Balis, D.A., Canovatchel, W. and Meininger, G. (2013). Efficacy and safety of canagliflozin versus glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin (CANTATA-SU): 52 week results from a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **382**, 941–950.
- Chang, Ch. Y., Wu, K. Ch. and Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, **100**, 1537 – 1543.
- Cheison, S.C., Schmitt, M., Leeb E., Letzel, T. and Kulozik, U. (2010). Influence of temperature and degree of hydrolysis on the peptide composition of trypsin hydrolysates of  $\beta$ -lactoglobulin: Analysis by LC–ESI-TOF/MS. *Food Chemistry*, **121**, 457-467.

- Chen, L.H. and Leung, P.S. (2013). Inhibition of the sodium glucose co-transporter-2: its beneficial action and potential combination therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **15**, 392–402.
- Cho, Y.M., Merchant, C.E. and Kieffer, T.J. (2012). Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacology and therapeutics*, **135**, 247-278.
- Cho, Y.M., Wideman, R.D. and Kieffer, T.J. (2013). Clinical application of glucagon-like peptide 1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Endocrinology and metabolism*, **28**, 262-74.
- Committee Report. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **20**, 1183-1197.
- Condés, M. C., Scilingo, A. A. and Añón, M. C. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis: Structural and functional changes. *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 963– 970.
- Crickx, E., Marroun, I., Veyrie, C., Le Beller, C., Schoindre, Y., Bouilloud, F., Blétry, O. and Kahn, J. E. (2014). DPP4 inhibitor-induced polyarthrititis: a report of three cases. *Rheumatology International*, **34**, 291-292
- Currie, C.J., Poole, C.D., Jenkins-Jones, S., Gale, E.A.M., Johnson, J.A. and Morgan, C.L. (2012). Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **35**, 299–304.
- Deacon, C. F. and Holst, J. J. (2002) Dipeptidyl peptidase IV inhibition as an approach to the treatment and prevention of type 2 diabetes: a historical perspective. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**, 1–4
- Deacon, C.F., Nauck, M.A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B. and Holst, J.J. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded

---

from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, **44**, 1126-1131.

DeFronzo, R.A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The Medical clinics of North America*, **88**, 787-835.

Délano-Frier, J.P., Avilés-Arnaut, H., Casarrubias-Castillo, K., Casique-Arroyo, G., Castrillón-Arbeláez, P.A., Herrera-Estrella, L., Massange-Sánchez, J., Martínez-Gallardo, N.A., Parra-Cota, F.I., Vargas-Ortiz, E. and Estrada-Hernández, M.G. (2011). Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics*, **12**, 363–380.

Demuth, H. U. and Heins, J. (1995). On the catalytic mechanism of dipeptidyl peptidase IV, in: B. Fleischer (Ed.), Dipeptidyl Peptidase IV (CD26), En *Metabolism and the Immune Response*, R.G. Landes Company, Austin, 1 –35.

Demuth, H. U., McIntosh, C. H. S. and Pederson, R. A. (2005). Type 2 diabetes—Therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1751**, 33 – 44.

Dodok, L., Modhir, A.A., Buchtova, V., Halasova, G. y Poláček., I. (1997). Importance and utilization of amaranth in the food industry. Part 2. Composition of amino acids and fatty acids. *Nahrung/Food*; **41**: 108–110.

Donnelly, R., Emslie-Smith, A.M., Gardner, I.D. and Morris, A. (2000). ABC of vascular disease: vascular complications of diabetes. *British Medical Journal*, **320**, 1062-1066.

Doyle, M.E. and Egan, J.M. (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacological Reviews*, **55**,105-131.

Drucker, D.J. (2007). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition and the treatment of type 2 diabetes: preclinical biology and mechanisms of action. *Diabetes Care*, **30**, 1335-1343.

- Drzewiecki, J., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., Jung, S.T., Trakhtenberg, S. and Gorinstein, S. (2003). Identification and differences of total proteins and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7798–7804.
- Duez, H., Cariou, B and Staels, B. (2012). DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Biochemical Pharmacology*, **83**, 823-832.
- Džunková, M., Janovská, D., Čepková, P.H., Prohasková, A. and Kolář, M. (2011). Glutelin protein fraction as a tool for clear identification of amaranth accessions. *Journal of Cereal Science*, **53**, 198–205.
- Edelstein, S.L., Knowler, W.C., Bain, R.P., Reubin, A., Barret-Connor, E.L., Dowse, G.K., Haffner, S.M., Pettit, D.J., Muller, D.C., Collins, V.R. and Hamman, R.F. (1997). Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM. *Diabetes*, **46**, 701-710.
- Egan, A. G., Blind, E., Dunder, K., de Graeff, P. A., Hummer, B. T., Bourcier, T. and Rosebraugh, C. (2014). Pancreatic Safety of Incretin-Based Drugs — FDA and EMA Assessment. *The New England Journal of Medicine*, **370**, 794-797.
- Eisenthal, R., Danson, M. J. and Hough, D. W. (2007). Catalytic efficiency and  $k_{cat}/K_M$ : a useful comparator?. *Trends in Biotechnology*, **25**, 247-249.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición; resultados nacionales 2016. Instituto Nacional de Salud Pública/Secretaría de Salud. México, 2016.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003a). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*; **26**, S5-S20.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003b). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **26**, 3160-3167.

- Fleischer, B. (1994). CD26: a surface protease involved in T-cell activation, *Immunology today*, **15**, 180–184.
- Gault, V.A., Irwin, N., Green, B.D., McCluskey, J.T., Greer, B., Bailey, C.J., Harriott, P., O'Harte, F.P. and Flatt, P.R. (2005). Chemical ablation of gastric inhibitory polypeptide receptor action by daily (Pro3)GIP administration improves glucose tolerance and ameliorates insulin resistance and abnormalities of islet structure in obesity related diabetes. *Diabetes*, **54**, 2436–2446.
- Gautier, J. F., Fetita, S., Sobngwi, E. y Salaün-Martin, C. (2005). Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*, **31**, 233–242.
- Germino, F.W. (2011). Noninsulin treatment of type 2 diabetes mellitus in geriatric patients: a review. *Clinical therapeutics*, **33**, 1868–1882.
- Golay A. (2008). Metformin and body weight. *International Journal of Obesity*, **32**, 61–72.
- Gordon, B. (2015). World Diabetes Congress 2015: Living with diabetes stream : Triumphant over complexity and flourishing with diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **108**, 514–515.
- Gorinstein, S., Jaramillo, N. O., Medina, O. J., Rogrigues, W. A., Tosello, G. A., and Paredes-Lopez, O. (1999a). Evaluation of some cereals, plants and tubers through protein composition. *Journal of Protein Chemistry*, **18**, 687–693.
- Gorinstein, S., Moshe, R., Greene, L. J. and Arruda, P. (1991b). Evaluation of four amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 851-854.
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E. Yamamoto, K., Kobayashi, S., Taniguchi, H., Haruenkit, R., Park, Y.S., Jung, S.T., Drzewiecki, J. and Trakhtenberg, S. (2004). Use of

---

scanning electron microscopy to indicate the similarities and differences in pseudocereal and cereal proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, **39**, 183–189.

Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M., and Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **82**, 886–891.

Gorinstein, S., Delgado-Licon, E., Pawelzik, E., Permady, H.H., Weisz, M. and Trakhtenberg, S. (2001). Characterization of soluble amaranth and soybean proteins based on fluorescence, hydrophobicity, electrophoresis, amino acid analysis, circular dichroism, and differential scanning calorimetry measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 5595–5601.

Graham, D.J., Ouellet-Hellstrom, R., MaCurdy, T.E., Ali, F., Sholley, C., Worrall, C. and Kelman, J.A. (2010). Risk of acute myocardial infarction, stroke, heart failure, and death in elderly medicare patients treated with rosiglitazone or pioglitazone. *Journal of the American Medical Association*, **304**, 411–418.

Grobelnik-Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M and Bavec, F. (2010). Grain amaranth as an alternative and prospective crop in temperate climate. *Journal for Geography*, **5**, 135–145.

Grobelnik-Mlakar, S., Turinek, M., Jakop, M., Bavec, M. and Bavec, F. (2009). Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura*, **6**, 43–53.

Guadix, A., Páez-Dueñas, E. M., González-Tello, M. P. and Camacho, F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, **41**, 79 – 89.

Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I. y Beagley, J. Linnenkamp, U. and Shaw, J. E. (2014). Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **103**, 137–149.

- Gunnarsson, P. T., Winzell, M. S., Deacon, C. F., Larsen, M. O., Jelic, K., Carr, R. D and Ahrén, B. (2006). Glucose-induced incretin hormone release and inactivation are differently modulated by oral fat and protein in mice. *Endocrinology*, **147**, 3173–3180.
- Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M. and Mukaihara, T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*, **134**, 797–802.
- He, M., Guan, N., Gao, W.W., Liu, Q., Wu, X.Y., Ma, D.W., Zhong, D.F., Ge, G.B., Li, C., Chen, X.Y., Yang, L., Liao, J.Y. and Wang, M.W. (2012). A continued saga of Boc5, the first non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist with in vivo activities. *Acta pharmacologica Sinica*, **33**, 148-154.
- Hopsu-Havu, V. K. and Glenner, G. G. (1966). A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie*, **7**, 197– 201.
- Huang, S.L., Hung, C.C., Jao, C.L., Tung, Y.S., and Hsu, K.C. (2014). Porcine skin gelatin hydrolysate as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, **11**, 235-242.
- Huang, S.L, Jao, C.L., Ho, K.P. and Hsu, K.C. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*, **35**, 114-121.
- IDF (International Diabetes Federation). (2015). Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium.
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M. Ferrannini, E., Nauck, M. Peters, A. L., Tsapas, A., Wender R. and Matthews, D. R. (2015). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach. *Diabetes Care*, **38**, 140-149.
- Irving, D.W., Betschart, A.A. and Saunders, R.M. (1981). Morphological studies on *Amaranthus cruentus*;. *Journal of Food Science*, **46**, 1170–1174.

- Israel, M.K., Istvan, E. and Baron, M.A. (2008). Safety and efficacy of nateglinide/metformin combination therapy in the treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, **4**, 1167–1178.
- Jódar, E. (2014). Características y tipos de agonistas del receptor de GLP-1. Una oportunidad más para la individualización terapéutica. *Medicina Clinica*, **143 (Supl 2)**, 12-17.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Megías, C. y Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y Aceites*, **58**, 49–55.
- Juurinen, L., Tiikkainen, M., Saltevo, J., Nikkilä, K., Lanki, H., Leppävuori, E., Kock, T., Teikari-Myyrä, T., Kauppinen-Mäkelin, R., Kotronen, A. and Yki-Järvinen, H. (2009). Nateglinide combination therapy with basal insulin and metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, **26**, 409–415.
- Karl, T., Hoffmann, T., Pabst, R. and von Hörsten, S. (2003). Behavioral effects of neuropeptide Y in F344 rat substrains with a reduced dipeptidyl-peptidase IV activity, *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, **75**, 869– 879.
- Katzung, B.G. (1999). Farmacología básica y clínica. Ed. Manual moderno, México, pp 203, 791-812.
- Khandaker, L., Masum-Akond, A.S.M.G., Ali, M.B. and Oba, S. (2010). Biomass yield and accumulations of bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor L.*) grown under different colored shade polyethylene in spring season. *Scientia Horticulturae*, **123**, 289–294.
- Kigel, J. (1994). Development and ecophysiology of amaranths. In: Paredes-López O, editor. *Amaranth biology, chemistry and technology*. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 39–73.
- Kim, S.J., Choi, W.S., Han, J.S., Warnock, G., Fedida, D. and McIntosh, C.H. (2005). A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent

---

insulinotropic polypeptide: protein kinase A-dependent endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 28692–28700.

Kim, W. and Egan, J.M. (2008). The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment, *Pharmacological Reviews*, **60**, 470-512.

Kojima, K., Ham, T. and Kato, T. (1980). Rapid chromatographic purification of dipeptidyl peptidase IV in human submaxillary gland. *Journal of Chromatography A*, **189**, 233–240.

Konishi, Y., Fumita, Y., Ikeda, K., Okuno, K. and Fuwa, H. (1985). Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**, 1453–9.

Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. and Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 1745-1750.

Korhonen, H. (2009) Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, **1**, 177-187.

Lacroix I. M. E. and Li-Chan, E. Y. C. (2016). Food-derived dipeptidyl-peptidase IV inhibitors as a potential approach for glycemic regulation e Current knowledge and future research considerations. *Trends in Food Science & Technology*, **54**, 1-16.

Lacroix, I. M. E. and Li-Chan, E. C. Y. (2012a). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, **25**, 97-102.

Lacroix, I. M. E. and Li-Chan, E. C. Y. (2012b). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods*, **4**, 403-422.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 – 685.

- Lapane, K.L., Yang, S., Brown, M.J., Jawahar, R., Pagliasotti, C. and Rajpathak, S. (2013). Sulfonylureas and risk of falls and fractures: a systematic review. *Drugs Aging*, **30**, 527–547.
- Lee, C.G., Boyko, E.J., Barrett-Connor, E., Miljkovic, L., Hoffman, A.R., Everson-Rose, S.A., Lewis, C.E., Cawthon, P.M., Strotmeyer, E.S., Orwoll, E.S. and Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Research Group. (2011). Insulin sensitizers may attenuate lean mass loss in older men with diabetes. *Diabetes Care*, **34**, 2381-2386.
- Loke, Y.K., Kwok, C.S. and Singh, S. (2011). Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies. *British Medical Journal*, **342**, 1-9.
- López-Mejía, O.A., López-Malo, A. and Palou, E. (2014). Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*; **53**, 55–59.
- Mannucci, E., Cremasco, F., Romoli, E. and Rossi, A. (2011). The use of insulin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **12**, 2865–2881.
- Martínez, E.N., Castellani, O.F. and Añon, M.C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3832–9.
- Matsuyama-Yokono, A., Tahara, A., Nakano, R., Someya, Y., Shiraki, K., Hayakawa, M. and Shibasaki, M. (2009) Antidiabetic effects of dipeptidyl peptidase–IV inhibitors and sulfonylureas in streptozotocin-nicotinamide–induced mildly diabetic mice. *Metabolism Clinical and Experimental*, **58**, 379–386.
- Matteucci, E. and Giampietro, O. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition: Linking chemical properties to clinical safety. *Current Medicinal Chemistry*, **18**, 4753-4760.
- Milán-Carrillo, J., Montoya-Rodríguez, A. and Reyes-Moreno, C. (2012a). High-antioxidant capacity beverages based on extruded and roasted amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*)

---

flour. In: Tunick MH, González de Mejía E, editors. *Hispanic foods: chemistry and bioactive compounds*. 1<sup>st</sup> ed, vol 1109. Washington, D.C.: American Chemical Society. p 199–216.

Milán-Carrillo, J., Montoya-Rodríguez, A., Gutiérrez-Dorado, R., Perales-Sánchez, X. and Reyes-Moreno, C. (2012b). Optimization of extrusion process for producing high-antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Applied Mathematics*, **3**, 1516–1525.

Mochida, T., Hira, T., and Hara, H. (2010). The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, **151**, 3095-3104.

Mojica, L. and González de Mejía, E. (20015). Characterization and Comparison of Protein and Peptide Profiles and their Biological Activities of Improved Common Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mexico and Brazil. *Plant Foods for Human Nutrition*, **70**, 105–112.

Montoya-Rodríguez, A. Gómez-Favela, M.A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J. and González de Mejía, E. (2015). Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **14**, 139–158.

Morales de Leon, J., Camacho, M.E. and Bourges, H. (2005). Amino acid composition of some Mexican foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **55**, 172–186.

Moreno-Altamirano, L., García-García, J. J., Soto-Estrada, G., Capraro, S. y Limón-Cruz, D. (2014). Epidemiología y determinantes sociales asociados a la obesidad y la diabetes tipo 2 en México. *Revista Médica del Hospital General de México*, **77**, 114-123.

NOM-062-ZOO-1999. (1999). Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.

- Nongonierma, A. B. and FitzGerald, R. J. (2016). Prospects for the management of type 2 diabetes using food protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Current Opinion in Food Science*, **8**, 19-24.
- Nongonierma, A. B., and FitzGerald, R. J. (2014). An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, **165**, 489-498.
- Nyberg, J., Anderson, M.F., Meister, B., Alborn, A.M., Strom, A.K., Brederlau, A., Illerskog, A.C., Nilsson, O., Kieffer, T.J., Hietala, M.A., Ricksten, A. and Eriksson, P.S. (2005). Glucose-dependent insulintropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 1816–1825.
- Orsini, D.M.C., Tironi, V. A and Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*, **44**, 1752–1760.
- Osborne, T. B. (1924). The vegetable proteins. In Longmans, Green, and Co. (2<sup>nd</sup> Ed.), *Monographs in biochemistry*. Nueva York, EUA.
- Patil, P, Mandal, S., Tomar, S.K. and Anand, S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *European Journal of Nutrition*, **54**, 863–880.
- Pauly, R. P., Demuth, H.U., Rosche, F., Schmidt, J., White, H. A., McIntosh, C. H. S. and Pederson, R. A. (1996). Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DP IV) in rat results in improved glucose tolerance. *Regulatory Peptides*, **64**, 141-148.
- Pavlik, V. (2012). The revival of amaranth as a third-millennium food. *Neuroendocrinology Letters*, **33**, 3–7.

- Phillips, P., Karrasch, J., Scott, R., Wilson, D. and Moses, R. (2003). Acarbose improves glycemic control in overweight type 2 diabetic patients insufficiently treated with metformin. *Diabetes Care*, **26**, 269–273.
- Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F. and Ascroft, F. (2002). Beta-cell stimulus-secretion coupling:  $K^+_{ATP}$  channels on  $Ca^{+2}$  sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*, **51**, S368-S376.
- Rastogi, A. and Shukla S. 2013. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical reviews in food science and nutrition*, **53**, 109–125.
- Rosenstock, J., Hassman, D.R., Madder, R.D., Brazinsky, S.A., Farrell, J., Khutoryansky, N., Hale, P.M. and Repaglinide Versus Nateglinide Comparison Study Group. (2004). Repaglinide versus nateglinide monotherapy. A randomized, multicenter study. *Diabetes Care*, **27**, 1265–1270.
- Sánchez-Marroquin, A., Del Valle, F.R., Escobedo, M., Avitia, R., Maya, S. and Vega, M. (1986). Evaluation of whole amaranth (*Amaranthus cruentus*), its air-classified fractions, and blends of these with wheat and oats as possible components for infant formulas. *Journal of Food Science*, **51**, 1231–1234.
- Schägger, H. and Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368 – 379.
- Schön, E., Demuth, H. U., Barth, A. and Ansorge, S. (1984). Dipeptidyl peptidase IV of human lymphocytes. Evidence for specific hydrolysis of glycyproline p-nitroanilide in T-lymphocytes. *Journal of Biochemistry*, **223**, 255– 258.
- Schwarz, S.L., Gerich, J.E., Marcellari, A., Jean-Louis, L., Purkayastha, D. and Baron, M.A. (2008). Nateglinide, alone or in combination with metformin, is effective and well tolerated in

treatment-naïve elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **10**, 652–660.

Scirica, B. M., Bhatt, D. L., Braunwald, E., Steg, G., Davidson, J., Hirshberg, B., Ohman, P., Frederich, R., Wiviott, S. D., Hoffman, E. B., Cavender, M. A., Udell, J. A., Desai, N. R., Mosenzon, O., McGuire, D. K., Ray, K. K., Leiter, L. A. and Raz, I. (2013). Saxagliptin and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*, **369**, 1317-1326.

Segel, I. H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. New York: Wiley.

Senft, J.P. (1979). Protein quality of amaranth grain. In: Proceeding of second amaranth conference. Emmaus, Pa.: Rodale Press. p 43–47.

Shaw, J.E., Sicree, R.A. and Zimmet, P.Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **87**, 4–14.

Shevkani, K., Singh, N., Chand-Rana, J. and Kaur, A. (2014). Relationship between physicochemical and functional properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, **49**, 541–550.

Silberberg, S.D. and Van Breemen, C. (1991). An ATP, calcium and voltage sensitive potassium channel in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **172**, 517-522.

Silva-Sánchez, C., Barba de la Rosa, A. P., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., De León-Rodríguez, A. and González de Mejía E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1233-1240.

Solini, A., Penno, G., Bonora, E., Fondelli, C., Orsi, E., Trevisan, R., Vedovato, M., Cavalot, F., Cignarelli, M., Morano, S., Ferrannini, E., Pugliese, G. and Renal Insufficiency and

- Cardiovascular Events Study Group. (2013). Age, renal dysfunction, cardiovascular disease, and anti-hyperglycemic treatment in type 2 diabetes mellitus: findings from the renal insufficiency and cardiovascular events Italian multicenter study. *Journal of the American Geriatrics Society*, **61**, 1253–1261
- Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S. and Fujimoto, K. (1992). Solubility of amaranth seed protein in sodium sulphate and sodium chloride: The main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, **27**, 337 – 346.
- Standl E, Schenll O. (2012). Alpha-glucosidase inhibitors 2012 – cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diabetes and Vascular Disease Research*, **9**, 163–169.
- Stang. M., Wysowski, D. and Butler-Jones, D. (1999). Incidence of lactic acidosis in metformin users. *Diabetes Care*, **22**, 925–927.
- Stein, S.A., Lamos, E.M. and Davis, S.N. (2013). A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. *Expert Opinion on Drug Safety*, **12**, 153–175.
- Stephen, L., Gwaltney, II. and Jeffrey A. S. (2005). Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 4. En *Annual reports in medicinal chemistry: Section 2 Cardiovascular and Metabolic Diseases*, Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 4. Elsevier Inc. USA. 149-165.
- Stephen, L., Gwaltney, II. and Jeffrey A. S. (2005). Inhibitors of Dipeptidyl Peptidase 4. En *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Elsevier Inc. USA. 149-165.
- Tandang-Silvas, M.R., Cabanos, C.S., Peña, L.D.C., De La Rosa, A.P.B., Osuna-Castro, J.A., Utsumi, S., Mikami, B. and Maruyama, N. (2012). Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglubulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: insight into its physico-chemical properties. *Food Chemistry*, **135**, 819–826.

- Tavano, O.L., Da-Silva, S.I.Jr., Demonte, A. and Neves, V.A. (2008). Nutritional responses of rats to diets based on chickpea (*Cicer arietinum* L.) seed meal or its protein fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 11006–11010.
- The American Geriatrics Society 2015 Beers Criteria Update Expert Panel. (2015). American Geriatrics Society updated Beers Criteria for potentially inappropriate medication use in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, **60**, 616–631.
- Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Auwerx, J. and Schoonjans, K. (2009) TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell metabolism*, **10**, 167-177.
- Tovar-Pérez, E. (2012). Caracterización bioquímica y tecno-biofuncional de hidrolizados de albúmina-1 y globulina del grano de amaranto. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A. and Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, **116**, 437-444.
- Tulipano, G., Cocchi, D. and Caroli, A. M. (2012). Comparison of goat and sheep  $\beta$ -lactoglobulin to bovine  $\beta$ -lactoglobulin as potential source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors. *International Dairy Journal*, **24**, 97–101.
- Tulipano, G., Faggi, L., Nardone, A., Cocchi, D., and Caroli, A. M. (2015). Characterisation of the potential of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin as sources of bioactive peptides affecting incretin function: in silico and in vitro comparative studies. *International Dairy Journal*, **48**, 66-72.
- Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A. M. and Cocchi, D. (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV(dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, **32**, 835–838.

- Ulmer, A. J., Mattern, T. and Flad, H.D. (1992). Expression of CD26 (dipeptidyl peptidase IV) on memory and naive T lymphocytes, *Scandinavian Journal of Immunology*, **35**, 551–559.
- Valdez-Ortiz, A., Rascón-Cruz, Q., Medina-Godoy, S., Sinagawa-García, S.R., Valverde-González, M.E. and Paredes-López, O. (2005). One-step purification and structural characterization of a recombinant His-tag 11S globulin expressed in transgenic tobacco. *Journal of Biotechnology*, **115**, 413–423.
- Valencia, W. M. and Florez H. (2014). Pharmacological treatment of diabetes in older people. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **16**, 1192–1203.
- Vasco-Méndez, N.L. and Paredes-López, O. (1994). Antigenic homology between amaranth glutelins and other storage proteins. *Journal of Food Biochemistry*, **18**, 227–238.
- Vecchi, B. and Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, **70**, 864 – 870.
- Velarde-Salcedo, A.J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G.M., Díaz-Gois, A., González de Mejía, E. and Barba de la Rosa, A.P. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, **136**, 758–764.
- Ventura-Sobrevilla, J., Boone-Villa, V.D., Aguilar, C.N., Román-Ramos, R., Vega-Ávila, E., Campos-Sepúlveda, E. and Alarcón-Aguilar, F. (2011). Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, **54**, 5-9.
- Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., Boury, F., Añón, M. C. and Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT - Food Science and Technology*, **45**, 1 – 7.

- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. y Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, **52**, 132 – 136.
- White, W. B., Cannon, C. P., Heller, S. R. Nissen, S. E., Bergenstal, R. M., Bakris, G. L., Perez, A. T., Fleck, P. R., Mehta, C. R., Kupfer, S., Wilson, C., Cushman, W. C. and Zannad, F. (2013a). Alogliptin after Acute Coronary Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*, **369**, 1327-1335.
- White, W. B., Pratley, R., Fleck, P., Munsaka, M., Hisada, M., Wilson, C. and Menon, V. (2013b). Cardiovascular safety of the dipetidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, **15**, 668-673.
- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C. and Shaw, J. IDF Diabetes Atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. (2011). *Diabetes Research and Clinical Practice*, **94**, 311–321.
- WHO. (World Health Organization) Department of non communicable disease surveillance. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation. Geneva. WHO/NCD/NCS/99.2 pp 1-66.
- Wiedeman, P. E. (2007). DPPIV inhibition: Promising therapy for the treatment of type 2 diabetes. *Progress in Medicinal Chemistry*, **45**, 63-109.
- Wiedeman, P. E. and Trevillayn, J. M. (2003). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment for impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Current Opinion in Investigational Drugs*, **4**, 412-420.
- Yaron, A. (1987). The role of proline in the proteolytic regulation of biologically active peptides. *Biopolymers*, **26**, S215–S222.

Zapotoczny, P., Markowski, M., Majewska, K., Ratajski, A. and Konopko H. (2006). Effect of temperature on the physical, functional, and mechanical characteristics of hot-air-puffed amaranth seeds. *Journal of Food Engineering*, **76**, 469–76.

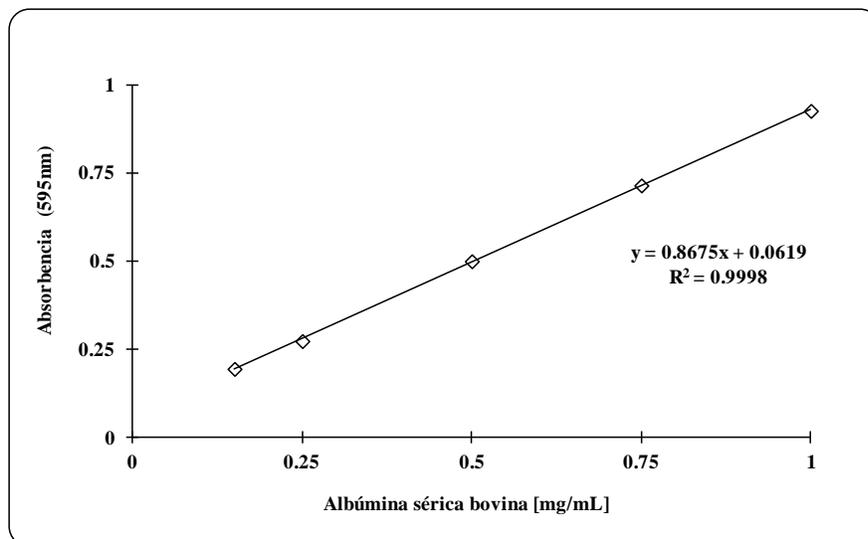
Zhong, Q., Itokawa, T., Sridhar, S., Ding, K.H., Xie, D., Kang, B., Bollag, W.B., Bollag, R.J., Hamrick, M., Insogna, K. and Isales, C.M. (2007). Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *American Journal of Physiology*, **292**, E543–E548.

## 10. APÉNDICES

### APÉNDICE 1. Curvas patrón para ensayos espectrofotométricos

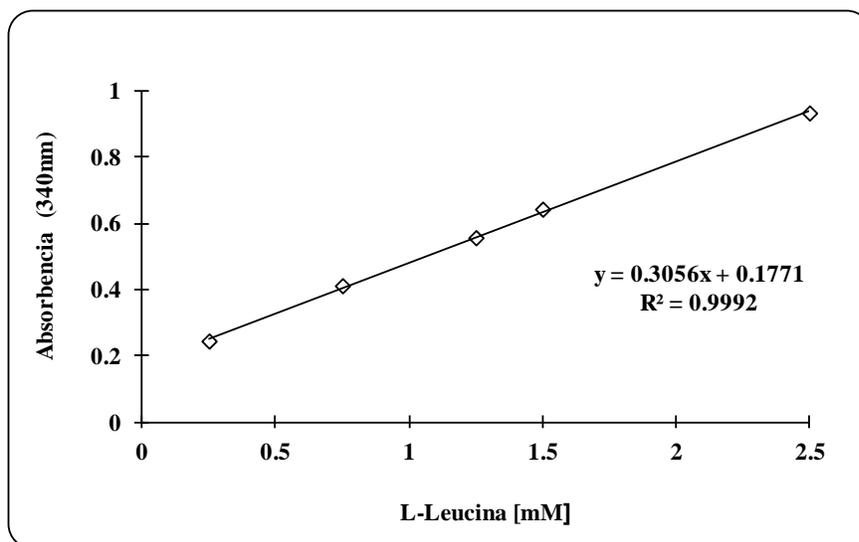
#### A. Curva patrón de albúmina sérica bovina

Albúmina sérica bovina [mg/mL]	Absorbencia (595 nm)
0.15	0.194 ± 0.003
0.25	0.273 ± 0.001
0.5	0.500 ± 0.001
0.75	0.715 ± 0.002
1.0	0.927 ± 0.001



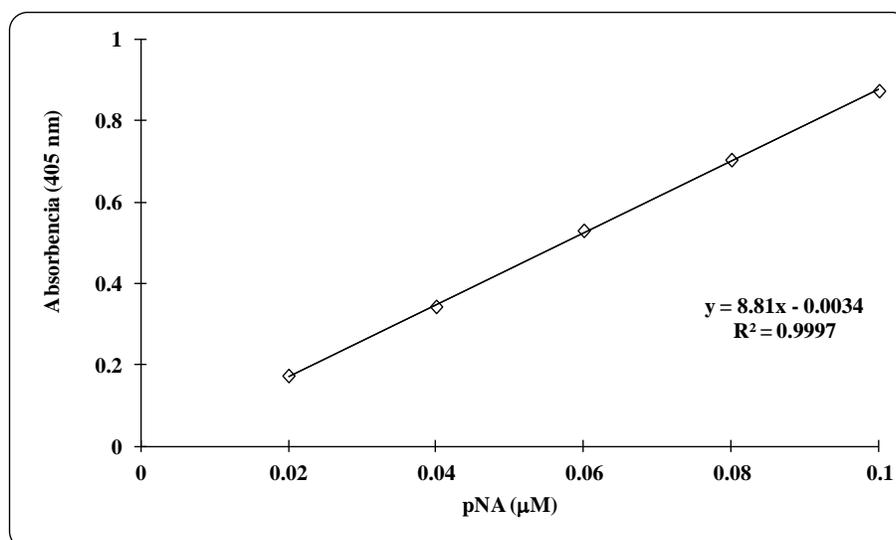
**B. Curva patrón de L-Leucina**

L-Leucina [mM]	Absorbencia (340 nm)
0.25	0.245 ± 0.002
0.75	0.412 ± 0.002
1.25	0.558 ± 0.002
1.5	0.644 ± 0.002
2.5	0.935 ± 0.003



## C. Curva patrón de p-Nitroanilina

pNA [mM]	Absorbencia (405 nm)
0.02	0.173 ± 0.003
0.04	0.343 ± 0.009
0.06	0.530 ± 0.007
0.08	0.704 ± 0.017
0.1	0.874 ± 0.008

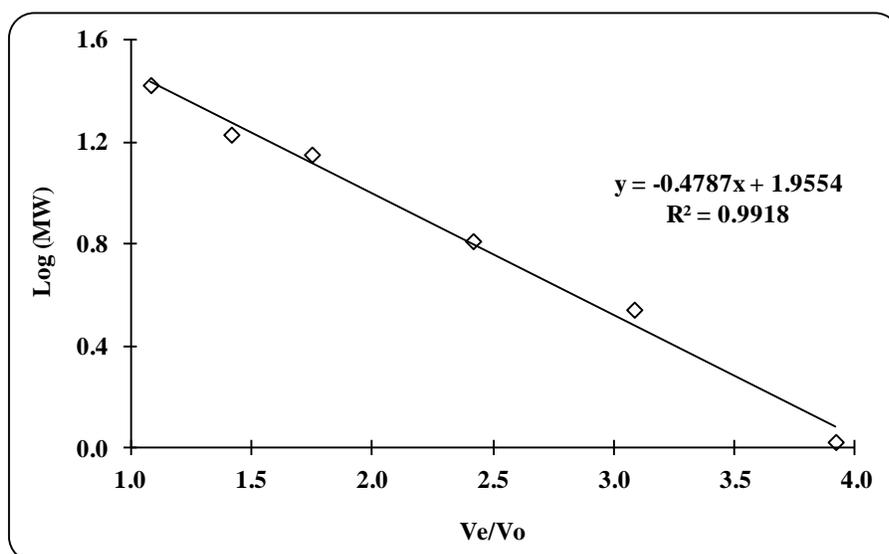


**APÉNDICE 2. Curva patrón de pesos moleculares para filtración en gel Sephadex G-50**

Estándar	Ve/Vo <sup>a</sup>	Log (M <sub>w</sub> ) <sup>b</sup>
Triosa fosfato isomerasa	1.08	1.42
Mioglobina	1.42	1.23
α-lactoalbúmina	1.75	1.15
Aprotinina	2.42	0.81
Insulina	3.08	0.54
Bradicinina	3.92	0.03

<sup>a</sup>Ve.- Volumen de elución; Vo.- Volumen vacío

<sup>b</sup>M<sub>w</sub>.- Peso molecular relativo

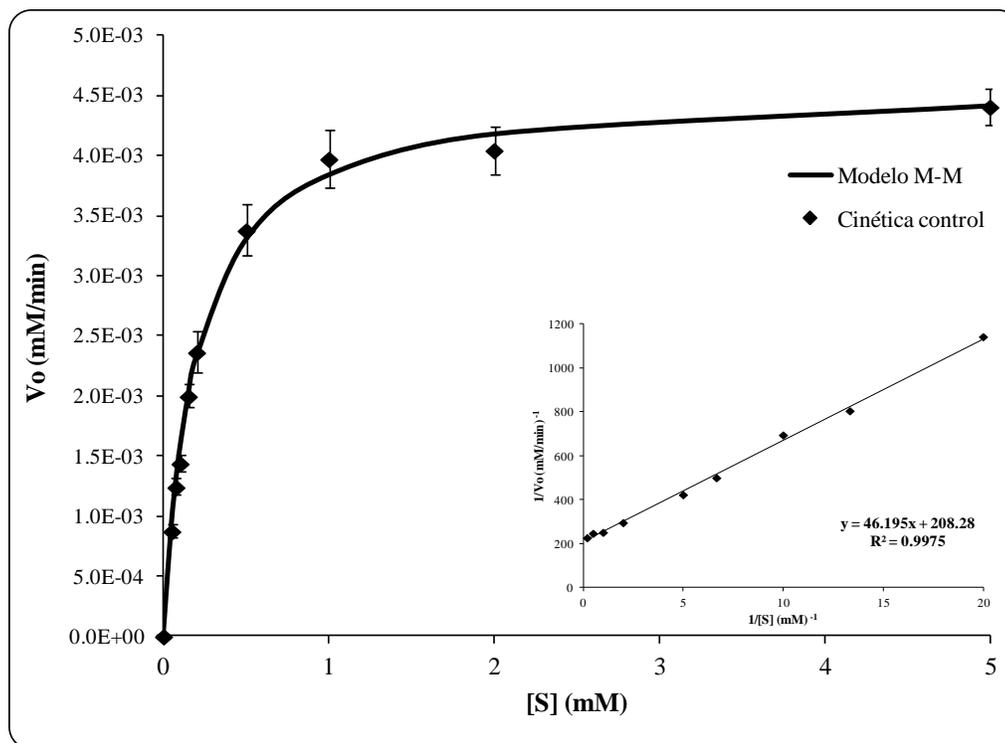


### APÉNDICE 3. Cinética enzimática control de la DPP-IV

El ajuste matemático utilizado para la obtención de los parámetros cinéticos de la enzima se realizó utilizando la ecuación de Michaelis-Menten (M.M) [Km y Vmax], 1) Realizando el ajuste por medio de la ecuación de M.M, utilizando el modelo de la ecuación logística (por la rutina de Solver, Excel; ec.-1) y 2) realizando el gráfico de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (ec.-2).

$$v_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad ec. -1$$

$$\frac{1}{v_o} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad ec. -2$$



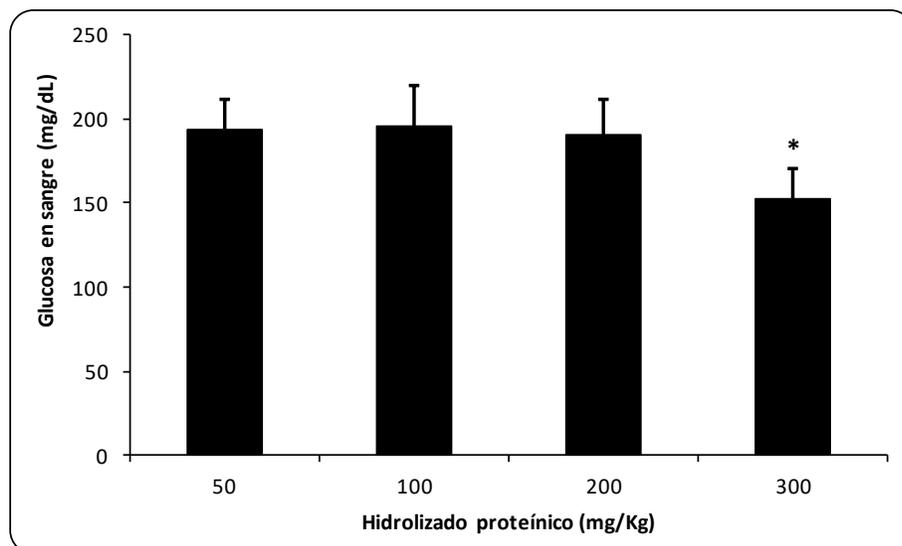
Donde:

$$K_m = 0.22 \text{ mM}$$

$$V_{max} = 4.8 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{M/min}$$

**APÉNDICE 4. Determinación de la dosis de hidrolizado proteínico sobre la glucemia de ratones diabéticos.**

Ratón	Dosis (mg/kg)			
	50	100	200	300
1	201	210	196	157
2	187	170	168	134
3	167	220	210	179
4	206	170	169	155
5	210	210	210	140
Promedio	194.2 ± 17.51	196 ± 24.08	190.6 ± 20.97	153 ± 17.51



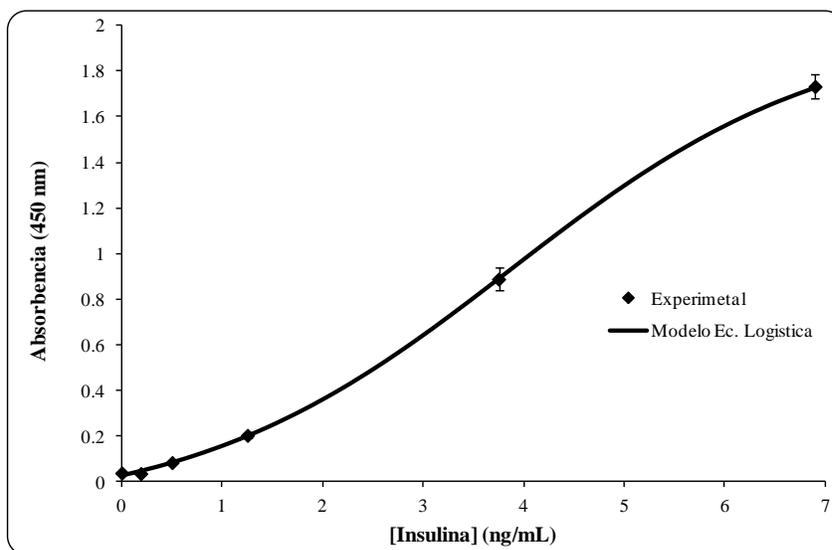
\*Reducción significativa de la glucemia  $P < 0.05$ .

**APÉNDICE 5. Curvas estándar determinadas por ELISA.**

**A. Análisis de regresión no lineal para la determinación de insulina en suero.**

Para el ajuste de la concentración de insulina se utilizó el modelo matemático de la ecuación logística:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/C)^p} + A_2$$



Donde:

$$A_1 = 0.00239$$

$$A_2 = 4.92$$

$$C = 8.24 \times 10^3$$

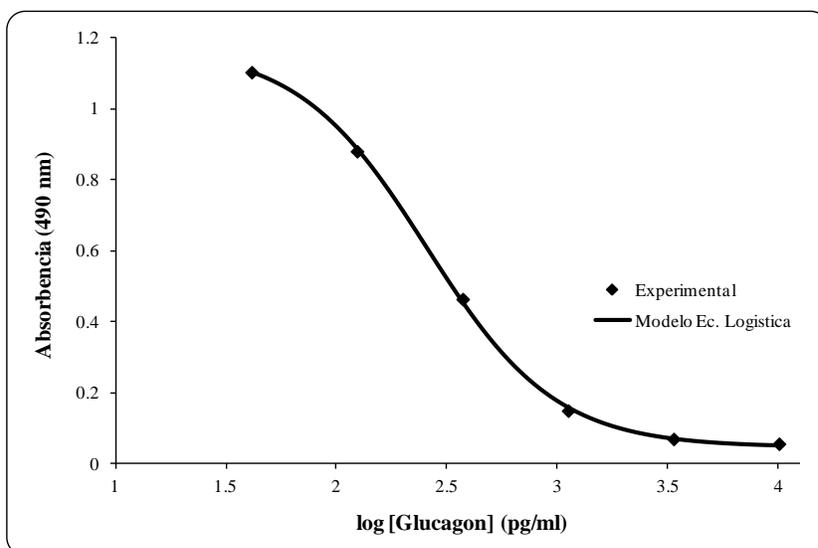
$$p = 1.81$$

$$R^2 = 0.998$$

**B. Análisis de regresión no lineal para la determinación de glucagón en suero**

Para el ajuste de la concentración de glucagón se utilizó el modelo matemático de la ecuación logística, ajustada por la pendiente de Hill:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + 10^{(x - \log x_0)}}$$



Donde:

$$A_1 = 3.56$$

$$A_2 = 0.00134$$

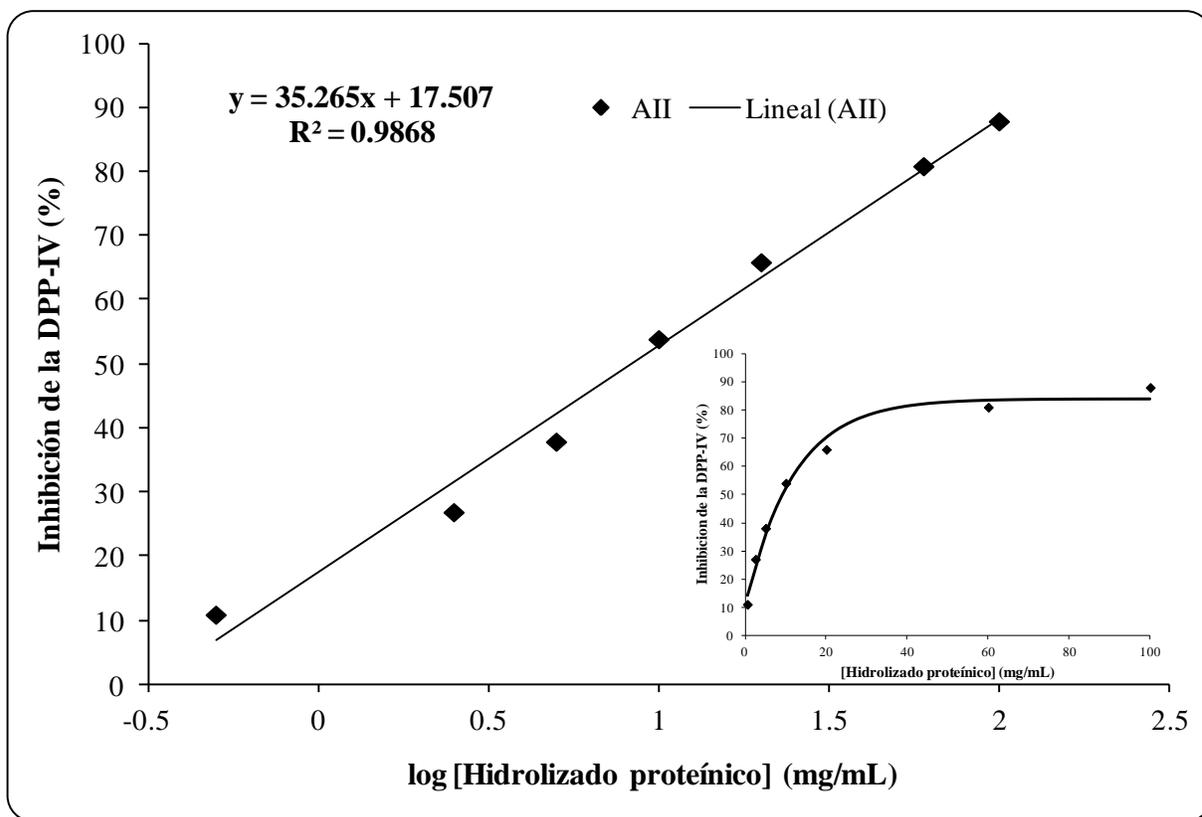
$$\log x_0 = \log(41) = 1.6127$$

$$R^2 = 0.9995$$

**APÉNDICE 6. Regresiones lineales para la determinación del IC<sub>50</sub>**

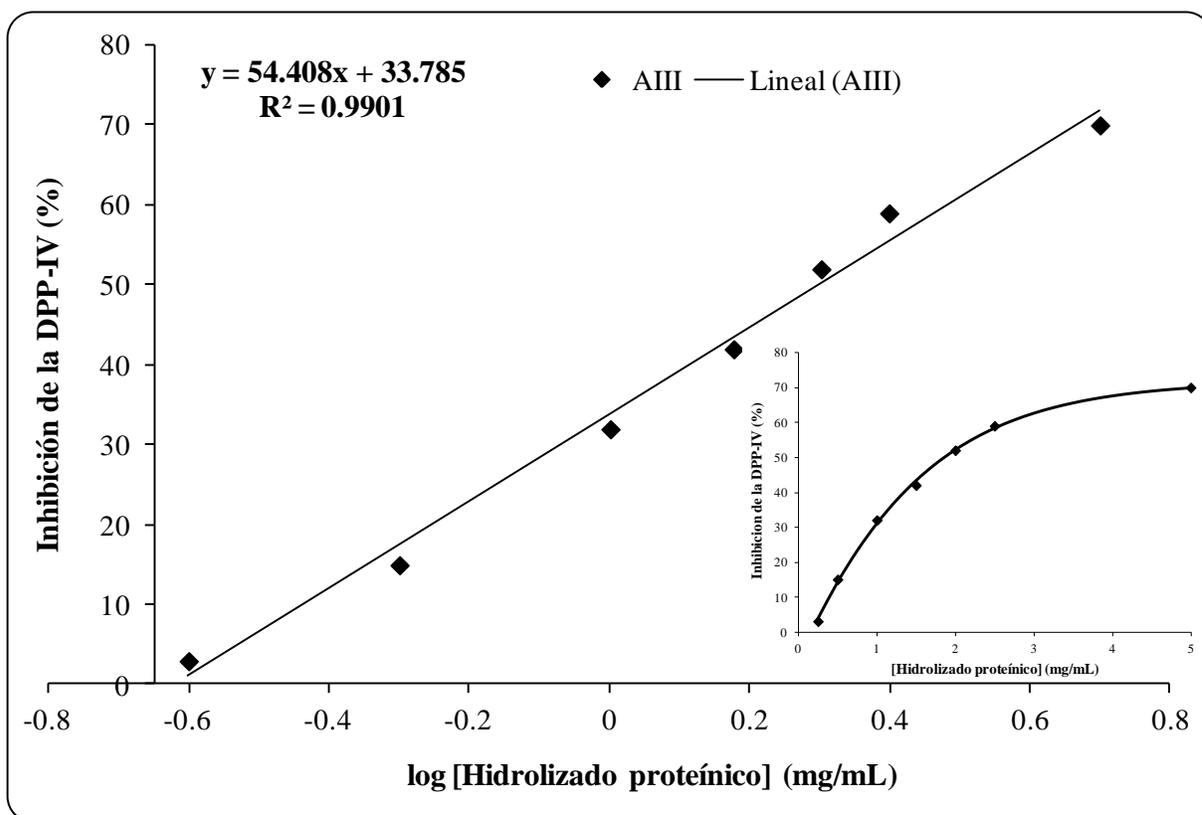
**A. Análisis de regresión lineal para determinar los valores IC<sub>50</sub> de los hidrolizados de albúmina 1 (AII)**

Hidrolizado de Albúmina 1 (AII) [mg/mL]	Inhibición de la DPP-IV (%)
0.5	11
2.5	27
5	38
10	54
20	66
60	81
100	88



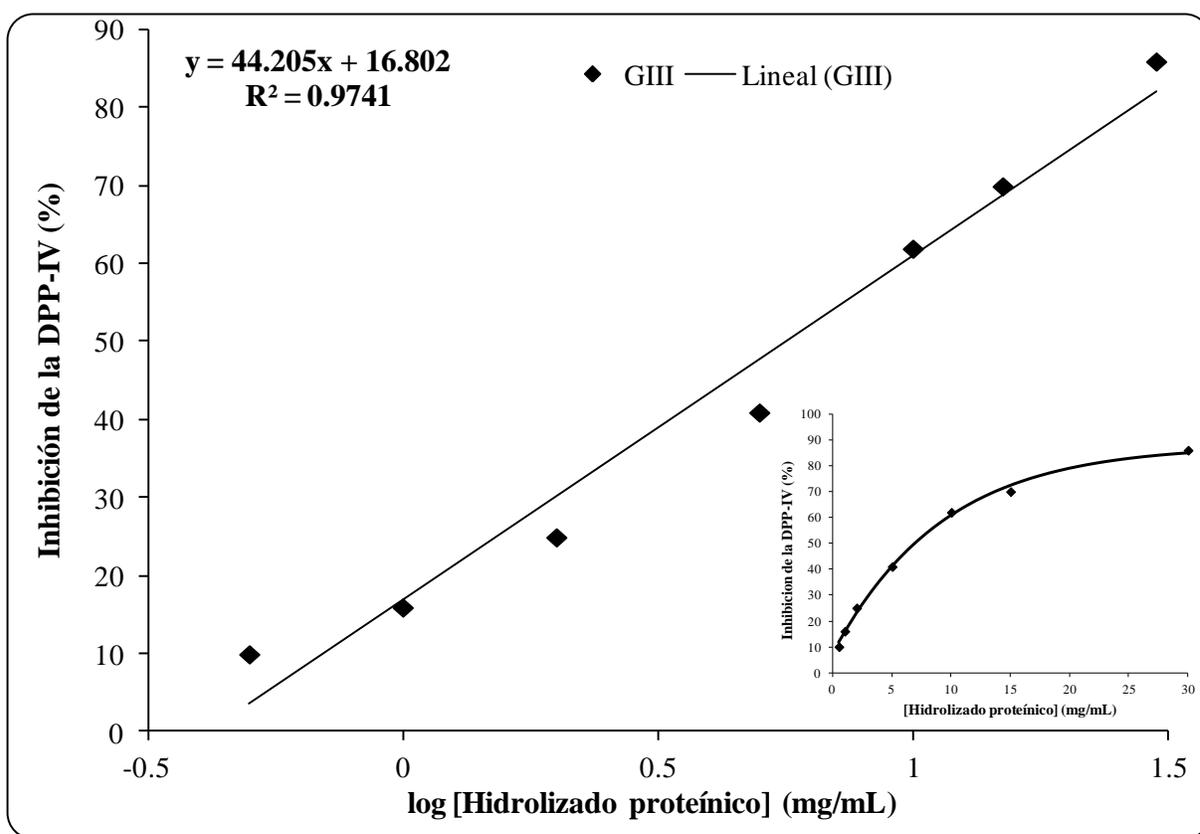
**B. Análisis de regresión lineal para determinar los valores IC<sub>50</sub> de los hidrolizados de albúmina 1 (AIII)**

Hidrolizado de Albúmina 1 (AIII) [mg/mL]	Inhibición de la DPP-IV (%)
0.25	3
0.5	15
1	32
1.5	42
2	52
2.5	59
5	70



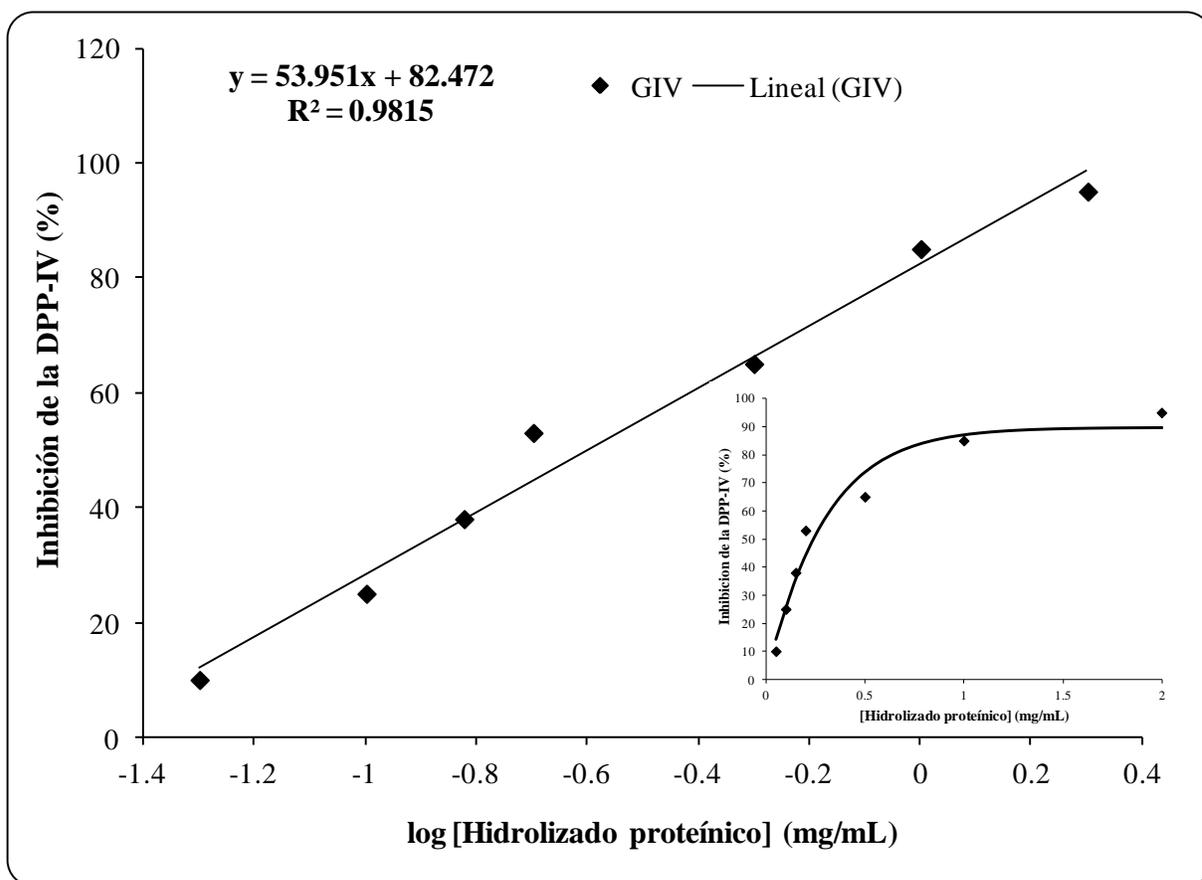
C. Análisis de regresión lineal para determinar los valores  $IC_{50}$  de los hidrolizados de Globulina (GIII)

Hidrolizado de Globulina (GIII) [mg/mL]	Inhibición de la DPP-IV (%)
0.5	10
1	16
2	25
5	41
10	62
15	70
30	86



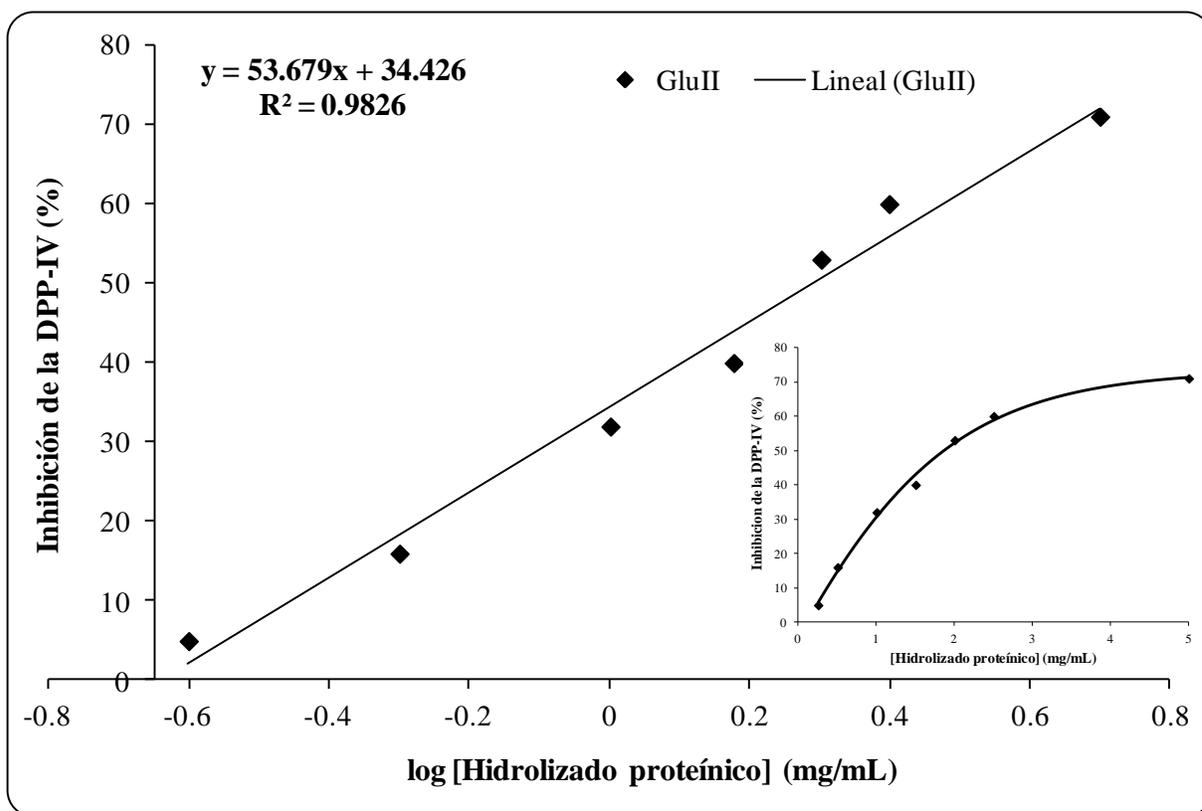
**D. Análisis de regresión lineal para determinar los valores IC<sub>50</sub> de los hidrolizados de Globulina (GIV)**

Hidrolizado de Globulina (GIII) [mg/mL]	Inhibición de la DPP-IV (%)
0.05	10
0.1	25
0.15	38
0.2	53
0.5	65
1	85
2	95

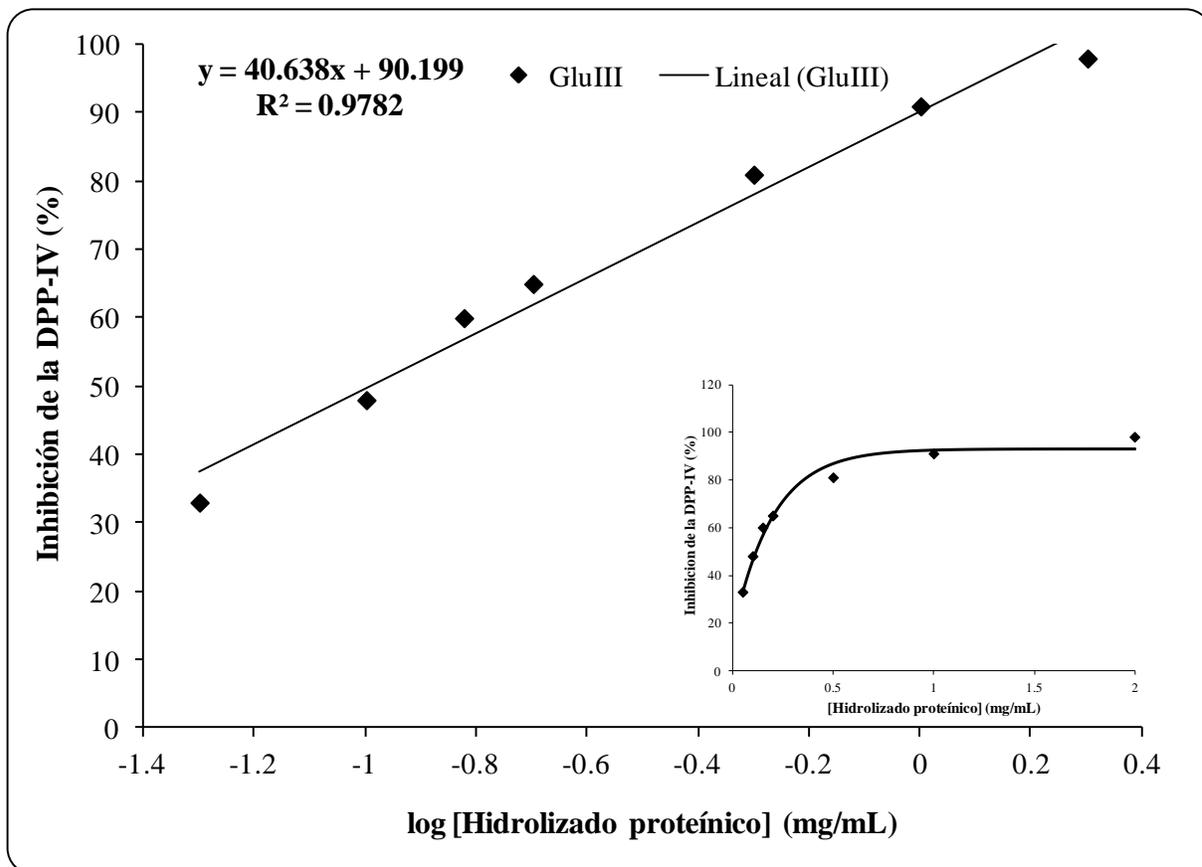


**E. Análisis de regresión lineal para determinar los valores IC<sub>50</sub> de los hidrolizados de Glutelina (GluII)**

Hidrolizado de Glutelina (GluII) [mg/mL]	Inhibición de la DPP-IV (%)
0.25	5
0.5	16
1	32
1.5	40
2	53
2.5	60
5	71



F. Análisis de regresión lineal para determinar los valores  $IC_{50}$  de los hidrolizados de Glutelina (GluIII)



---

## APÉNDICE 7. Productos del trabajo

### ❖ PUBLICACIONES

#### 1. Artículo de investigación.

Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolyzates from *Amaranthus hypochondriacus* L. grain and their influence on postprandial glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice (2015). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **12**, 90-98.

#### 2. Memorias en extenso.

- Glutelins hydrolysates of amaranth grain having hypoglycemic activity: In vivo model. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Protein hydrolyzates of amaranth grain (*Amaranthus hypochondriacus* L.) with hypoglycemic activity. Five Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries.
- Hidrolizados de albúmina y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) que presentan actividad hipoglucemiante. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y VII Congreso Internacional de Bioquímica.

### ❖ PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- Hidrolizados proteicos de albumina-1 y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) con capacidad de inhibir la dipeptidil peptidasa-IV XXXIII Congreso del Encuentro Nacional y 2do. Congreso Internacional del AMIDIQ. Cancún, Quintana Roo, México (Junio 2012). Exposición de Cartel.

- Hidrolizados de albúmina y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) que presentan actividad hipoglucemiante. XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica y VII Congreso Internacional de Bioquímica, Acapulco, Guerrero, México (Marzo 2012). Exposición de Cartel.
- Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) como fuente de péptidos con capacidad para inhibir la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV). XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Juriquilla, Querétaro, México (Junio 2011). Exposición Oral.

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORY ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYZATES FROM *AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS* L. GRAIN AND THEIR INFLUENCE ON POSTPRANDIAL GLYCEMIA IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC MICE.

Soriano-Santos Jorge<sup>1,§,\*</sup>, Reyes-Bautista Raúl<sup>1,§</sup>, Guerrero-Legarreta Isabel<sup>1</sup>, Ponce-Alquicira Edith<sup>1</sup>, Escalona-Buendía Héctor Bernardo<sup>1</sup>, Almanza-Pérez Julio César<sup>2</sup>, Díaz-Godínez Gerardo<sup>3</sup>, Román-Ramos Rubén<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología; <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco, No. 186, Col. Vicentina, Ap. P. 55-535, Deleg. Iztapalapa, CP 09340, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, CP 90000, Mexico.

§: Both authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author E-mail: [jss@xanum.uam.mx](mailto:jss@xanum.uam.mx)

## Abstract

**Background:** Type 2 diabetes is a chronic metabolic disorder. Recently, dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors that protect incretin hormones from being cleaved by DPP-IV have been used as drugs to control glycaemia. This study examined the potential hypoglycemic effect of amaranth grain storage protein hydrolyzates to control postprandial glycaemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice as a model system of diabetes, and their inhibition mode on the enzyme.

**Material and Methods:** Amaranth grain proteins were isolated and hydrolyzed and fractionated by gel filtration. The DPP-IV inhibitory activity of hydrolyzates as well as their kinetic parameters were assessed. Selected hydrolyzates (300 mg/kg body weight) were administered in a single administration-study (SAS) or in the same concentration during a four-week chronic daily dosing study (FWCDDS) in order to observe the effect on postprandial glycaemia of diabetic mice.

**Results:** Albumin 1, Globulin and Glutelin hydrolyzates (GluH) competitively inhibited DPP-IV *in vitro* ( $K_i = 0.11-5.61$  mg/mL). GluH called Glu.III ( $IC_{50} = 0.12 \pm 0.01$  mg/mL) considerably inhibited DPP-IV activity. GluH identified as GluH24 improved glucose tolerance significantly ( $p < 0.05$ ), with remarkable increments in plasma insulin in SAS and FWCDDS (1.25 and 2.25 mg/mL, respectively). This effect could be compared to the one obtained from the mice group that was administered Sitagliptin (580 mg/kg body weight) as positive control ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Amaranth Glutelin hydrolyzates yielded the highest enzyme inhibitory activity reported not only *in vitro*, but also in the STZ-induced diabetic mice in order to control postprandial glycaemia.

**Key words:** Amaranth protein hydrolyzate, DPP-IV inhibitory activity, diabetes

## Introduction

Amaranth grain is a traditional crop of Mexico and other countries. It has a great amount of genetic diversity, phenotypic plasticity and it is extremely adaptable to adverse growing conditions: it resists heat and drought and faces no major disease problems. Amaranth can be easily grown in agriculturally marginal lands. It has also been considered a nutritive food because its protein is rich in lysine, which is a limiting amino acid in other crops, and has other nutrients necessary for a well-balanced diet (Rastogi and Shukla, 2013). This food has bio-functional properties (biological activity) which provide medicinal benefits such as the following: it decreases plasma cholesterol levels, stimulates the immune system, exerts an antitumor activity and improves conditions of hypertension and anemia. In addition, it has also been reported as having anti-allergic and antioxidant activities (Caselato-Sousa and Amaya-Farfán, 2012). Some studies have revealed that amaranth's influence on blood glucose level. A previous report claims that the consumption of either the grain or oil may protect against insulin deficiency, but another study claims that the high glycemic index of the starch is a liability to diabetic patients (Kim et al., 2006). What is more, the effect of proteins and their hydrolyzates in regulating glycaemia in humans is still largely unknown. This should be taken into account when considering amaranth as a food aimed at people with type 2 diabetes (T2D). It is estimated that by 2030 the number of people affected with diabetes will have reached 366 million (Wild et al., 2004). Thus, this paper focuses on the *in vivo* inhibitory activity of hydrolyzates of amaranth grain storage proteins against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; EC 3.4.14.5). DPP-IV is a serine protease that modulates the biological activity of circulating peptide hormones by specifically cleaving 2N-terminal amino acids: Xaa-Pro and Xaa-Ala (Bjelke et al., 2006). Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) are gut-derived peptides, so-called incretin hormones, that stimulate insulin secretion from the islet  $\beta$ -cells in a glucose-dependent manner. Incretins are responsible for releasing roughly 70% of postprandial insulin. GIP and GLP-1 are secreted within minutes of nutrient ingestion, with plasma levels rapidly falling back to basal values after termination of feeding (Drucker, 2006). GIP and GLP-1 are metabolized extremely rapidly by the DPP-IV. The enhancement of insulin secretion by gut-derived factors such as GIP and GLP-1 is called the "incretin effect". Recently, DPP-IV inhibitors that protect active GLP-1 from being cleaved by DPP-IV have been used as drugs to control postprandial glycaemia in T2D (Richter et al., 2008). Thus, complementary strategies to treat this illness currently include the use of protease-resistant GLP-1 analogs used as injectable agents, and the use of orally administered inhibitors of DPP-IV activity (Drab, 2010).

Recently, some amaranth components have been isolated and treated by biotechnological procedures and there have been several reports about the assessment of their bio-functionality. From one of these procedures, bioactive peptides have been obtained: these are not only specific, but also small protein fragments that are actually inactive within the sequence of their parent protein (Korhonen and Philanto, 2003). Therefore, enzymatic

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

hydrolyzates of amaranth protein have been thought of as a source of these bio-peptides. Several bioactive peptides obtained from amaranth proteins exhibit bio-functionality including antitumoral effects by lunasin (Silva-Sánchez et al., 2008), inhibition of angiotensin I-converting enzyme (Tiengo and Netto, 2009; Tovar-Pérez et al., 2009; Vecci and Anón, 2009; Barba de la Rosa et al., 2010; Luna-Suarez et al., 2010; Fritz et al., 2011) and antioxidant (Tironi and Anón, 2010; Orsini et al., 2011). Nevertheless, little attention has been given to the possibility that dietary proteins may also contain, within their sequences, fragments corresponding to DPP-IV inhibitory peptides, and thus might be used as natural sources of DPP-IV inhibitors in the management of T2D. Several peptides with DPP-IV inhibitory activity have been identified through an *in silico* analysis from amaranth grain storage protein hydrolyzates and studies were carried out to predict their binding modes at the molecular level (Velarde-Salcedo et al., 2013). Similarly, inhibition of DPP-IV activity has also been found, *in silico*, in 34 food proteins. Caseins from cow milk and collagens from beef and salmon appeared to be the richest potential sources of DPP-IV inhibitors. GA, GP and PG were the most frequently occurring sequences (Lacroix and Lee-Chan, 2012a).

To the best of our knowledge there is no report on *in vivo* assessment of DPP-IV inhibitory activity of amaranth grain storage protein hydrolyzates. Therefore, in this study the potential hypoglycemic effect of amaranth grain storage protein hydrolyzates to control postprandial glycemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice as a model system of diabetes, and their inhibition mode on the enzyme were examined.

## Materials and methods

### Sample preparation

*Amaranthus hypochondriacus* grain cultivar Revancha obtained from INIFAP-Campus Montecillo, México was used in this research. The whole grain was milled using a Udy mill (Udy Corporation Fort Collins, Co, USA) until flour was obtained; then it was defatted with acetone (5 mL/g). After drying at room temperature, the defatted flour was sieved through a 60-mesh screen and stored at 5°C until further analysis. The defatted flour proximate analysis was carried out according to AOAC (2000) standard procedures. The content of components was (g/100 g of defatted flour): water (11.1±0.08), ashes (3.15±0.12), crude protein (%N X 5.87= 15.43±0.18), ether extract (0.18±0.01), crude fiber (4.91±0.06) and carbohydrates calculated by difference (65.23±0.08). All experiments throughout this study were performed in triplicate.

### Extraction and hydrolysis by alcalase of amaranth grain storage proteins

Albumin 1 (Alb1) and globulin (Glo) were extracted from defatted flour according to the method described by Tovar-Pérez et al. (2009). Alb1 was separated from Glo by dialysis of the supernatant for 24 h against distilled water. The residue of defatted flour was treated with 70 % ethanol to discard prolamins. Then glutelins (Glu) were extracted following the method reported by Barba de la Rosa (2010), using 0.1M Tris buffer at pH 8.0, in a residue/buffer ratio 1:10. Protein content was assessed by the Kjeldahl method (AOAC, 2010). Protein extracts were lyophilized and stored at 5°C until alcalase hydrolysis.

Alcalase hydrolysis of proteins was carried out following the method reported by Tovar-Pérez et al. (2009) with some modifications: 0.5 M phosphate buffer (pH 7.4) was added to a 5 mg/mL of protein solution. The solution was incubated for 5 min at 50°C; then 2.4 UA/mL of alcalase solution in 0.5 M phosphate buffer was added to each test tube to reach a final ratio E/S=0.8 UA/g protein. The reaction, at the appropriate time between 1 to 48h, was placed in a boiling water bath for 10 min to inactivate the enzyme. Alb1, Glo and Glu hydrolyzates (Alb1H, GloH and GluH, respectively) were obtained at different times ( $n \leq 48$ h) of treatment (Alb1Hn; GlobHn and GluHn, respectively).

### Measurement of degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) was conducted according to the method reported by Condés et al. (2009). Free amino groups, released by alcalase hydrolysis, were assessed by their reaction with 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). L-leucine was used as a standard. The DH was calculated using the equation reported by the same authors.

### Size-exclusion chromatography

Molecular weight characterization of amaranth grain storage protein hydrolyzates was carried out by gel filtration chromatography using a molecular exclusion column. A Sephadex G-15 column (1.4 x 29 cm; Pharmacia, Uppsala, Sweden) and a Pharmacia LKB FPLC System (Uppsala, Sweden) were used. 500  $\mu$ L of hydrolyzed proteins (15 mg/mL) dissolved in 32.5 mM  $K_2HPO_4$ -2.6 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.5, which contained 0.4 M NaCl and 20 mM 2-mercaptoethanol (to reduce disulfide bonds of small peptides in order to avoid peptide aggregation) were injected and eluted with the same buffer at 0.3 mL/min. Absorbance at 214 nm was monitored and 0.5 mL fractions were collected. An ultra-low range molecular weight marker (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), containing triose phosphate isomerase 26.6 kDa; mioglobin 17 kDa;  $\alpha$ -lactalbumin 14.2 kDa; aprotinin 6.5 kDa; insulin 3.5 kDa; bradykinin 1.06 kDa, was used. Peptidic fractions (Alb1: A.I, -II and -III; Glo: G.I, -II, -III and -IV, and Glu: Glu.I, -II and -III) were collected until it was possible to obtain a sufficient amount to assess the  $IC_{50}$  value (see below). The collected peptide fractions were lyophilized and stored at -20 °C until analysis.

### Determination of DPP-IV inhibitory activity

DPP-IV from porcine kidney (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) was used to assess the enzymatic activity. The activity was performed by measuring the increase in absorbance at 405 nm using Gly-Pro-p-nitroanilide (Gly-Pro-pNA; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) as DPP-IV substrate. For this purpose an ELx808 absorbance microplate reader (Bio Tek  $\mu$  QUANT; Bio Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) for 96 well ELISA plates was utilized. The lyophilized hydrolyzates were dissolved in 100 mM Tris buffer (pH 8.0; buffer A) at various concentrations. The hydrolyzate solution (25  $\mu$ L) was added with 25  $\mu$ L of 1.59 mM Gly-Pro-pNA, in 100 mM Tris buffer, pH 8.0 (0.1 mM final concentration). The mixture was incubated at 37°C for 20 min, followed by adding 50  $\mu$ L of DPP-IV, diluted with the same Tris buffer to 4.0 mU/mL (Kojima et al., 1980). The reaction mixture was incubated at 37°C for up to 60 min, and the reaction was stopped every 15 min by adding 100  $\mu$ L of 1 M sodium

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

acetate buffer (pH 4.0). Recorded data were plotted versus time, and the DPP-IV activity was quantified. The % DPP-IV inhibition was defined as the percentage of DPP-IV activity inhibited by a given concentration of hydrolyzate.

One enzymatic unit was defined as the quantity of enzyme which releases 1  $\mu$ mol of *p*-nitroaniline per min under the assay conditions. The kinetic parameters were evaluated using 0.05 – 2 mM Gly-Pro-pNA in the assay mixture. Km of Gly-Pro-pNA was estimated as  $0.25 \pm 0.01$  mM. The IC<sub>50</sub> value was considered as the concentration of sample needed to inhibit DPP-IV by 50%. IC<sub>50</sub> values were determined plotting the DPP-IV inhibition rate as a function of the log of hydrolyzate concentration (mg/mL). The peptide Diprotin A and the antidiabetic drug Sitagliptin (STG), which inhibit DPP-IV activity, were used as controls in order to compare the protein hydrolyzates IC<sub>50</sub> values.

#### Induction of diabetes and animal treatments

Male mice strain CD1 of 4-6 weeks old (Charles River) with 35-40 g body weight were supplied by Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa (UAM-I). The animals were housed in polypropylene cages containing sterile sawdust as bedding. The animals were maintained under a controlled temperature ( $23 \pm 2$  °C), humidity (40-70%) and a 12 h light-dark cycle. Mice were fed on a diet of commercial mouse chow (Harlan® Rodent diet); water and food were provided *ad libitum*. The animals were randomly divided into 5 groups ( $n = 5$ ): diabetic mice (vehicle; citrate buffer only) as negative control; STG as positive control; Alb1H48, GloH48 and GluH24, which were chosen because of their higher DPP-IV inhibitory activity. The handling of the laboratory animals was performed in agreement with the statutes of the CICUAL (Institutional Committee for the Care and Use of the Animals) based in the international and national rules established in the "Official Mexican Rule" for the care and use of the laboratory animals" [NOM-062-ZOO-1999]. Moderate diabetes was induced by two intraperitoneal injections of streptozotocin (40 mg/kg body weight) freshly dissolved in a citrate buffer (100 mM, pH 4.5), in non-fasted mice on two consecutive days. This method induced partial destruction of  $\beta$ -cells pancreatic (Ventura-Sobrevilla et al., 2011). Control mice were injected with the vehicle. Blood glucose concentration was determined using an Accu-Chek® system (Roche). Mice were considered to be diabetic when non-fasted blood glucose level was  $\geq 200$  mg/dL. Two protocols were used for administration of amaranth protein hydrolyzates: a single administration study (SAS) of protein hydrolyzates or STG, or four-week chronic daily dosing study (FWCDDS) of protein hydrolyzates or STG.

For the SAS, blood glucose concentration was assessed at the beginning of this study for all groups of diabetic mice. Afterwards, Alb1H48, GloH48 or GluH24 (300 mg/kg) or vehicle or STG (580 mg/kg) for the positive control group was orally administered. After their administration, blood glucose was further assessed after 30 min in order to observe any effect. Oral glucose tolerance test (OGTT) was performed by oral administration of glucose (2 g/kg). Blood glucose level was assessed at 0.5, 1, 1.5 and 2 h in order to obtain a curve of glucose tolerance. Blood insulin and glucagon (0.5 mL of blood collected from caudal vein) were also measured, after 10 min of the glucose load, using an ELISA ALPCO™ kit (80-INSMS-E01 and E10 48-GLUHU-E01, respectively). In the FWCDDS, mice were orally administered once a day with the same hydrolyzates as in the SAS (300 mg/kg) or STG (580 mg/kg) or vehicle, everyday for four weeks. Once the hydrolyzate administration to mice was over, the blood glucose level as well as blood insulin and glucagon were measured, similarly to the SAS.

#### Statistical analysis

One-way ANOVA was used to determine treatment effects and these were subsequently compared among groups with Tukey's range test. Values were reported as mean  $\pm$  SD, and were considered to be significant at  $p < 0.05$ . Stargraphics Plus v. 5.1 (Statistical Graphics, Manugistics, MD, USA) was used for this purpose.

## Results and Discussion

### Degree of hydrolysis

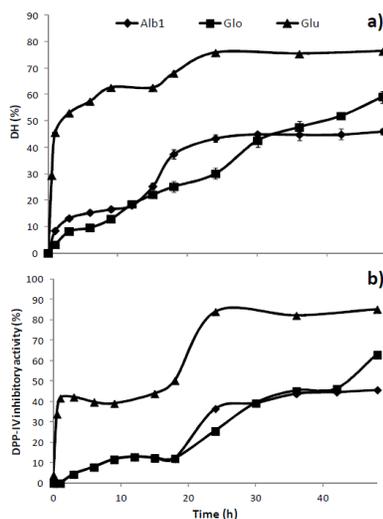
Fig. 1a shows hydrolysis of Alb1, Glo and Glu fractions. Alb1 and Glo were more resistant to alcalase hydrolysis than Glu. Alb1 and Glu fractions reached their highest DH at 24 h ( $43 \pm 0.51\%$  and  $75 \pm 0.51\%$ , respectively), but the Glo fraction had its highest DH from 48 h ( $59 \pm 0.29\%$ ). Glu fraction was less resistant to alcalase hydrolysis from the first hour of treatment. Alb1 and Glo fractions showed a similar behavior to alcalase hydrolysis during the 14 h of treatment. Although Alb1 fraction had its maximum DH 24 h earlier than the Glo one, Alb1 hydrolysis was 16% lower than that reached by the Glo fraction. In our laboratory we have observed that hydrolysis of amaranth proteins with alcalase takes a long time in order to reach an extensive hydrolysis (DH% $>$ 20). Glo has been usually more resistant to alcalase hydrolysis. Unlike the previously reported studies, we have found that hydrolysis resistance of proteins with alcalase is surpassed in rather long periods ( $\geq 24$  h). A longer protein hydrolysis yields smaller peptides whose enzymatic inhibitory properties should be studied, such as DPP-IV. High molecular mass (Mr) proteins were hydrolyzed during the first hour of digestion, but peptides of around 22 kDa from Glo and Glu did not change during 48 h of hydrolysis. Barba de la Rosa et al. (2010) stated that Glu hydrolysis with trypsin did not change after 4 h treatment. Limited protein hydrolysis had already been observed by Orsini et al. (2011) and Ventureira et al. (2012), who hydrolyzed an amaranth protein isolate using alcalase for 20 min (DH%=1.7) and 4 h (DH%= 9.5) and could only achieve a very low partial hydrolysis. Additionally, it has also been reported that globulin-P is associated with protein-bodies that do not allow easy access to hydrolytic enzymes. Konishi et al. (1991) observed that Glo is nowhere as prone to proteolysis as Alb because the former can be found inside protein bodies and this slows down proteolysis during the first 12 h. Condés et al. (2009) found that a polypeptide of 45 kDa from 7S globulin was more resistant to the trypsin action (serine protease) and Vecchi and Añón (2009) reported a great resistance to alcalase hydrolysis of hydrophobic B polypeptides of 11S globulin.

### Inhibitory activity of DPP-IV by protein hydrolyzates and their peptide fractions

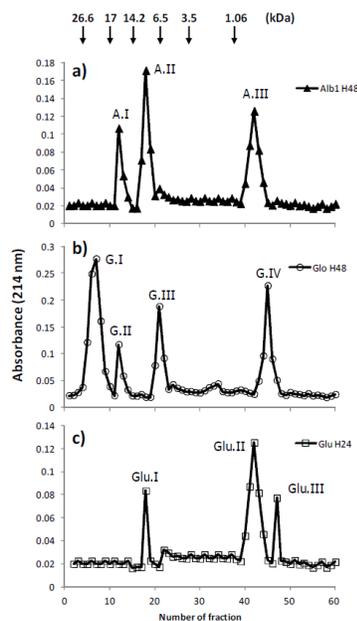
We have found out that the higher the DH in Alb1 and Glo, the more peptides released with inhibitory activity of DPP-IV (Fig. 1b). The highest DPP-IV inhibition by Alb1 and Glo hydrolyzates was observed at 48 h ( $45 \pm 0.2\%$  and  $63 \pm 0.5\%$ , respectively) and 24 h for Glu ( $85 \pm 0.2\%$ ). It was observed that the Glu hydrolysis released peptides that strongly inhibited DPP-IV activity as early as the first hour of treatment (Fig 1b). Velarde-Salcedo et al. (2013) identified several inhibiting DPP-IV peptides from amaranth hydrolyzates by an *in silico* trypsin digestion analysis, and predicted their binding modes at the molecular level. By LC-ESI/MS/MS and bioinformatics analysis, they identified the amino acid sequences PPP,

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

GP, PP, MP, VA, MA, KA, LA, FA, AP, FP, PA, LP, VP, LL, VV, IPA, IPI that displayed an inhibition of DPP-IV activity. Of those peptides, the sequence IPI was identified by these authors as Diprotin A. This is known as an inhibitor of DPP-IV [31-33] (Lacroix and Lee-Chan, 2012b; Rahfeld et al., 1991; Umezawa et al., 1984), and functions as a non-covalent inhibitor that temporarily binds to the catalytic site of the DPP-IV and blocks the degradation of larger polypeptidic chains such as incretins (Wiedeman and Trevillayn, 2003). These di-, tri-, oligopeptides may explain the inhibition of the enzyme during the initial period of hydrolysis.



**Figure 1:** (a) Hydrolysis degree of Albumin 1 (Alb1), Globulin (Glo) and Glutelin (Glu), and (b) Inhibitory activity of DPP-IV by Alb1, Glo and Glu hydrolyzates as a function of reaction time.



**Figure 2:** Size-exclusion chromatography elution profile of their respective peptide fractions of Alb1H48, GloH48 and GluH24.

Of the hydrolyzates obtained in this work, Alb1H48, GloH48 and GluH24 showed the maximum DPP-IV inhibitory activity and were partially characterized by size-exclusion chromatography (Sephadex G-15). Alb1H48 consisted of three fractions (Fig. 2a) that were named: A.I ( $M_r=17$  kDa); A.II ( $M_r=8.1$  kDa) and A.III ( $M_r=0.9$  kDa). A.I fraction, still made up of proteins, did not show any DPP-IV inhibitory activity. A.II and A.III fractions did show peptides with DPP-IV inhibitory activity.  $IC_{50}$  values were:  $8.34 \pm 0.09$  and  $1.98 \pm 0.09$  mg/mL, respectively (Table 1). A.III fraction consisted of peptides with about 7-8 amino acids, which is in agreement with Huang et al. (2012) as well as Lacroix and Li-Chan (2012a) and

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

Velarde-Salcedo et al. (2013) findings. All of them claimed that di-, tri-peptides and oligopeptides are capable of inhibiting DPP-IV. Peptides larger than 13 residues have also been reported as novel DPP-IV inhibitors (Uchida et al., 2011). GloH48 was made up of four different fractions (Fig. 2b), named: G.I (Mr=24 kDa); G.II (Mr=14.9 kDa), G.III (Mr=6.3 kDa) and G.IV (Mr=0.65 kDa). Similarly, G.I and G.II contained mainly low Mr proteins and did not show any DPP-IV inhibitory activity. Furthermore, G.III and G.IV fractions showed inhibitory activity of the enzyme; IC<sub>50</sub> values were 5.6 ± 0.1 and 0.25 ± 0.04 mg/mL, respectively (Table 1). G. IV fraction may have between 5-6 amino acid residues more likely to inhibit DPP-IV. It was observed that Glu consisted of three fractions (Fig. 2c): Glu.I (Mr=11.2 kDa); Glu.II (Mr=0.73 kDa) and Glu.III (Mr=0.45 kDa). In turn, Glu.I, which contained low Mr proteins, did not show any DPP-IV inhibitory activity. On the other hand, Glu.II and Glu.III fractions displayed the following IC<sub>50</sub> values: 1.95 ± 0.09 and 0.12 ± 0.09 mg/mL, respectively (Table 1). This finding showed that Glu.III fraction with peptides from 3-4 amino acids had a higher DPP-IV inhibitory activity. Hatanaka reported the occurrence of DPP-IV inhibitors (IC<sub>50</sub> = 2.3 ± 0.1 mg/mL) as obtained from rice bran hydrolyzate (Hatanaka et al., 2012). This figure, when compared to the G.III fraction (Table 1), is 20 times as much as the one yielded by rice bran hydrolyzate. Lacroix and Lee-chan (2012a) were also able to obtain hydrolyzates from whey (IC<sub>50</sub> of 75 µg/mL) using Thermolysin. In their work, the

**Table 1:** IC<sub>50</sub> values of peptide fractions obtained by size exclusion chromatography from Alb1H48, GlobH48 and GluH24 which displayed the highest inhibition of DPP-IV.

Peptide fraction	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg/mL)
<b>Alb1H48</b>	ND <sup>b</sup>
A.I	ND
A.II	8.34 ± 0.09 <sup>c</sup>
A.III	1.98 ± 0.01
<b>GlobH48</b>	ND
G.I	ND
G.II	ND
G.III	5.6 ± 0.1
G.IV	0.25 ± 0.04
<b>GluH24</b>	ND
Glu.I	ND
Glu.II	1.95 ± 0.08
Glu.III	0.12 ± 0.006
<b>Diprotin A</b>	8.43 ± 0.29 µg/ml
<b>Sitagliptin</b>	9.41 ± 0.15 ng/ml

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> was assessed by linear regression analysis of % inhibition of DPP-IV against Log of peptide concentration (mg/mL).

<sup>b</sup> Not detected under the assay conditions.

<sup>c</sup> Data represent mean values ± the SD of triplicate determinations.

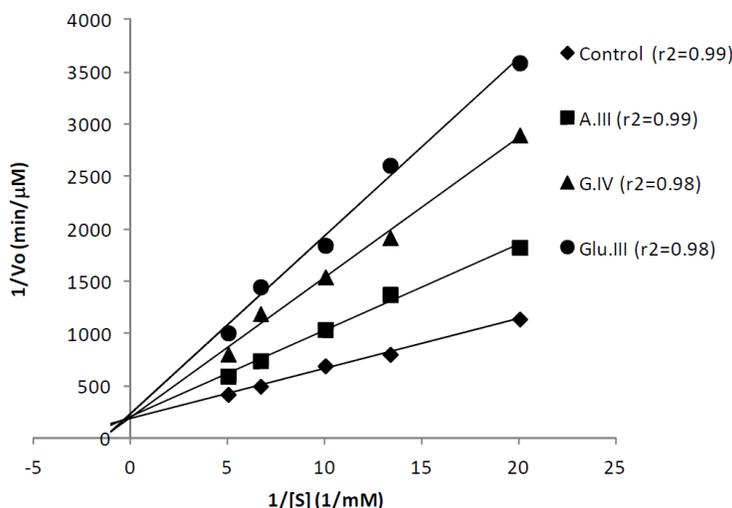
authors stated that cow milk proteins, especially β-casein, α-S1-casein, κ-casein, β-lactoglobulin and lactotransferrin, have amino acid sequences that can inhibit DPP-IV. This whey hydrolyzate inhibits DPP-IV activity much more efficiently than that yielded by Alb1H48, GloH48 and GluH24 of amaranth grain. In our work, Glu.II fraction displayed an IC<sub>50</sub> value that ranges from 1.2 to 2.0 mg/mL, as reported by other authors (Lacroix and Lee-Chan, 2012a). In sum, we observed that peptides smaller than 10 kDa as obtained of Alb1H48, GloH48 and GluH24 could inhibit the enzyme following a dose-response pattern. Particularly, Glu.III showed the highest DPP-IV inhibitory activity, which is higher than that reported by Velarde-Salcedo et al. (2013) for amaranth protein hydrolyzates. Table 1 shows that the inhibitory activity of hydrolyzates obtained is an order of magnitude weaker than the corresponding values for tri-peptide Diprotin A (IC<sub>50</sub>=8.43 ± 0.29 µg/mL) and two orders of magnitude for STG (IC<sub>50</sub>=9.41 ± 0.15 ng/mL). However, we should bear in mind that we worked with semi-purified hydrolyzates and that DPP-IV inhibitory activity could improve if peptide purity were enhanced.

#### Inhibition kinetics of DPP-IV by peptide fractions.

Inhibition kinetics parameters of DPP-IV were assessed through a Michaelis-Menten equation and the double reciprocal plot method by Lineweaver-Burk. By doing so, the enzymatic inhibition of fractions with the highest DPP-IV inhibitory activity was assessed *in vitro*, namely, those fractions with the lowest IC<sub>50</sub> value as obtained of A.III, G.IV and Glu.III. All these hydrolyzates showed a competitive inhibition mode (Fig. 3). Table 2 shows the kinetic parameters of different fractions of protein hydrolyzates with potential inhibitory activity against DPP-IV. Since this is a competitive inhibition mode, V<sub>max</sub> value is roughly the same (about 0.0047 µM/min) when a zero order kinetics is reached. In other words, the concentration of the assayed hydrolyzate remains constant whereas the substrate concentration increases in order to promote the interaction with the catalytic site. According to Yan et al. (1992), the general chemical structure of most peptides with DPP-IV inhibitory activity of competitive mode corresponds to the following parameters: Xaa-Pro, Pro-Xaa and Xaa-Ala. Different inhibition modes, however, have been reported, including non-competitive, mixed and irreversible, which indicate that the enzyme inhibition can occur in the enzyme active site or out of it. Molecular docking simulations of amaranth Glo inhibitory action have shown that DPP-IV active structure exists as a dimer with two domains forming an eight-bladed

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

propeller domain with a 30-45 Å cavity between each monomer where the inhibitors bind to the catalytic site (Wiedeman, 2007). The interaction between DPP-IV and amaranth Glo peptides is mainly via hydrophobic interactions and hydrogen bonds (Velarde-Salcedo et al., 2013).



**Figure 3:** Lineweaver-Burk plot of the effect of amaranth peptide fractions on the rate of Gly-Pro-pNA digestion by DPP-IV. (a) A.III, (b) G.IV and (c) Glu.III were obtained by size exclusion chromatography from Alb1H48, GloH48 and GluH24, respectively. Sitagliptin was used as a control.

It is difficult to compare the inhibition kinetic parameters of DPP-IV as obtained of several proteins because there is no standardized way to express these kinetic values. Sometimes different DPP-IV inhibitory activity values have been reported for the same di-peptide, which may be ascribed not only to different experimental conditions, but also to the substrate and enzyme source used for assessing DPP-IV inhibitory activity (Lacroix and Lee-Chan, 2012a).

**Table 2:** Kinetic parameters of the effect of amaranth peptides fractions on the rate of Gly-Pro-pNA digestion by DPP-IV.

Kinetic parameter	Control	A.III	G.IV	Glu.III	Sitagliptin <sup>a</sup>
Km or Km' (mM)	0.25	0.41	0.66	0.75	1.22
V <sub>max</sub> or V <sub>max</sub> ' (μmol/min)	0.0052	0.0049	0.0049	0.0043	0.0045
CE <sup>b</sup> (x10 <sup>-6</sup> )	20.8	11.9	7.39	5.76	3.67
K <sub>i</sub> (mg/mL)		5.61	0.21	0.11	2.86 x 10 <sup>-6c</sup>

<sup>a</sup> Data were experimentally obtained under the same assay conditions.

<sup>b</sup> Catalytic efficiency (min<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> nM

Glu.III was the hydrolyzate fraction that afforded the highest DPP-IV inhibitory activity (K<sub>i</sub> 0.11 mg/mL), which was lower than that of STG (K<sub>i</sub> 2.86 x 10<sup>-6</sup> ng/mL). This explains the effectiveness of treatment with hypoglycemic synthetic drugs for T2D patients. However, when the enzyme is inhibited, there is a risk of presenting side effects, such as hypoglycemia, weight gain and gastrointestinal disorders. On the other hand, DPP-IV can also inactivate chemokines, neuropeptides and other peptidic hormones leading to a wide range of physiological effects such as angioedema, pancreatitis and ineffective disorders, not to mention its insulinotropic response (Mateucci and Giampietro, 2011). Natural compounds with DPP-IV inhibitory activity can be a complementary treatment because they increase the time of incretins with no risk of hypoglycemia, a common side effect of classic antidiabetic drugs (Nauck, 2011).

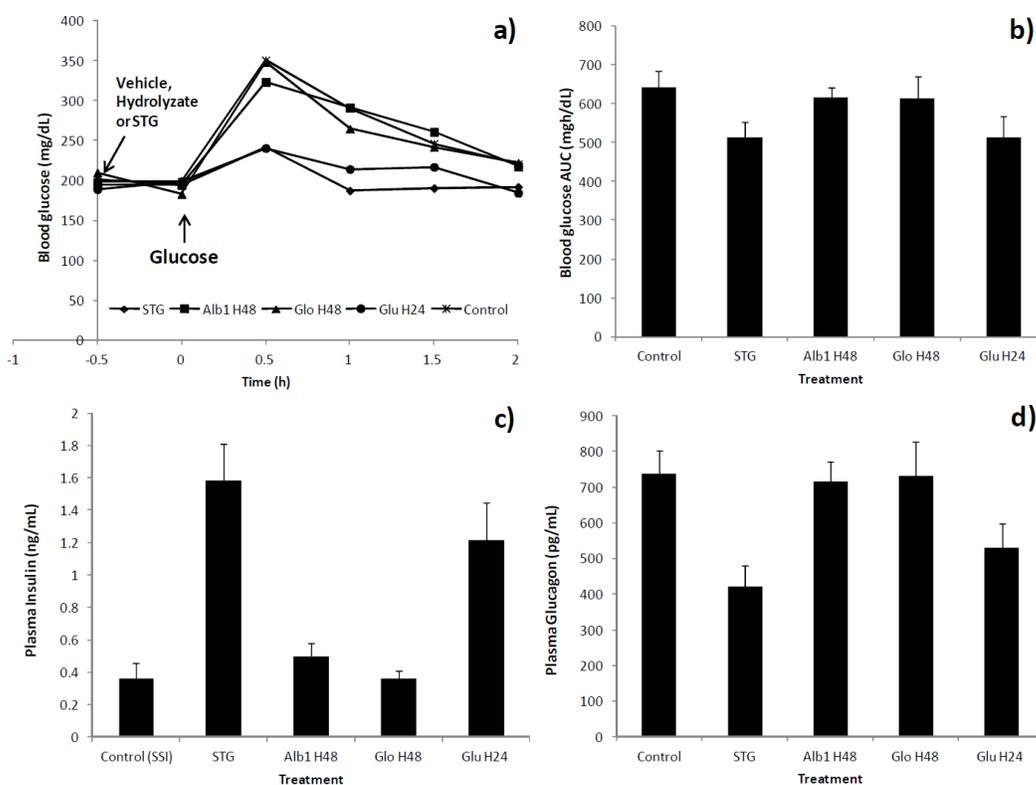
#### Effect of amaranth protein hydrolyzates in streptozotocin-induced diabetic mice Single-administration study

Alb1H48, GloH48 and GluH24 were administered to STZ-induced diabetic mice in an OGTT. A 300 mg/kg dose of GluH24 could inhibit DPP-IV activity because it managed to reduce plasma glucose level in the hyperglycemia of diabetic mice. This effect was similar to that observed in the control group STG (Fig. 4a). Additionally, the oral administration of 300 mg/kg of Alb1H48 and GloH48, which had shown DPP-IV inhibitory capacity *in vitro*, had no effect on the plasma glucose level in the biological assay. Fig. 4b shows the area under the OGTT curve; STG and GluH24 were clearly capable of reducing the plasma glucose level (p<0.05) in diabetic mice. Similarly, GluH24 oral administration not only increased plasma insulin level (p<0.05; Fig. 4c), but also diminished plasma glucagon level (p<0.05; Fig. 4d). Plasma insulin and glucagon levels are directly linked to GLP1; this behavior was also similar to the one afforded by STG, which is a strong DPP-IV inhibitor.

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

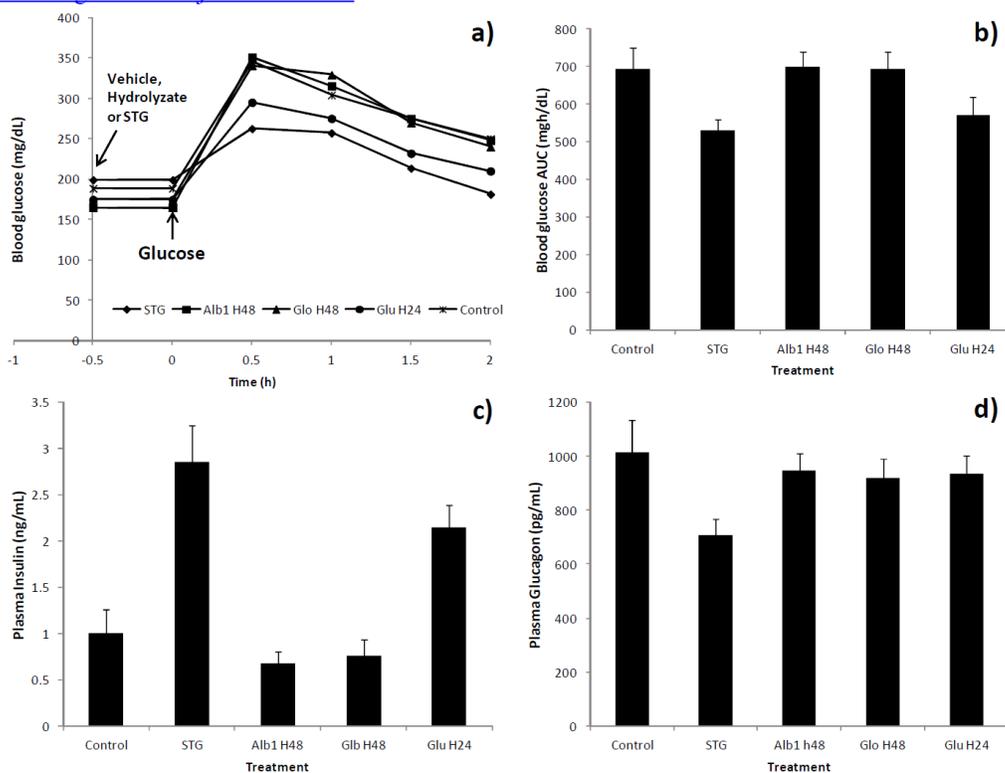
#### Four-week chronic daily dosing study

On assessing Alb1H48, GloH48 and GluH24 (300 mg/kg) administration in a chronic daily dosing study, it was observed that daily Alb1H48 and GloH48 intake did not produce any effect on plasma glucose levels in STZ-induced diabetic mice. In the same way as SAS, it was only GluH24 that reduced plasma glucose levels in STZ-induced diabetic mice ( $p < 0.05$ ; Figs 5a and 5b). Plasma insulin levels were twice as high (2.25 mg/mL) when compared to the one observed in SAS (1.25 mg/mL). However, plasma glucagon levels, unlike SAS, did not diminish in FWCDSS; on the contrary, they rose (548 to 983 pg/mL, respectively). There was no significant difference ( $p < 0.05$ ) with the STZ-induced diabetic mice control group. By looking at this result, it seems that DPP-IV chronic inhibition by GluH24 peptides triggered a plasma glucose level reduction because plasma insulin increased. Simultaneously, GluH24 induced not only plasma insulin secretion, but also plasma glucagon secretion. Therefore, we have hypothesized that in order to compensate plasma glucose level reduction, glucagon is released. This research, in the same way as in Velarde-Salcedo's et al. (2013), found that hydrolyzates, as obtained of all amaranth protein fractions, have *in vitro* DPP-IV inhibitory activity. Those authors reported that peptides released from amaranth Glu, using simulated gastrointestinal digestion, conserved the *in vitro* DPP-IV inhibitory activity. Furthermore, we found out that the GluH24 showed the highest inhibitory capacity so far recorded against DPP-IV in STZ-induced diabetic mice as a model system of diabetes. This is the first effort to assess the effect of amaranth protein hydrolyzates on the DPP-IV inhibitory activity using STZ-induced diabetic mice. It is clear, however, that further studies on this topic must be performed in order to shed light on this issue.



**Figure 4:** Single administration study to assess the effect of Alb1H48, GloH48 and GluH24 in plasma glucose, plasma insulin and glucagon levels during the oral glucose tolerance test (OGTT) in diabetic mice. (a) Time course of changes in plasma glucose level and (b) the area under the plasma glucose concentration –time curve (AUC) during the OGTT. Plasma (c) insulin and (d) glucagon levels at minute 10 during the OGTT. The values represent the mean  $\pm$  SD for five animals in each group.  $p < 0.05$  vs control group.

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>



**Figure 5:** Four-week chronic daily dosing study to assess the effect of Alb1H48, GloH48 and GluH24 in plasma glucose, plasma insulin and glucagon levels during the OGTT in diabetic mice. (a) Time course of changes in plasma glucose level and (b) the AUC during the OGTT. Plasma (c) insulin and (d) glucagon levels at minute 10 during the OGTT. The values represent the mean  $\pm$  SD for five animals in each group.  $p < 0.05$  vs control group.

## Conclusions

Hydrolysis with alcalase of Alb1 and Glo as obtained from amaranth grain is limited during the first hours of treatment because it is hindered by peptides displaying Mr similar to ATSI. This does not occur in Glu, which allows a faster hydrolysis. Glu releases peptides capable of inhibiting DPP-IV from the first hour of treatment whereas Alb1 and Glo inhibit this enzyme more slowly during the same period. When peptides of about 7.9 kDa disappear, DPP-IV inhibitory activity increases. To the best of our knowledge, this is the first report on the effect of amaranth protein hydrolyzates capable of inhibiting DPP-IV in STZ-induced diabetic mice as a model system of diabetes. The fractions A.III, G.IV and Glu.III isolated from amaranth grain protein hydrolyzates afforded the lowest  $IC_{50}$  values for each hydrolyzate and competitively inhibited DPP-IV *in vitro*. Of all the amaranth protein hydrolyzates assessed, GluH24 showed the highest DPP-IV inhibitory activity reported up to now for an *in vitro* assay as well as for a STZ-induced diabetic mice model system. The assessment of the oral administration of GluH24 (300 mg/kg body weight), using one SAS or the same concentration during FWCDDDS, caused a significant improvement in the oral glucose tolerance test. GluH24 significantly increased plasma insulin in SAS and FWCDDDS in the same way as it was observed for the mice group that was administered STG ( $p < 0.05$ ). However, GluH24 diminished plasma glucagon level in the SAS whereas in the FWCDDDS, PGL increased. Diabetes is a very complex disease; hence for a fuller understanding of this condition, further studies on the effect of amaranth protein storage hydrolyzates obtained with other enzymes, other hydrolyzates doses, other periods of treatment, among others, are needed in order to find out their impact on biological model systems.

## Acknowledgements

This research was supported by Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI) with the project PINV11-13, contract ICYTDF/295/2011. The authors also thank Prof. Abraham Avendaño-Martínez for translating and reviewing the manuscript.

## References

1. AOAC (2000). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists.

<http://dx.doi.org/10.4314/ajtcam.v12i1.13>

2. A.P. Barba de la Rosa, A. Barba Montoya, Pedro Martínez-Cuevas, B. Hernández-Ledesma, M.F. León-Galván, A. De León-Rodríguez, C. González (2010). Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide*. 23: 106 – 111.
3. Bjelke, J. D., Christensen, J., Nielsen, P. F., Branner et al. (2006). Dipeptidyl peptidases 8 and 9: Specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J*. 396: 391-399.
4. Caselato-Sousa, V. M. and Amaya-Farfán, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: A comprehensive review. *J Food Sci*. 77: R93-R104.
5. Condés, M. C., Scilingo, A. A. and Añón, M. C. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis: Structural and functional changes. *LWT - Food Sci Technol*. 42: 963– 70.
6. Drab, S. R. (2010). Incretin-based therapy for type-2 diabetes mellitus: current status and future prospects. *Pharmacotherapy*. 30: 609-624.
7. Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metabol*. 3:153-165.
8. Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. and Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chem*. 126: 878–884.
9. Tadashi Hatanaka, Yosikazu Inoue, Jiro Arima, Yuya Kumagai, Hirokazu Usuki, Kayoko Kawakami, Masayo Kimura, Takafumi Mukaihara (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem*. 134: 797–802.
10. Huang, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P. and Hsu, K. C. (2012). Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*. 35: 114–121.
11. Kim, H. K., Kim, M. J., Cho, H. Y., Kim E. K. and Shin, D. H. (2006). Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*. 24: 195-199.
12. Kojima, K., Ham, T. and Kato, T. (1980). Rapid chromatographic purification of dipeptidyl peptidase IV in human submaxillary gland. *J Chromatogr A*. 189: 233–240.
13. Konishi, Y., Horikawa, K., Oku, Y., Azumaya, J. and Nakatani, N. (1991). Extraction of two albumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and the putative localization in the grains. *J Agr Biol Chem*. 55: 1745-1750.
14. Korhonen, H. and Philanto, A., (2003). Food-derived bioactive peptides –opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Design*. 9: 1297-1308.
15. Lacroix, I. M. E. and Li-Chan, E. C. Y. (2012a). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *Int Dairy J*. 25: 97–102.
16. Lacroix, I. M. E. and Li-Chan, E. C. Y. (2012b). Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *J Funct Foods*. 4: 403-422.
17. Luna-Suárez, S., Medina-Goodoy, S., Cruz-Hernández, A. and Paredes-López, O. (2010). Modification of the amaranth 11S globulin storage protein to produce an inhibitory peptide of the angiotensin I converting enzyme, and its expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 148: 240 – 247.
18. Matteucci, E. and Giampietro, O. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition: Linking chemical properties to clinical safety. *Curr Med Chem*. 18: 4753-4760.
19. Nauck, M. A. (2011). Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: Properties, functions, and clinical implications. *Am J Med*. 124: 53-518.
20. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones y técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
21. Orsini, D.M.C., Tironi, V. A. and Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT – Food Sci Technol*. 44: 1752–1760.
22. Rahfeld, J., Schierhorn, M., Hartrodt, B., Neubert, K. and Heims, J. (1991). Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Biochim Biophys Acta*. 1076: 314-316.
23. Rastogi, A. and Shukla, S. (2013). Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values. *Crit Rev Food Sci*. 53: 109-125.
24. Richter, B., Bänderia-Echtler, E., Bergerhoff, K. and Lerch, C. (2008). Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*. 4: 753-768.
25. Silva-Sánchez, C., Barba de la Rosa, A. P., León -Galván, M. F., De Lumen, B. O., De León-Rodríguez, A. and González de Mejía, E. (2008). Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J Agr Food Chem*. 56: 1233-1240.
26. Tiengo, A. M. and Netto, E. M. (2009). Characterization and ACE-inhibitory activity of amaranth proteins. *J Food Sci*. 74: H121-H126.
27. Tironi, V. A. and Añón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Res Int*. 43: 315 – 322.
28. Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A. and Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chem*. 116: 437–444.
29. Uchida, M., Ohshiba, Y. and Mogami, O. (2011). Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from  $\beta$ -lactoglobulin. *J Pharmacol Sci*. 117: 63-66.
30. Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Naganawa, H., Hamada, M., and Takeuchi, T. (1984). Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J Antibiot*. 37: 422-425.
31. Vecchi, B. and Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*. 70: 864 – 870.
32. Aida J. Velarde-Salcedo, Alberto Barrera-Pacheco, Samuel Lara-González, Gabriela M. Montero-Morán, Agustín Díaz-Gois, Elvira González de Mejía, Ana P. Barba de la Rosa. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem*. 136: 758–764.
33. Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Campos-Septúlveda E, Alarcón-Aguilar F. (2011). Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *P W Pharmacol Soc*. 54: 5-9.
34. Ventureira, J. L., Bolontrade, A. J., Speroni, F., David-Briand, E., Scilingo, A. A., Ropers, M. H., Boury, F., Añón, M. C. and Anton, M. (2012). Interfacial and emulsifying properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates under different conditions of pH. *LWT – Food Sci Technol*. 45: 1 – 7.
35. Wiedeman, P. E. (2007). DPP-IV inhibition: Promising therapy for the treatment of type 2 diabetes. *Progr Med Chem*. 45: 63-109.
36. Wiedeman, P. E. and Trevillayn, J. M. (2003). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment for impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs*. 4: 412-420.
37. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes estimates from the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 27: 1047-1053.
38. Yan, T. R., Ho, S. C. and Hou, C. L. (1992). Catalytic properties of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris nTR. *Biosci Biotechnol Biochem*. 56: 704–707.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00186

Matrícula: 210180236

OBTENCIÓN DE INHIBIDORES DE LA DIPEPTIDIL PEPTIDASA-IV DEL GRANO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Y SU EFECTO EN LA GLUCEMIA DE RATONES DIABÉTICOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:30 horas del día 25 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. RUBEN ROMAN RAMOS  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: RAUL REYES BAUTISTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Raul Reyes Bautista*  
RAUL REYES BAUTISTA  
ALUMNO

REVISÓ  
*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

*[Signature]*  
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

VOCAL

*[Signature]*  
DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO

VOCAL

*[Signature]*  
DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ