

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización de péptidos inhibidores de la
dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) encriptados en las
proteínas de las semillas de amaranto**

Tesis que presenta

Aída Jimena Velarde Salcedo

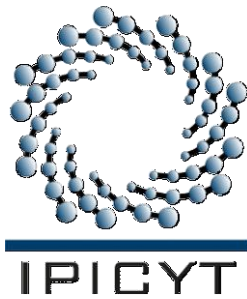
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., 17 de Julio de 2015



Constancia de aprobación de la tesis

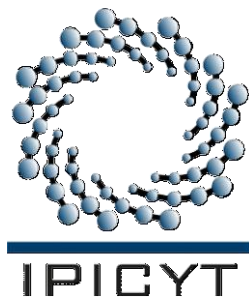
La tesis “**Caracterización de péptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) encriptados en las proteínas de las semillas de amaranto**” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Aída Jimena Velarde Salcedo** y aprobada el **22 de Junio de 2015** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

Dra. Elvira González de Mejía
(Miembro del Comité Tutorial)

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
(Miembro del Comité Tutorial)

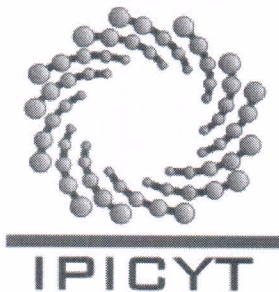
Dra. Ma del Carmen González Castillo
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 230948) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



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

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 079 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de julio del año 2015, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	Presidenta	IPICYT
Dra. Ma. del Carmen González Castillo	Secretaria	UASLP
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT
Dra. Elvira González de Mejía	Sinodal externo	UIUC

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

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Aída Jimena Velarde Salcedo

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de péptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) encriptados en las proteínas de las semillas de amaranto

que se desarrolló bajo la dirección de

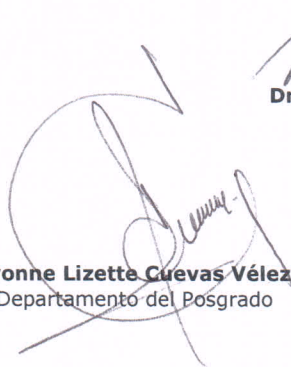
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

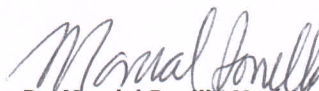
APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de julio de 2015.



Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Enrique, mi compañero, mi amigo. Tu ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo en los momentos más difíciles. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome en todo lo que podías. Gracias por los desvelos y tu paciencia.

A Fernando. Posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero cuando lo hagas, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Este proyecto lo comencé como mujer y lo terminé como madre. Eres la razón de que me levante cada día esforzándome por el presente y el mañana, eres mi principal motivación.

Me siento bendecida porque esta aventura haya sido con ustedes. Los amo. Vamos por más.

Agradecimientos

Dr. Hugo Sergio Aguilar Hernández por su apoyo y enseñanza en el trabajo con transcritos.

M.C. Alberto Barrera Pacheco por toda su orientación y paciencia dentro y fuera del laboratorio.

Q.F.B. Evelyn Regalado Rentería y Dra. Bertha Irene Juárez Flores por su apoyo y disposición en el trabajo con animales.

Dr. Samuel Lara González y Dra. Gabriela M. Montero Morán por su colaboración en el modelado bioinformático.

Dr. Antonio de León Rodríguez por permitirme trabajar en su laboratorio.

M.C. Abraham Escobedo Moratilla por su colaboración en el desarrollo del proyecto de innovación y emprendimiento.

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por permitirme trabajar en su laboratorio, por toda su asesoría, apoyo y por darme la libertad y confianza necesaria para desarrollar mi proyecto y crecer como persona

Mi comité tutorial por su asesoría y comentarios en este trabajo.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar este trabajo de doctorado.

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. por abrirme las puertas en su posgrado.

Este trabajo estuvo apoyado por la beca del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social 150873 y la beca CONACYT-MEXICO 56787 (Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología, LINAN), INFRA-2013-01 No. 204373.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexos	xi
Abreviaturas	xii
Resumen	xv
Abstract	xvi
1 Introducción	1
2 Objetivos	9
3 Materiales y métodos	10
3.1 Material vegetal	10
3.2 Liberación de los péptidos bioactivos	10
3.2.1 Extracción de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto	10
3.2.2 Digestión de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto con tripsina	11
3.2.3 Simulación de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	11
3.3 Ensayo de actividad de la DPPIV	12
3.4 Búsqueda <i>in silico</i> de péptidos con actividad biológica encriptados en las glutelinas de amaranto	12
3.5 Análisis tipo “docking” de la DPPIV con péptidos de las globulinas de amaranto	13
3.6 Purificación de los péptidos inhibidores de la DPPIV de las glutelinas de amaranto	13
3.7 Ensayos de actividad de DPPIV en cultivos celulares	14
3.7.1 Manejo de las líneas celulares	14
3.7.2 Ensayo de actividad de DPPIV	15
3.7.3 Ensayo de viabilidad celular	15
3.8 Suplementación de amaranto en animales de laboratorio	15
3.8.1 Manejo de animales de laboratorio	15
3.8.2 Preparación del alimento y dieta	15
3.8.3 Tratamientos e inducción de la diabetes	16
3.8.4 Parámetros bioquímicos en sangre	17
3.8.5 Extracción de proteínas membranales de riñón	17

3.8.6 Ensayo de actividad de DPPIV en riñón y en plasma	17
3.8.7 Expresión de DPPIV en riñón por RT-PCR	18
3.8.8 Electroforesis 2D de las proteínas de plasma	19
3.8.8.1 Preparación de la muestra	19
3.8.8.2 Electroforesis 2D de las proteínas abundantes	20
3.8.8.3 Electroforesis 2D de las proteínas poco abundantes	20
3.8.8.4 Análisis de imágenes	21
3.8.8.5 Digestión en gel y análisis de espectrometría de masas (LC-MS/MS)	21
3.8.8.6 Identificación de proteínas usando los sets de datos de MS/MS y búsqueda en las bases de datos	23
3.9 Análisis estadístico	23
4. Resultados	24
4.1 Digestión de las glutelinas de amaranto	24
4.2 Caracterización de la actividad inhibitoria sobre la DPPIV de los péptidos trípticos de amaranto	24
4.3 Simulación de la digestión gastrointestinal del amaranto y otras semillas	27
4.4 Caracterización <i>in silico</i> de los péptidos de amaranto con actividad inhibitoria de la DPPIV	29
4.5 Purificación de los péptidos inhibidores de la DPPIV de las glutelinas de amaranto	33
4.6 Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPPIV en líneas celulares	37
4.7 Cambios en parámetros bioquímicos en sangre de animales de laboratorio bajo una suplementación con amaranto	37
4.8 Cambios en la actividad y expresión de DPPIV en animales de laboratorio bajo una suplementación con amaranto	39
4.9 Análisis proteómico	45
5. Discusión	67
5.1 Efecto <i>in vitro</i> de los hidrolizados de amaranto sobre la actividad de la DPPIV	67
5.2 Comportamiento de la DPPIV en diferentes tipos celulares	69
5.3 Efecto del consumo de amaranto en la diabetes	70
5.4 El amaranto como un regulador negativo de actividad de peptidasas	71
5.5 El amaranto y el metabolismo de lípidos	73
6 Conclusión	76
7 Referencias	78
Anexos	93

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Sustratos naturales de la DPPIV	5
Tabla 2. Alimentos con péptidos inhibidores de la DPPIV	6
Tabla 3. Comparación del grano de amaranto con otros granos	7
Tabla 4. Péptidos bioactivos encriptados en las glutelinas de <i>A. hypochondriacus</i>	29
Tabla 5. “Docking” molecular de los sitios potenciales de unión a la DPPIV con los péptidos de las globulinas 11S de amaranto	32
Tabla 6. Perfil de lípidos de ratas normoglucémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto al final del experimento	42
Tabla 7. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS	48
Tabla 8. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS (Proteínas poco abundantes)	53
Tabla 9. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS (Proteínas abundantes)	56
Tabla 10. Composición de las dietas para animales de laboratorio	97

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo según entidad federativa	2
Figura 2. Efectos fisiológicos de las incretinas	3
Figura 3. Representación esquemática de las secreción y acción de las incretinas	4
Figura 4. Gel SDS-PAGE de las glutelinas de amaranto digeridas con tripsina	24
Figura 5. Efecto del diprotin A sobre la actividad de DPPIV	25
Figura 6. Actividad inhibitoria de los hidrolizados trópticos de las glutelinas de amaranto sobre la DPPIV	26
Figura 7. Actividad inhibitoria de hidrolizados de amaranto y otras semillas	28
Figura 8. Modelo estructural de la interacción entre la DPPIV y los péptidos de la globulina 11S de amaranto	33
Figura 9. Interacción detallada entre la enzima DPPIV y los péptidos de amaranto calculada con el servidor PDBsum	34
Figura 10. Separación cromatográfica de los péptidos trópticos de las glutelinas de amaranto	35
Figura 11. Purificación de los péptidos trópticos de las glutelinas de amaranto	36
Figura 12. Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPPIV en la línea celular Caki-1	38
Figura 13. Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPPIV en la línea celular HUVECC	38
Figura 14. Cambios en el peso y niveles de glucosa de ratas normoglucémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto	40
Figura 15. Cambios en el perfil de lípidos de ratas normoglucémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto	41
Figura 16. Cambios en la actividad de DPPIV en plasma de rata	43
Figura 17. Cambios en DPPIV en riñón	44
Figura 18. Electroforesis 2D de las proteínas de plasma de rata	46
Figura 19. Clasificación e interacciones de las proteínas acumuladas diferencialmente en plasma de rata	65

Anexos

	Página
1. Protocolos y fichas técnicas	95
2. Publicaciones generadas y premios	125

Abreviaturas

1D	1 dimensión
2D	2 dimensiones
Å	Amstrong(s)
A	Ampere(s)
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena
ANOVA	Analysis of variance, análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American type culture collection, colección americana de tipos de cultivos
BSA	Bovine serum albumin, albúmina de suero bovino
Cal	Caloria(s)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
cm	Centímetro(s)
Da	Dalton(s)
DA	Diabéticas amaranto
DC	Diabéticas control
DE	Desviación estándar
DEPC	Dietilpirocarbonato
dL	Decilitro(s)
DPPIV	Dipeptidil peptidasa IV
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Acido etildiaminotetraacético
ESI	Electrospray ionization, ionización por electrospray
FBS	Fetal bovine serum, suero fetal bovino
fmol	Femtomoles
FPLC	Fast performance liquid chromatography, cromatografía de líquidos de rápida resolución
g	Gramo(s)
GIP	Gastric inhibitory peptide, péptido gástrico inhibitorio
GLP	Glucagon-like peptide, péptido tipo glucagón
GRF	Growth-hormone releasing factor, factor liberador de la hormona del crecimiento
h	Hora(s)
HDL	High density lipoprotein, lipoproteína de alta densidad
HDL-c	High density lipoprotein cholesterol, colesterol de lipoproteínas de alta

	densidad
IC₅₀	Inhibitory concentration 50, concentración inhibitoria 50
IEF	Isoelectrofocusing, isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
IP	Interferon- γ -inducible protein, proteína inducible por interferón γ
IPG	Immobilized pH gradient, gradiente inmobilizado de pH
I-TAC	Interferon-inducible T-cell chemoattractant, quimioatrayente de células T inducible por interferón
kDa	Kilodalton(s)
L	Litro(s)
LC	Liquid chromatography, cromatografía de líquidos
M	Molar
MDC	Macrophage-derived chemokine, quimiocina derivada de macrófagos
mg	Miligramos
min	minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MS	Mass spectrometry, espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
N	Normal
NA	Normoglucémicas amaranto
NC	Normoglucémicas control
NCBI	National center for biotechnology information, centro nacional de información para la biotecnología
nm	Nanometros
No.	Número
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activated peptide, péptido pituitario activado por la adenilato ciclasa
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis, electroforésis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline, amortiguado salino de fosfatos
PCR	Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein database, base de datos de proteínas
PEP	Phosphoenol pyruvate, fosfoenol piruvato
pl	Punto isoeléctrico
PHM	Péptido histidina metionina
PM	Peso molecular
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor, receptor activado por el proliferador de peroxisomas
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto

RT-PCR	Reverse transcription of polymerase chain reaction, Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundo(s)
SDF	Stromal-derived factor, factor derivado del estroma
SDS	Sodium dodecil sulfato, dodecil sulfato de sodio
Serpin	Serine protease inhibitor, inhibidor de serine proteasas
TOF	Time of flight, tiempo de vuelo
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad(es)
ug	Microgramos
uL	Microlitro(s)
uM	Micromolar
V	Volt(s)
VIP	Vasoactive intestinal peptide, péptido intestinal vasoactivo
vs	Versus
x g	Fuerza centrífuga

Resumen

Caracterización de péptidos inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) encriptados en las proteínas de las semillas de amaranto

El incremento en el consumo de amaranto se debe a sus propiedades nutricionales y a la presencia de compuestos bioactivos que generan un beneficio a la salud. En trabajo previo se encontró que hidrolizados de la proteína de la semilla de amaranto tienen la capacidad de inhibir a la DPPIV, molécula blanco de nuevos fármacos hipoglucemiantes para el tratamiento de la diabetes; esto sugiere que el amaranto es un alimento funcional con propiedades antidiabéticas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y purificar los péptidos inhibidores de la DPPIV presentes en la semilla de amaranto; así como medir su funcionalidad empleando ensayos *in vitro*, líneas celulares y modelos *in vivo*. Aplicamos las herramientas de la proteómica para analizar los cambios en el perfil de proteínas de plasma de ratas normoglucémicas y diabéticas con una dieta control y una dieta suplementada con amaranto. Mediante un análisis bioinformático se predijo que algunos de los péptidos de hidrolizados de las globulinas de amaranto son capaces de unirse al sitio activo de la DPPIV y en la región de dimerización, inhibiendo por tanto su actividad. Además se lograron purificar dos fracciones con un alto potencial inhibitorio sobre la DPPIV de 300 y 900 Da. Encontramos que la actividad de la DPPIV varía de acuerdo al tipo celular y órgano en el que se analice, lo que muestra la multifuncionalidad de esta enzima. Por otro lado, en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina existe un incremento en la actividad de DPPIV en sangre y este efecto se reduce por el consumo crónico de amaranto. También se observó un efecto positivo en los niveles de HDL-c y colesterol total por el consumo de amaranto, el cual estuvo relacionado con cambios en la acumulación de apolipoproteína H, apolipoproteína A-II y la enzima antioxidante paraoxonasa/ariesterasa 1. Este trabajo muestra el potencial antidiabético del consumo de las proteínas del amaranto y el potencial benéfico para la salud.

Palabras clave: Amaranto, péptidos bioactivos, dipeptidil peptidasa IV, diabetes, proteómica.

Abstract

Characterization of dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) inhibitory peptides encrypted in amaranth seed proteins

Amaranth seed is cultivated due to its high nutritional value and the presence of bioactive compounds with several health benefits. In previous work it was reported that amaranth hydrolyzates have an inhibitory activity upon DPPIV, the target molecule of several hypoglycemic drugs for diabetes treatment. This suggests that amaranth is a functional food with antidiabetic properties. The aim of this work was to characterize and purify DPPIV inhibitory peptides encrypted in amaranth seeds *in vitro*, and to determine if amaranth consumption has a positive health effect in a model of diabetes *in vivo* using a proteomic approach. Bioinformatic analysis showed that peptides from amaranth globulins inhibit DPPIV activity by interaction with the active site and the dimerization site. Two fractions with high DPPIV inhibitory activity (300 and 900 Da) were purified from amaranth glutelins. DPPIV activity varies depending on the cellular type and organ analyzed, which shows the multifunctionality of the enzyme. Moreover, there is an increase in DPPIV activity in plasma in streptozotocin-induced diabetes, which is reverted by amaranth consumption. Amaranth also provides a positive effect in HDL-c and total cholesterol levels and this is related to changes in de accumulation of apolipoprotein H, apolipoprotein A-II and the antioxidant enzyme paraoxonase/arylesterase 1. This work shows the antidiabetic potential of amaranth seed proteins.

Keywords: Amaranth, bioactive peptides, dipeptidyl peptidase IV, diabetes, proteomics.

Introducción

1. Introducción

La diabetes tipo 2 es un desorden metabólico caracterizado por un estado crónico de hiperglucemia debido a varios defectos fundamentales como la resistencia a la insulina en el músculo y el hígado y un defecto en la secreción de esta hormona por las células β del páncreas [1, 2]. Se ha estimado que la esperanza de vida de los individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. Si no es atendida oportunamente puede ocasionar complicaciones graves a la salud como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de extremidades inferiores, neuropatías y muerte prematura [2-5].

En el mundo existen alrededor de 387 millones de personas que padecen diabetes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que se presentaron 1.5 millones de decesos en el 2012 a causa de la diabetes. Debido a su alta prevalencia en países industrializados, la prevención, tratamiento y control de la diabetes se ha convertido en una prioridad en los sistemas de salud a nivel mundial [6]. Aproximadamente entre 4 y 5% de los presupuestos de salud se gastan en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la diabetes. Se sabe que los gastos médicos de una persona con diabetes son de dos a cinco veces más altos que los de una persona sin esta enfermedad [7]. México ocupa el sexto lugar mundial en número de personas con diabetes. En el 2012, 6.4 millones de personas refirieron haber sido diagnosticadas con diabetes en nuestro país (**Figura 1**). Actualmente el sistema nacional de salud implementa medidas estratégicas para la prevención y control de la diabetes que involucraron costos alrededor de los 3,872 millones de dólares en el 2012 [6, 8].

Algunos de los factores de riesgo para la diabetes incluyen un estilo de vida sedentario, una dieta hipercalórica, la obesidad y la predisposición genética [4, 9-11]. Por lo tanto, el uso y desarrollo de fármacos hipoglucemiantes es una herramienta útil que beneficiará el bienestar y la vida del paciente diabético. En los últimos años se han desarrollado varios fármacos antidiabéticos que disminuyen los niveles de glucosa en sangre con un menor riesgo de presentar episodios de hipoglucemia. Estos nuevos compuestos promueven la eliminación de la glucosa

Introducción

en la orina (inhibidores del cotransportador de sodio y glucosa 2), actúan en la señalización del tejido adiposo (agonistas de PPAR, receptores adrenérgicos β 3) o estimulan la liberación de insulina y la proliferación de las células β del páncreas (incretinas) [12-16].

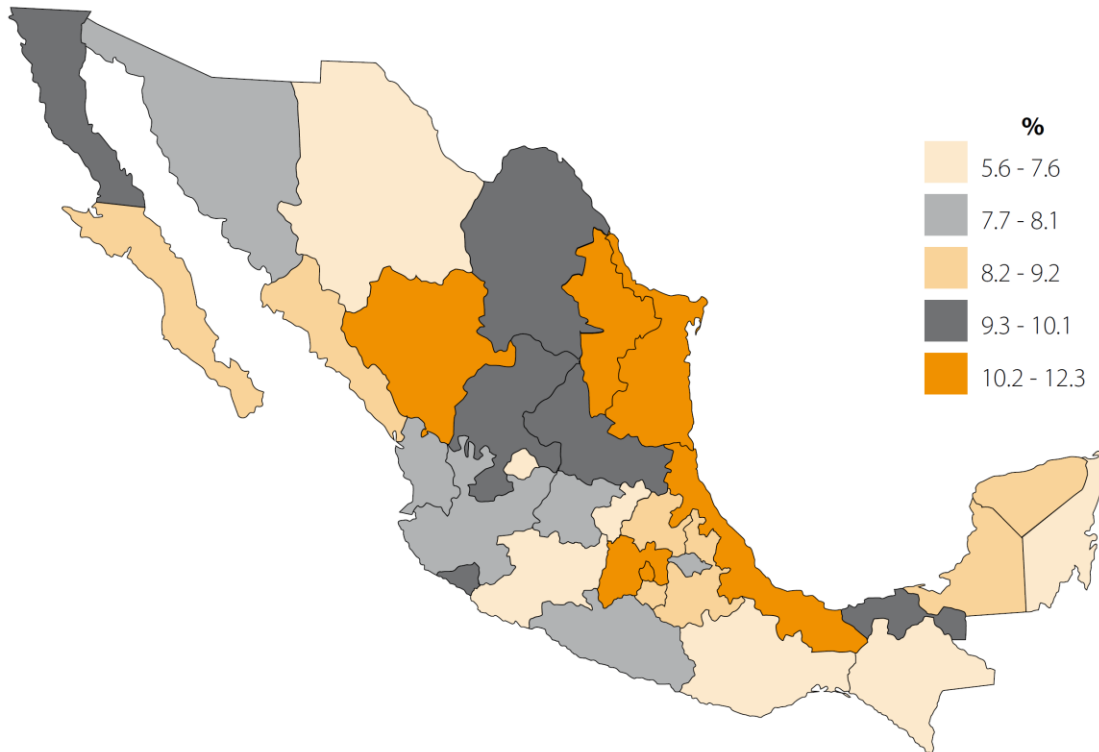


Figura 1. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo según entidad federativa. México, [8].

La terapia basada en las incretinas es utilizada actualmente para disminuir el estado hiperglucémico en el paciente diabético [11]. Las incretinas son hormonas peptídicas producidas por las células enteroendócrinas del intestino delgado y grueso y liberadas al torrente sanguíneo después de la ingesta de alimentos donde estimulan la secreción de insulina [17]. Las incretinas son responsables de más del 70% de la secreción de insulina postprandial, especialmente el péptido tipo glucagón 1 (GLP-1) [18-22]. En pacientes diabéticos el efecto incretina puede estar reducido en estados avanzados de la enfermedad, debido probablemente a la destrucción de los islotes pancreáticos [17]. La administración de las incretinas

Introducción

tiene una respuesta insulínica y proliferativa de las células β del páncreas en el paciente diabético; además no existe riesgo de hipoglucemia, un efecto adverso común de los fármacos antidiabéticos [17, 23]. Además de la respuesta positiva en las células pancreáticas, las incretinas también incrementan el riesgo sanguíneo y la contractilidad cardíaca, estimulan la saciedad, tienen efectos sobre el tejido adiposo, la proliferación de hueso, entre otros efectos (**Figura 2**) [12, 18, 24, 25].

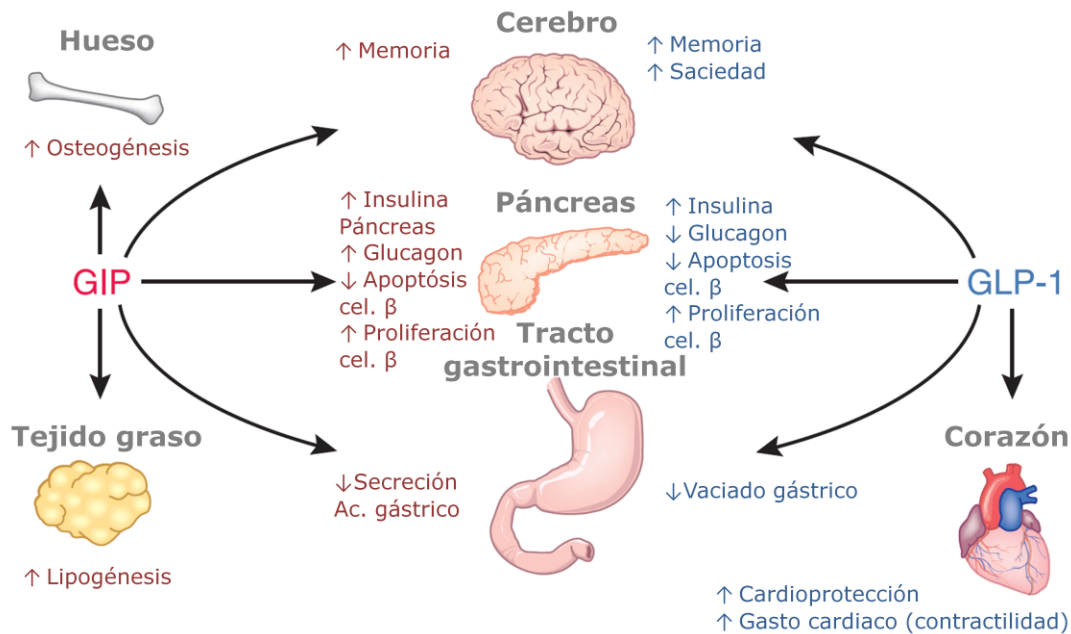


Figura 2. Efectos fisiológicos de las incretinas. GIP, Péptido gástrico inhibitorio (gastric inhibitory peptide,). GLP-1, Péptido tipo glucagon 1 (glucagon-like peptide 1).

Sin embargo, el tiempo de vida de las incretinas es muy corto (<2 min) debido al corte proteolítico y a la inactivación de estas hormonas por la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). Por lo tanto, el uso de inhibidores de la DPPIV incrementa el tiempo de acción de las incretinas (**Figura 3**) [23, 26-28]. Actualmente existen diferentes inhibidores sintéticos de la DPPIV aprobados por la Asociación de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos y por la Unión Europea que han mostrado efectos positivos en los pacientes diabéticos con pocos efectos adversos [21, 24, 29-34].

Introducción

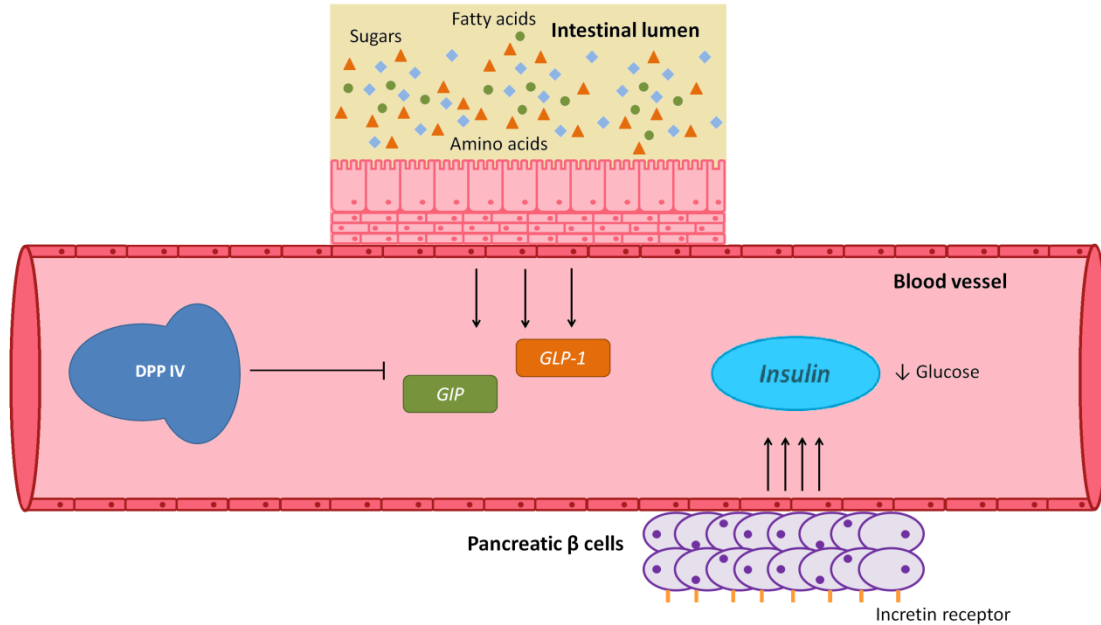


Figura 3. Representación esquemática de la secreción y acción de las incretinas. GIP y GLP-1 son secretadas después de la ingesta de alimentos y estimulan la secreción de insulina dependiente de glucosa. Las incretinas son inactivadas por la DPP-IV, [37].

La DPP-IV es una glicoproteína con actividad de serin-exoproteasa (EC. 3.4.14.5) que cataliza la liberación de un dipéptido en el extremo N-terminal de una cadena polipeptídica cuando el penúltimo residuo es una prolina, hidroxiprolina o alanina. Este corte generalmente resulta en la inactivación del efecto del sustrato. La DPP-IV se puede encontrar de forma soluble o unida a membrana y es activa como un homodímero. Se considera una enzima ubicua debido a que se expresa en endotelio y epitelio de diversos órganos (principalmente riñón y órganos exócrinos), así como en fluidos corporales como sangre, orina y líquido seminal [35, 36].

La DPP-IV regula la actividad de diversas moléculas señalizadoras como hormonas, quimiocinas, neuropéptidos y péptidos vasoactivos, por lo que su inhibición podría representar un amplio rango de efectos fisiológicos además de la respuesta insulínica (Tabla 1) [35, 38-41]. En general, los inhibidores de la DPP-IV han mostrado ser seguros, incluso se ha reportado un efecto

Introducción

cardioprotector. Algunos de los efectos adversos más comunes con este tipo de fármacos son el angioedema, pancreatitis y procesos infecciosos [29].

Tabla 1. Sustratos naturales de la DPPIV [39, 43]

Proteína	Función
Neuropéptidos	
Neuropéptido Y	Neurotransmisor inhibitorio, sistema nervioso simpático
Neuropéptido YY	Regulación del apetito e ingesta de alimentos
Sustancia P	Transmisión nociocéptica, respuesta inflamatoria
Endomorfina 1	Opioide (analgesia)
Endomorfina 2	Opioide (analgesia)
Péptidos de la familia del glucagon/PACAP	
Glucagon	Hormona catabólica
GLP-1	Incretina
GLP-2	Mantenimiento del crecimiento y función absorbente de epitelio de la mucosa intestinal
Péptido intestinal vasoactivo (VIP)	Estimulador de la secreción de insulina dependiente de glucosa
Péptido pituitario activado por la acenilato ciclasa (PACAP)	Neuropéptido en control de la glucosa, metabolismo de lípidos y termogénesis
GIP	Incretina
Factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF)	Estimulador de la secreción y síntesis de hormona del crecimiento
Péptido histidina metionina (PHM)	Estimulador de la secreción de insulina dependiente de glucosa
Quimiocinas	
Factor derivado del estroma 1 (SDF-1)	Quimiotaxis, actividad antiviral, crecimiento tumoral
Quimiocina derivada de macrófagos (MDC)	Quimiotaxis
Quimioatrayente de células T inducible por interferón (I-TAC)	Quimiotaxis
Proteína inducible por interferón γ 10 (IP-10)	Quimiotaxis, proliferación de células hematopoyéticas

La industria alimentaria moderna explora aspectos relacionados a los componentes presentes en los alimentos que promuevan el bienestar y una vida saludable del consumidor [42]. Se ha reportado que las proteínas y péptidos presentes en los alimentos, además de ser macronutrientes básicos, también presentan una gran variedad de actividades biológicas que pudieran tener un efecto benéfico en la salud humana actuando como antioxidantes, antitrombóticos,

Introducción

antihipertensivos, etc. [44, 45]. Los péptidos biológicamente activos son secuencias pequeñas de aminoácidos encriptados en las proteínas de los alimentos; es decir, aminoácidos que se encuentran en una forma inactiva, y se activan al ser liberados por enzimas proteolíticas, durante el procesamiento del alimento o durante la digestión intestinal [46]. La leche y sus derivados son una de las fuentes más ricas en péptidos bioactivos, sin embargo, los péptidos bioactivos se encuentran en otras fuentes animales y vegetales como carne, huevos, algunos peces, trigo, maíz, soya, arroz y hongos [44, 46, 47].

Particularmente, algunos estudios *in silico* e *in vivo* han reportado péptidos inhibidores de la DPPIV encriptados en diferentes proteínas de alimentos como la leche y productos lácteos, la carne y algunas semillas como la soya, el trigo y la cebada (**Tabla 2**) [48-56].

Tabla 2. Alimentos con péptidos inhibidores de la DPPIV [49].

Fuente de proteína	Proteína
Huevo (pollo)	Ovoalbúmina Ovotransferrina Ovomucoide
Leche (bovino)	Caseína alfa S-1 Caseína beta Caseína kapa Lactoalbúmina alfa Lactoalbúmina beta Lactoferrina
Carne (bovino)	Miosina Cadena ligera reguladora de miosina Actina Colágeno cadena alfa
Salmón atlántico	Actina Cadena ligera reguladora de miosina Cadena pesada de miosina lenta
Salmón chum	Colágeno tipo 1 cadena alfa-2
Cebada	Hordeína B Hordeína D Hordeína gama-3
Canola	Cruciferina Napina (cadena pequeña) Napina (cadena larga)
Avena	Avenina Globulina 11S Globulina 12S

Introducción

Tabla 2. Continuación

Fuente de proteína	Proteína
Soya	Globulina 7S
	Glicinina
	Conglicinina beta (cadena alfa)
	Conglicinina beta (cadena beta)
Trigo	Gliadina alfa/beta
	Glutenina (HMW S12)
	Glutenina (LMW S1D1)

El amaranto es una planta nativa de América cultivada por los mayas, aztecas e incas pero con prevalencia a nivel mundial. El género *Amaranthus* abarca más de 50 especies e incluye plantas con un potencial como cultivos alimenticios debido a su resistencia a plagas y estrés abiótico como sequia, calor y salinidad. En los últimos veinte años el amaranto ha resurgido como un cultivo alternativo por su rápido crecimiento, bajos costos de producción, alto valor nutricional [51]. La semilla del amaranto es rica en ácido linoleico, escualeno y otros aceites esenciales y contiene compuestos antioxidantes como el tocoferol. Además, su contenido de proteína es mayor a la mayoría de los cereales y la calidad de esta es comparable con la proteína del huevo (**Tabla 3**) [52].

Tabla 3. Comparación del grano de amaranto con otros granos (contenido por cada 100 g) [57].

Tipo de grano	Amaranto	Maíz	Centeno	Trigo	Arroz
Proteína (%)	14.5	9	13	12	7
Lisina (%)	0.85	0.25	0.4	0.58	0.35
Carbohidratos (g)	63	74	73	72	71
Calcio (mg)	162	20	38	33	41
Hierro (mg)	10.0	1.8	2.6	2.8	3.3
Fósforo (mg)	455	256	376	282	372

Introducción

Con respecto a las propiedades nutraceuticas del amaranto, se ha estudiado ampliamente la porción oleosa de la semilla y se han encontrado propiedades hipocolesterolémicas debido a en parte en el alto contenido de escualeno [59]. Ya se han reportado y caracterizado péptidos bioactivos en la semilla de amaranto con actividad antihipertensiva, antioxidante y el péptido anticancerígeno tipo lunasin [60-63]. Además, mediante espectrometría de masas y un análisis bioinformático, se han identificado péptidos inhibitorios de la DPPIV encriptados en la semilla de amaranto [64]; sin embargo, no se ha caracterizado el potencial inhibitorio sobre la DPPIV de estos péptidos del amaranto.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo general

- Analizar la actividad inhibitoria de los péptidos inhibidores de la enzima DPPIV encriptados en la semilla de amaranto

Objetivos específicos

- Liberar los péptidos bioactivos encriptados en la semilla de amaranto mediante digestiones con tripsina y una simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*.
- Evaluar la actividad inhibitoria de los péptidos bioactivos sobre la actividad de DPPIV en ensayos *in vitro* y en cultivos celulares.
- Purificar y caracterizar cinéticamente los péptidos de amaranto con actividad inhibitoria de la DPP IV.
- Predecir los mecanismos moleculares de la interacción de algunos de estos péptidos inhibidores de la DPPIV mediante modelos informáticos
- Medir la actividad de DPPIV y otros marcadores en sangre en animales de laboratorio bajo una dieta suplementada con amaranto.
- Realizar el análisis proteómico del plasma de animales de laboratorio bajo una dieta suplementada con amaranto.

Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal

En este estudio se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. var. Nutrisol obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Campus Bajío. Las semillas de soya (*Glycine max*), frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) y trigo (*Triticum spp.*), así como del grano de amaranto reventado (Arantto, México) fueron obtenidas en el mercado local en San Luis Potosí, S.L.P., México.

3.2 Liberación de los péptidos bioactivos

3.2.1 Extracción de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto

Las fracciones de proteína de *A. hypochondriacus* se extrajeron de acuerdo a Barba de la Rosa et al. [65]. La harina de la semilla de amaranto molida se desengrasó con hexano (1:10 p/v) por 2 h en agitación constante. Esta suspensión se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se colectó la pastilla y se dejó secar toda la noche. Para obtener la fracción de albúminas se resuspendió la harina desengrasada en agua destilada, se agitó por 1 h a 4 °C, se sonicó en baño de hielo por 30 min, después se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min y se colectó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en una solución de NaCl 0.1 M, KH₂PO₄ 0.01 M y EDTA 1 mM, pH 7.5, se agitó, sonicó y centrifugó como se mencionó previamente para obtener la fracción de globulinas 7S. La nueva pastilla fue resuspendida en una solución de NaCl 0.8 M, KH₂PO₄ 0.01 M y EDTA 1 mM, pH 7.5, sonicada y centrifugada como se mencionó previamente para obtener la fracción de globulinas 11S. La fracción de prolaminas se extrajo de la misma manera a partir de la pastilla obtenida utilizando una solución de etanol al 70%, seguido de la fracción de glutelinas con una solución de Tris 100 mM, pH 8.0. El contenido de proteína de cada una de las fracciones se determinó por el método de Bradford usando el kit Protein-Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) y la albúmina de suero bovino (BSA) como un estándar de calibración (Sigma-Aldrich,

Materiales y métodos

St. Louis, MO, EUA) (Anexo 1). Todas las fracciones se guardaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

NOTA: Debido a que el contenido de prolaminas en amaranto es muy bajo, esta fracción no se utilizó para los ensayos posteriores.

3.2.2 Digestión de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto con tripsina

Las diferentes fracciones de las proteínas de amaranto se sometieron a diferentes digestiones con tripsina proveniente de páncreas porcino (Sigma-Aldrich) utilizando diferentes relaciones enzima/sustrato p/p para obtener diferentes grados de digestión. Las digestiones se llevaron a cabo en una solución de Tris 100 mM, pH 8.0 con 5 mg/mL de proteína de amaranto y tripsina (1:50, 1:10, 1:5, 1:2.5 y 1:1) a 37 °C en un Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) por 14 h en agitación ligera. La reacción se detuvo por congelamiento. El perfil de digestión de las proteínas se visualizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli [66] usando geles de acrilamida al 12% teñidos con Coomassie coloidal (Anexo 1). La enzima fue removida de la solución mediante ultracentrifugación usando filtros con un corte de peso molecular de 10 kDa siguiendo las instrucciones del fabricante (Millipore, Billerica, MA, EUA). Se colectaron los filtrados y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry (Anexo 1) usando el ensayo DC Protein Assay (Bio-Rad) y BSA como estándar.

3.2.3 Simulación de la digestión gastrointestinal *in vitro*

Se realizó un modelo de digestión *in vitro* basándose en el método reportado por Wang et al. [67] con algunas modificaciones. Se resuspendió 1 g de muestra (glutelinas de amaranto, harina desengrasada de amaranto crudo, amaranto reventado, frijol negro, soya o trigo) en 20 mL de una solución de NaCl 0.03 M, pH 2.0. Se calentaron las suspensiones en baño maria a 80 °C por 5 min para inactivar bacterias y proteasas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se

Materiales y métodos

agregó pepsina de cerdo (Sigma-Aldrich), previamente resuspendida en NaCl 0.03 M, pH 2.0, en una relación 1:20 (p/p enzima/sustrato). Las muestras fueron digeridas a un pH constante por 3 h a 37 °C y posteriormente se ajustó a un pH de 7.5 con NaHCO₃. Se preparó una mezcla de partes iguales de tripsina y pancreatina (Sigma-Aldrich) en una solución de NaHCO₃ 0.1 N, se agregó a la solución digestiva (relación enzima/sustrato 1:20) y se incubó por 3 h a 37 °C. Se calentaron las suspensiones a 75 °C por 20 min para detener la reacción. Los hidrolizados se centrifugaron a 13,000 rpm por 30 min y se determinó la concentración de proteína del sobrenadante por el método de Lowry usando BSA como estándar. Los hidrolizados se guardaron a -20 °C.

3.3. Ensayo de actividad de la DPPIV

La actividad de la enzima DPPIV se llevó a cabo de acuerdo al protocolo proporcionado por Sigma-Aldrich (protocolo SSGPNA01). Se utilizó el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA y dipeptidil peptidasa IV aislada de riñón de cerdo (Sigma-Aldrich). Las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos con concentraciones crecientes de los diferentes hidrolizados en Tris 100 mM, pH 8.0, 100 ng/mL de DPPIV y 500 µM de sustrato por 1 h a 37 °C. Posteriormente se tomaron las lecturas de absorbancia a 415 nm en un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Se utilizó diprotin A (Sigma-Aldrich) como un control positivo de inhibición.

3.4. Búsqueda *in silico* de péptidos con actividad biológica encriptados en las glutelinas de amaranto

El patrón de bandeo de las de glutelinas de amaranto se obtuvo por SDS-PAGE en geles al 12% teñidos con Coomassie coloidal. Se cortaron las bandas, se digirieron con tripsina y se analizaron por espectrometría de masas (LC-ESI/MS/MS) de acuerdo a lo reportado por [64]. El análisis se llevó a cabo en un SYNAPT-HDMS (Water Corp., Milford, MA, EUA) acoplado a un sistema nano-UPLC. Los péptidos identificados se introdujeron en la base de datos biopep

Materiales y métodos

(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) para buscar fragmentos peptídicos con actividad biológica.

3.5 Análisis tipo “docking” de la DPPIV con péptidos de las globulinas de amaranto

Para predecir los sitios de interacción entre los péptidos de amaranto y la DPPIV se realizó una digestión *in silico* de la estructura cristalográfica de las glutelinas 11S de amaranto con tripsina. Se hizo un modelaje con algunos de los fragmentos obtenidos usando el servidor I-TASSER, el cual emplea un método basado en fragmentos. Los fragmentos peptídicos se obtuvieron de estructuras templado múltiples fueron luego reensambladas basadas en alineamientos [68]. El modelo con mejor clasificación, de acuerdo a los valores de C-score, se seleccionaron para las simulaciones tipo “docking”. Algunos de los péptidos fueron generados basados en su homología con la estructura 3D de la globulina 11S de amaranto y de *Pisum sativum* (códigos de la Protein Data Bank, PDB: 3QAC y 3KSC, respectivamente) usando el programa COOT [69]. Se realizó un análisis de tipo “docking” de cuerpo rígido de los péptidos y la enzima DPPIV (código PDB: 1R9M) usando ClusPro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu>) [70]. Se eligieron los modelos de interacción más fuertes basados en el tamaño del cluster como un protocolo tipo “docking” de alta resolución de acuerdo al servidor Flex-PepDock [71]. La base de datos CASTp se usó para identificar y medir los sitios de superficie accesibles de la DPPIV [72]. La representación visual del modelo final de interacciones se generó con el programa CHIMERA [73]. Se calcularon las energías de unión con el programa FoldX [74] y se obtuvo información de las interacciones de aminoácidos con el programa PDBsum [75].

3.6 Purificación de los péptidos inhibidores de la DPPIV de las glutelinas de amaranto

Con el fin de identificar y caracterizar los péptidos responsables de la actividad inhibitoria de la DPPIV provenientes de las semillas de amaranto, se realizó la separación de los hidrolizados trípticos de las glutelinas de amaranto mediante

Materiales y métodos

cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó la columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada al sistema ÄKTA FPLC y el programa Unicorn v3.10 (GE Healthcare). Se equilibró la columna en una solución de Tris 100 mM pH 8.0. Se utilizaron hidrolizados de glutelinas con tripsina con diferentes relaciones enzima: sustrato y se inyectaron en la columna a un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron fracciones cada 0.5 mL, se concentraron en una centrifuga evaporadora (Eppendorf) y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Bio-Rad) y BSA como estándar de calibración. Se midió la actividad de la DPPIV en presencia de cada una de las fracciones obtenidas. Se utilizaron estándares para filtración en gel (Bio-Rad) para calibrar la columna y poder estimar el peso molecular de los picos obtenidos.

3.7 Ensayos de actividad de DPPIV en cultivos celulares

3.7.1 Manejo de las líneas celulares

Se determinó el efecto de los hidrolizados de amaranto sobre la actividad de DPPIV producida por diferentes líneas celulares. Se utilizó la línea Caki-1 de adenocarcinoma de riñón humano (ATCC, Manassas, VA, EUA) debido a que los niveles de expresión de DPPIV en este órgano son elevados; además, ya se ha reportado que esta línea celular es un buen modelo para estudiar el epitelio renal y presenta actividad de DPPIV [76]. Por otro lado, debido a que la inactivación de las incretinas se debe en gran parte a la DPPIV proveniente de las células endoteliales vasculares, se trabajó con la línea celular HUVECC de células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas (ATCC) para las determinaciones de actividad de DPPIV.

Para el manejo de la línea Caki-1 se utilizó el medio modificado McCoy's 5A (ATCC), suero fetal bovino al 10% (Thermo Scientific Inc.) y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina (Thermo Scientific Inc.) y para la línea HUVECC el medio de crecimiento consistió en medio F-12K (ATCC), heparina 0.1 mg/mL (Sigma-Aldrich), suplemento de crecimiento de células endoteliales 0.05 mg/mL (Sigma-Aldrich), suero fetal bovino al 10% y 100 U/mL de Penicilina-

Materiales y métodos

Estreptomina. Ambas líneas celulares se crecieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad al 80% en una incubadora NAPCO serie 8000 DH (Thermo Scientific Inc.).

3.7.2 Ensayo de actividad de DPPIV

Las células se sembraron en placas de 96 pozos y una vez que llegaron a confluencia se les dieron dos lavados con PBS, se agregaron 10 µL de PBS, 40 µL de los hidrolizados de amaranto disueltos en PBS y 50 µL del sustrato Gly-Pro-pNA 1 mM disuelto en PBS. La reacción se incubó por 1 h a 37 °C y posteriormente se registraron los valores de absorbancia a 415 nm. Se utilizó el diprotin A como un control positivo de inhibición de DPPIV.

3.7.3 Ensayo de viabilidad celular

A la par de los ensayos de inhibición de la DPPIV se realizaron ensayos de viabilidad celular con el kit de proliferación celular I (MTT) (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para garantizar que las muestras no causan ningún daño a las líneas celulares en las concentraciones utilizadas (Anexo 1).

3.8 Suplementación de amaranto en animales de laboratorio

3.8.1 Manejo de animales de laboratorio

Los animales utilizados en este estudio se obtuvieron del bioterio de la facultad de medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. El protocolo de trabajo fue aprobado por el comité de ética de la universidad (Anexo 1). Todos los especímenes fueron tratados y manipulados de acuerdo a las recomendaciones éticas de la Norma Oficial Mexicana para especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio (NOM-062-ZOOO-1999) y en las regulaciones contenidas en la Ley General de Salud Mexicana.

3.8.2 Preparación del alimento y dieta

Materiales y métodos

Se utilizó alimento para roedores con 18% de proteína como dieta control (2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan, México) con un contenido nutrimental de 18.6% de proteína, 6.2% de grasa, 44.2% de carbohidratos, 3.5% de fibra cruda y 3.1 kcal/g. Se trabajó con semillas de amaranto reventado adquiridas en el mercado local (Arantto, México) con un contenido nutrimental de 16% de proteína, 4% de grasa, 27.6% de carbohidratos y 3.4 kcal/g. Las semillas y el alimento fueron molidos en una licuadora industrial (Industrial, México). La dieta con amaranto consistió en una mezcla de harina del alimento estándar:harina de amaranto reventado (80:20), se le agregó agua a cada formulación para obtener una pasta que fue posteriormente secada en el horno a 45 °C (Felisa, México) por 24 h para obtener las croquetas (Anexo 1).

3.8.3 Tratamientos e inducción de la diabetes

Se trabajó con ratas Wistar macho (40 animales) de 3 semanas de edad con un peso entre 200 y 280 g. Todos los animales se mantuvieron en jaulas individuales de propileno a una temperatura entre 18 y 26 °C, 30-70% de humedad relativa con ventilación apropiada y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h durante el experimento.

Después de 5 días de adaptación, se seleccionaron 20 ratas al azar para la inducción de diabetes, la cual fue hecha con una dosis única de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) vía intraperitoneal (40 mg/kg). El estado hiperglucémico fue confirmado 3 días después de la inducción por punción de la vena caudal en ayuno (glucosa >350 mg/dL). Durante el experimento se mantuvieron los niveles de glucosa entre 250-350 mg/dL mediante la administración subcutánea de insulina glargina de liberación prolongada (Sanofi-Avenits, Alemania).

El experimento consistió en 4 grupos de 10 ratas: ratas normoglucémicas con dieta control (NC, ratas normoglucémicas con suplementación de amaranto (NA), ratas diabéticas con dieta control (DC) y ratas diabéticas con suplementación de amaranto (DA). Diariamente se alimentó a las ratas con 30 g de su respectiva formulación y disposición de agua *ad libitum* por 12 semanas. Durante el experimento se registró el consumo del alimento y el peso del animal. Se

Materiales y métodos

colectaron muestras de suero y plasma (tubos con EDTA) en ayuno por punción de la vena caudal cada dos semanas. Hubo una toma postprandial en la semana 11 una hora después de haber consumido alimentos. A final del experimento, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital vía intraperitoneal; se colectó la sangre por punción cardíaca y los riñones fueron disectados, congelados y molidos finamente en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su análisis.

3.8.4 Parámetros bioquímicos en sangre

Se determinaron los niveles de glucosa, colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL (cHDL) en ayuno mediante kits comerciales (BioSystems®, España) de acuerdo las indicaciones del fabricante en un analizador Chemistry Analyzer BS-300 (Shenzen Mindray Bio-Medical Electronics Co., China) (Anexo 1).

3.8.5 Extracción de proteínas membranales de riñón

Para obtener las proteínas de membrana se agregaron 10 mL de solución de extracción (Triton X100 al 1% v/v en Tris 100 mM, pH 8.0) a 1 g de tejido congelado y se homogenizaron en el vortex por 5 min. Se centrifugó la suspensión a 1.000 x g por 10 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se centrifugó de nuevo a 20,000 x g por 20 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 5 mL de solución de extracción a la pastilla; se homogenizó esta suspensión, se centrifugó a 20,000 x g por 20 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. El contenido de proteína de los extractos se determinó por el ensayo DC Protein (Bio-Rad) usando BSA como estándar de calibración. Se guardaron los extractos a -20 °C hasta su análisis.

3.8.6 Ensayo de actividad de DPPIV en riñón y en plasma

Las determinaciones de actividad enzimática de la DPPIV en tejidos biológicos se realizaron de manera similar al ensayo reportado previamente pero con algunas modificaciones. En placas de 96 pozos se añadieron 10 µL de plasma de rata, 40

Materiales y métodos

μL de Tris 100 mM (pH 8.0) y 50 μL de Gly-Pro-pNitroanilide 1 mM; esta mezcla se incubó a 37 °C por 1 h y se midió la absorbancia a 415 nm. Los resultados se expresaron como μmol de nitroaniline/min basados en una curva estándar de p-nitroanilina (Sigma).

Con respecto a la actividad de DPPIV en riñón, se utilizó el extracto de proteínas membranales en una dilución 1:10 (v:v) y se continuó de la misma manera que para el ensayo en plasma. Los resultados se expresaron como μmol de nitroanilina/min/g de tejido.

3.8.7 Expresión de DPPIV en riñón por RT-PCR

Se extrajo ARN total de riñón usando el reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific Inc.) y 50 mg de tejido congelado de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Se visualizó la integridad de las muestras en un gel de agarosa y se cuantificó el contenido de ADN en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) Se sintetizó el ADNc a partir de 1.5 μg de ARN total con transcriptasa reversa SuperScript™ III (Thermo Fisher Scientific Inc.) y el kit de síntesis de ADNc SMART™PCR (Clontech, Palo Alto, CA, EUA). El ADNc se obtuvo con la ADN polimerasa de alta fidelidad iProof™ (Bio-Rad). Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo con 150 ng de ADN y la ADN polimerasa DreamTaq (Thermo Fisher Scientific Inc.) en un termociclador T100™ (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 94 °C por 2 min

30 ciclos de amplificación

 Desnaturalización: 94 °C por 20 s

 Alineamiento: 58 °C por 30 s

 Extensión: 72 °C por 90 s

Extensión final: 72 °C por 2 min

Materiales y métodos

Se normalizaron los niveles de expresión de DPPIV con el transcrito de β -actina. Los oligonucleótidos usados fueron:

DPPIV (amplicón de 311 pb): 5'-TGATGGCAGAGGAAGTGGTTACC-3'
5'-GTGGGAATAGATGTGCTGGTGAG-3'
 β -actina (amplicón 350 pb): 5'-TGTGTTGTCCCTGTATGCCTCTG-3'
5'-ACCGCTCATTGCCGATAGTG-3'

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con GelGreen™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, EUA). Los niveles de expresión de la DPPIV se analizaron basados en la intensidad de las bandas con el programa Quantity One™ v4.5.0 (BioRad).

3.8.8 Electroforesis 2D de las proteínas de plasma

3.8.8.1 Preparación de la muestra

Para determinar los cambios en el perfil de proteínas en sangre debidos a la suplementación de amaranto en ratas diabéticas, las muestras finales de plasma de cada uno de los grupos experimentales se juntaron en un pool y se removieron las proteínas abundantes con el kit de enriquecimiento ProteoMiner™ (Bio-Rad) (Anexo 1), terminando con dos fracciones de proteína para cada grupo: las proteínas abundantes y las proteínas poco abundantes. Ambas fracciones se precipitaron con fenol-cloroformo de acuerdo a lo reportado por Santos-González et al. [77] con algunas modificaciones. Se mezcló 1 volumen de muestra con 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, se homogenizó en vortex y se centrifugó a 25,000 x *g* por 15 min a 4 °C. Se removió la fase superior, se agregaron 4 volúmenes de metanol, se centrifugó a 25,000 x *g* por 15 min a 4 °C y se resuspendió la pastilla en solución de rehidratación para tiras de isoelectroenfoque (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS al 2%, DTT 20 mM, azul de bromofenol al 0.002%) con anfolitos al 0.5% pH 4-7 (Bio-Rad). Se cuantificó el contenido de proteína mediante el ensayo Protein Assay (Bio-Rad) y BSA como estándar.

Materiales y métodos

3.8.8.2 Electroforésis 2D de las proteínas abundantes

El isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas abundantes de plasma de rata se llevó a cabo en tiras IPG de gradiente lineal pH 4-7 de 11 cm (Bio-Rad). Las tiras se rehidrataron por 16 h con 300 μ g de proteína total en solución de rehidratación a temperatura ambiente. El IEF se realizó en un sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) a 50 mA constantes por tira bajo las siguientes condiciones:

Desalado: Gradiente de 150 V por 2 h

(I): Gradiente de 500 V hasta 0.01 kVh

(II): Gradiente de 4000 V hasta 5.6 kVh

(III): 8000 V constantes hasta 12 kVh

Las tiras se equilibraron por 15 minutos en solución de equilibrio (Urea 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol al 29.3%, SDS al 2%, DTT al 1% y azul de bromofenol al 0.002%), se colocaron en geles de poliacrilamida al 8% y se sellaron con agarosa. La separación electroforética se llevó a cabo en una cámara SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit (GE Healthcare) y se tiñeron los geles con Coomassie coloidal. Se estimó el peso molecular de cada spot de proteína al compararlo con el marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.). El *pI* experimental se determinó de acuerdo a la migración de los spots de proteína en las tiras de IEF.

3.8.8.3 Electroforesis 2D de las proteínas poco abundantes

Para el IEF de las proteínas poco abundantes se usaron tiras IPG de gradiente lineal pH 4-7 de 7 cm (Bio-Rad). Se rehidrataron las tiras con 50 μ g de proteína total y se llevó a cabo el IEF bajo las siguientes condiciones:

Desalado: Gradiente de 150 V por 2 h

(I): Gradiente de 500 V hasta 0.01 kVh

(II): Gradiente de 4000 V hasta 5.6 kVh

(III): 5000 V constantes hasta 2.5 kVh

Materiales y métodos

Las tiras se equilibraron en solución de equilibrio por 15 min y se colocaron en geles prefabricados de gradiente de 8-16% de acrilamida Mini-Protean® TGX™ (Bio-Rad). Los geles se tiñeron con Sypro® Ruby (Thermo Fisher Scientific Inc.) (Anexo 1). Se estimó el peso molecular de cada spot de proteína al compararlo con el marcador de peso molecular (BenchMark Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.). El pI experimental se determinó de acuerdo a la migración de los spots de proteína en las tiras de IEF.

3.8.8.4 Análisis de imágenes

Se escanearon los geles en un PharosFX™ PLUS Molecular Imager (BioRad) con una resolución de 100 µm. El análisis de imágenes se realizó con el programa MELANIE 2D Gel Analysis Software v7.0 (GENEBIO SA, Ginebra, Suiza). Se consideró que las proteínas estaban diferencialmente acumuladas cuando su volumen normalizado mostrara una razón de cambio ≥ 2 cuando se comparaban los tratamientos con el control. Los cambios significativos se determinaron por ANOVA ($P < 0.01$).

3.8.8.5 Digestión en gel y análisis de espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Los spots diferenciales se cortaron del gel y se lavaron con una solución de bicarbonato de amonio 25 mM pH 7.8 y con acetonitrilo puro. Los fragmentos de gel se secaron en una centrifuga evaporadora (Eppendorf). Se redujeron las muestras con DTT 10 mM en una solución de bicarbonato de amonio 25 mM seguido por la alquilación de proteínas con iodoacetamida 55 mM. La digestión de los puntos se llevó a cabo con tripsina grado secuenciación (Promega, Madison, WI, EUA) durante toda la noche a 37 °C en una solución de bicarbonato de sodio 25 mM. Los fragmentos trípticos resultantes se extrajeron dos veces con una solución acetonitrilo:agua (3:2 v/v) con 0.1% ácido trifluoroacético al. Los sobrenadantes se colectaron y se concentraron a un volumen final de 10 µL en una centrifuga evaporadora. Se desalaron y concentraron los péptidos a un

Materiales y métodos

volumen final de 5 μL con una Zip-Tip C18 (Millipore) de acuerdo al protocolo del fabricante.

La separación de los péptidos trípticos por cromatografía de líquidos a nanoescala se llevó a cabo en un sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA; EEUU) equipado con una pre-columna Symmetry C18 (5 μm , 20 mm x 180 μm , Waters) y una columna analítica BEH130 C18 (1.7 μm , 100 mm x 100 μm , Waters). Para cada muestra digerida se inyectaron 4 μL al loop y transferidos con una solución acuosa de ácido fórmico al 0.1% (fase móvil A) a la pre-columna con un flujo de 600 nL/min. Después del desalado y la pre-concentración, se eluyeron los péptidos a la columna analítica y se separaron con un gradiente lineal de 3-80% de la fase móvil B (ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo) por 30 min con un flujo de 600 nL/min, seguido de un enjuague de 2 min con 85% de la fase móvil B. La columna se reequilibró a las condiciones iniciales por 15 min con la fase móvil A. Se mantuvo la temperatura de la columna a 35 $^{\circ}\text{C}$. La corrección de las masas se hizo con el compuesto [Glu¹]-Fibrinopéptido B (Sigma-Aldrich), el cual se distribuyó con la bomba auxiliar del sistema nanoACQUITY UPLC a un flujo de 200 nL/min a una concentración de 100 fmol/mL al aspersor de referencia de la fuente del NanoLockSpray del espectrómetro de masas.

El análisis de espectrometría de masas de los péptidos se llevó a cabo usando un SYNAPT-HDMS (Waters). El espectrómetro fue operado en modo V y se realizaron los análisis en un modo positivo de ionización por electrospray (ESI). El analizador de tiempo de vuelo (TOF) se calibró externamente con el [Glu¹]-Fibrinopéptido B con una $m/$ de 133 a 2422. Se corrigió la masa después de la adquisición de los datos con el ion monoisotópico del [Glu¹]-Fibrinopéptido B doblemente protonado. Se tomó muestra del atomizador de referencia cada 30 s. Se ajustó la radiofrecuencia aplicada al cuadrupolo del analizador de manera tal que se transmitieran eficientemente iones con una m/z entre 50 y 2000. Los datos de las masas exactas se colectaron en un modo de adquisición alternado de energía baja y elevada (MS^{e}). El tiempo de adquisición del espectro en cada modo fue de 1.5 s con un retraso de 0.1 del interscan. En el modo de energía baja, la

Materiales y métodos

información se colectó a una energía de colisión constante de 3 eV. En el modo de energía elevada, se rampeó la energía de colisión de 15 a 45 eV durante cada integración de 1.5 s. Un ciclo de energía baja y elevada se adquirió cada 3.2 s.

3.8.8.6 Identificación de proteínas usando los sets de datos de MS/MS y búsqueda en las bases de datos

Se usaron los sets de datos de los espectros de masas para generar archivos PKL con el servidor global Protein Lynx v2.4 (PLGS, Waters). Posteriormente las proteínas fueron identificadas usando los archivos PKL en el motor de búsqueda MASCOT v2.3 (Matrix Science, Londres, RU). Las búsquedas se realizaron en la base de datos no redundante de NCBI bajo el subset *Rattus* (68 575 secuencias). Se usó a la tripsina como proteasa específica y se permitió una falla en el corte. La masa de tolerancia de los iones precursores y fragmentados fue de 10 ppm y 0.05 Da, respectivamente. Se estableció la carbamidometilación de la cisteína como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable. El criterio de identificación de la proteína incluyó que se alinearan al menos dos espectros de masas a un nivel de confianza del 99% y se consideró una identificación exitosa cuando se obtuvieran scores significativos de MASCOT (>25), indicando identidad u homología extensa a $P < 0.01$ y la presencia de series de iones consecutivas de más de tres aminoácidos. Las proteínas identificadas se clasificaron en diferentes categorías de acuerdo Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>). Además se obtuvieron las redes de interacción proteína-proteína con la base de datos String 9.1 (<http://string-db.org/>).

3.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Se realizaron pruebas de t de Student ($P < 0.05$), Bonferroni ($P < 0.05$), ANOVA de una y dos vías ($P < 0.01$) para detectar diferencias estadísticas. En todos los resultados se presenta el promedio \pm DE.

Resultados

4. Resultados

4.1 Digestión de las glutelinas de amaranto

Se sabe que las glutelinas constituyen la principal proteína de reserva en las semillas de amaranto [65]. Ya se ha reportado previamente que esta fracción contiene péptidos con un potencial inhibitorio sobre la DPPIV [64], sin embargo, esta actividad no ha sido probada. En este trabajo se digirieron las glutelinas con tripsina a diferentes relaciones enzima:sustrato como se muestra en la **Figura 4**. Se puede observar que conforme aumentó la cantidad de tripsina, las bandas de mayor peso molecular desaparecieron, mientras que los péptidos menores a 10 kDa incrementaron hasta que no se pudieron detectar bandas con la tinción de Coomassie.

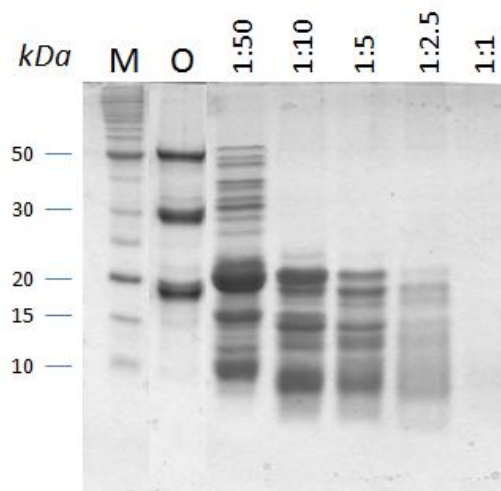


Figura 4. Gel SDS-PAGE de las glutelinas de amaranto digeridas con tripsina. Se digirieron las glutelinas (5 mg) con diferentes concentraciones de tripsina (relación enzima:sustrato 1:50, 1:10, 1:5, 1:2.5 y 1:1) en Tris 100 mM pH 8.0 por 14 h. Se visualizaron las proteínas con la tinción de Coomassie coloidal. M: Marcador de peso molecular, O: Glutelinas sin digerir.

4.2 Caracterización de la actividad inhibitoria sobre la DPPIV de los péptidos trípticos de amaranto

Resultados

Se utilizó el diprotin A (Ile-Pro-Ile) como un control positivo de la inhibición de DPPIV, obteniendo una IC_{50} de 5.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 17 μM (concentración a la cual se obtiene el 50% de inhibición) (**Figura 5**). Este valor es similar al reportado en la literatura [31].

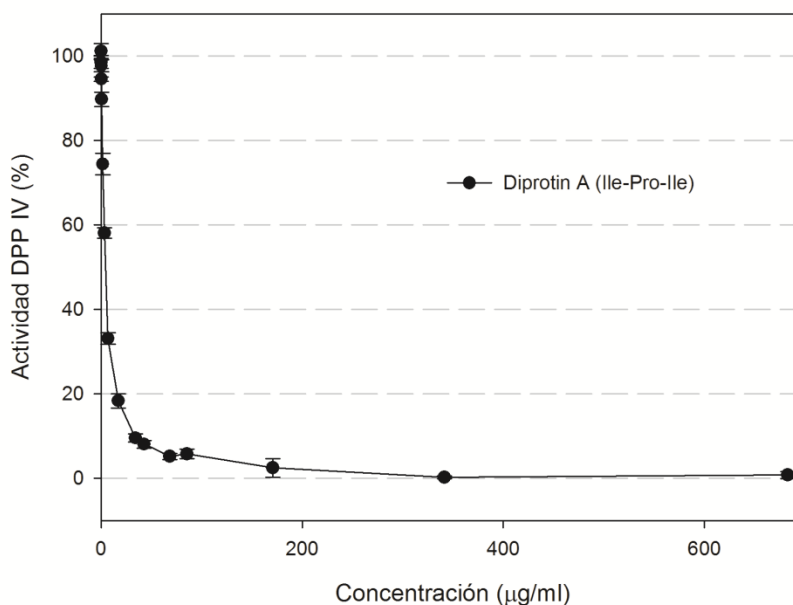


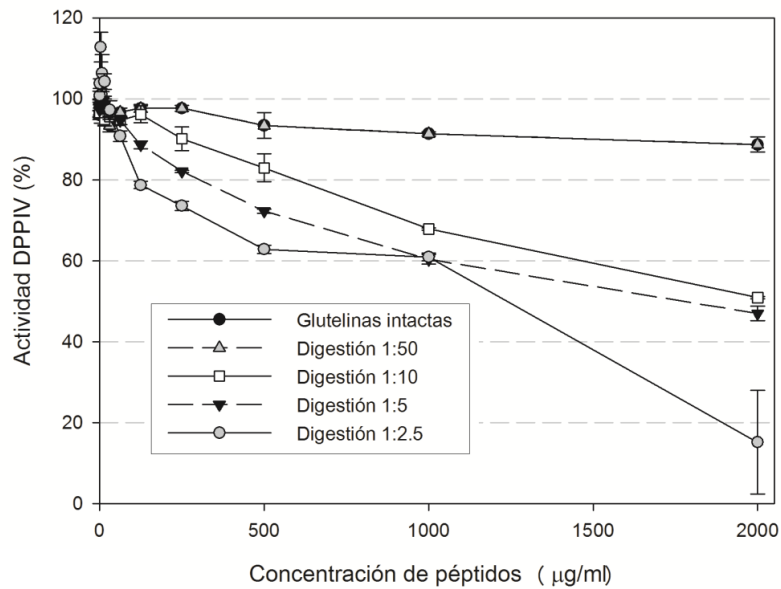
Figura 5. Efecto del diprotin A sobre la actividad de DPPIV. Se midió la actividad de DPPIV en Tris 100 mM pH 8.0 por 1 h a 36 °C usando el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA. Las lecturas de absorbancia se tomaron a 415 nm. Concentración de DPPIV: 100 ng/mL, concentración de sustrato: 500 μM . Promedio \pm DE.

En la **Figura 6A** se muestra que la actividad de DPPIV en presencia de los hidrolizados de glutelinas de amaranto disminuyó en una relación dosis-respuesta con una IC_{50} entre 1,200 y 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dependiendo de la relación enzima:sustrato. De manera interesante, cuando se retiraron los fragmentos mayores a 10 kDa por ultrafiltración, la IC_{50} de las muestras se encontró entre 1,000 y 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando que los péptidos menores a 10 kDa son capaces de inhibir la actividad de DPPIV (**Figura 6B**).

Con respecto al resto de las proteínas de la semilla, las albúminas y globulinas de amaranto se digirieron con tripsina en una relación 1:5 y se probó la capacidad

Resultados

A



B

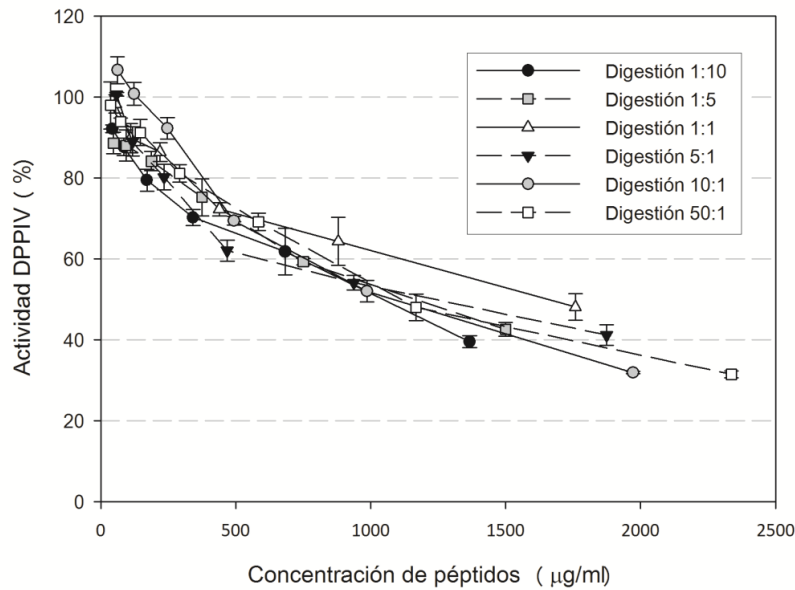


Figura 6. Actividad inhibitoria de los hidrolizados trópticos de las glutelinas de amaranto sobre la DPPiV. (A) Las glutelinas de amaranto se digirieron con diferentes relaciones enzima:sustrato (B) Se eliminaron los fragmentos mayores a 10 kDa por ultrafiltración y se midió la actividad de DPPiV en presencia de estos péptidos. Concentración de DPPiV: 100 ng/mL, concentración de sustrato: 500 µM. Promedio ±DE.

Resultados

inhibitoria sobre la DPPIV de los péptidos liberados. Como se puede observar en la **Figura 7A**, todas las proteínas de reserva del amaranto fueron capaces de inhibir a la enzima al menos en un 20% a 1,500 $\mu\text{g/mL}$, siguiendo un patrón dosis-respuesta. La fracción que mostró la mayor inhibición de DPPIV fueron las glutelinas, mientras que las globulinas 11S tuvieron la menor inhibición.

4.3 Simulación de la digestión gastrointestinal del amaranto y otras semillas

Para este trabajo se implementó un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* usando las principales enzimas responsables de la degradación de proteínas en el tracto gastrointestinal incluyendo a la pepsina liberada por el estómago, la pancreatina (un extracto de páncreas que contiene proteasas y otras enzimas líticas) y la tripsina liberada por el páncreas al intestino delgado. Usando este modelo de digestión simulada probamos las glutelinas de amaranto, harina desengrasada de amaranto crudo, así como de amaranto reventado (que es la forma en que comúnmente se consume este grano), soya, frijol negro y trigo (**Figura 7B**). La muestra que produjo la menor inhibición sobre la DPPIV fue la harina de frijol. La harina de amaranto reventado presentó un menor efecto inhibitorio que la harina no procesada. Las muestras con mayor actividad inhibitoria (hasta 50%) fueron la harina de amaranto crudo (IC_{50} 1,100 $\mu\text{g/mL}$) y de trigo (IC_{50} 800 $\mu\text{g/mL}$). Los péptidos liberados por las glutelinas en este modelo de digestión gastrointestinal conservaron su actividad inhibitoria sobre la DPPIV pero su efecto fue menor que el de la harina completa. Es posible que este efecto se deba a la suma de los péptidos inhibidores de esta enzima contenidos en todas las proteínas de reserva (albúminas, globulinas y glutelinas).

Debido a que no existe información sobre el efecto de la soya sobre la DPPIV, en este trabajo se probó el efecto del hidrolizado de proteína de soya. Sorprendentemente se observó que la harina de soya fue capaz de inhibir esta enzima hasta un 40% (1,400 $\mu\text{g/mL}$), siguiendo un patrón similar al observado con las glutelinas de amaranto.

Resultados

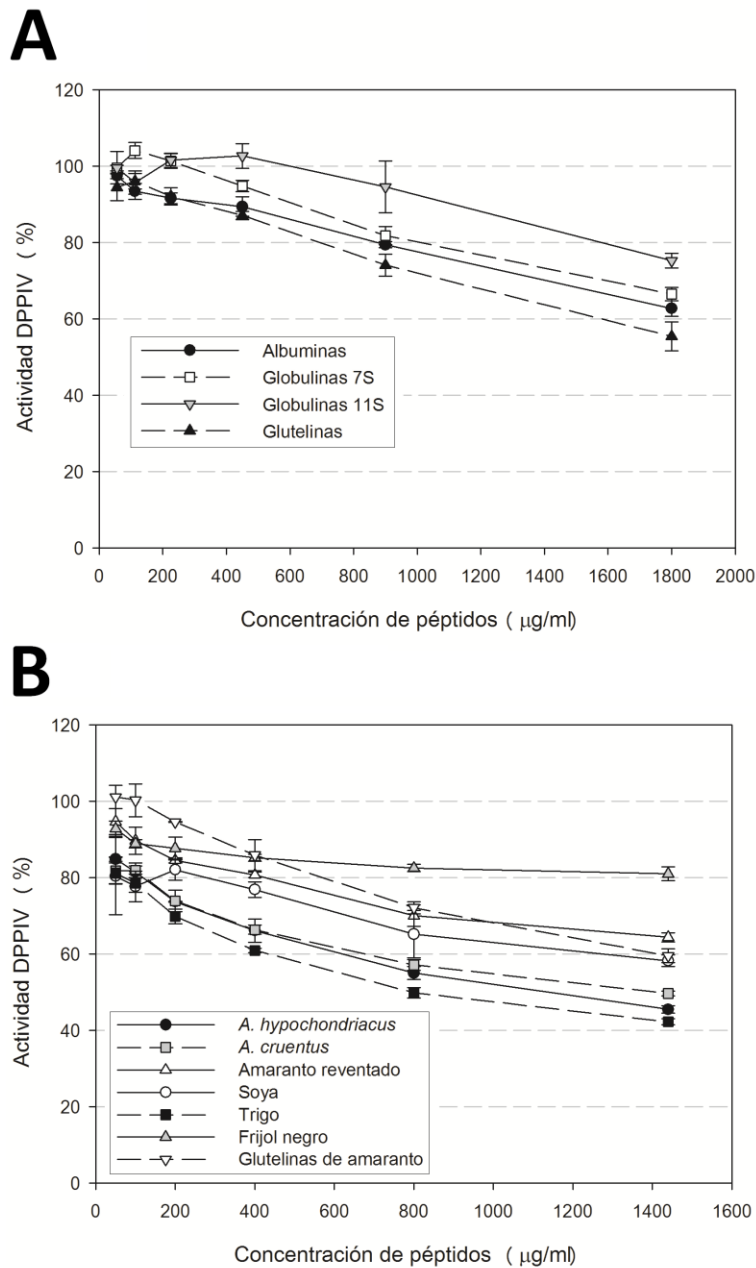


Figura 7. (A) Actividad inhibitoria de los hidrolizados trípticos de las diferentes proteínas de reserva del amaranto sobre la DPP-IV. Las proteínas de amaranto fueron digeridas con tripsina en una relación enzima:sustrato 1:5 por 14 h, se utilizaron los péptidos menores a 10 kDa. (B) Se simuló la digestión gastrointestinal con pepsina, pancreatina y tripsina con harina de diferentes semillas por 6 h. Concentración de DPP-IV: 100 ng/mL, concentración de sustrato: 500 µM. Promedio \pm DE.

Resultados

4.4 Caracterización *in silico* de los péptidos de amaranto con actividad inhibitoria de la DPPIV

Mediante LC-ESI/MS/MS y un análisis bioinformático se identificaron los fragmentos PPPP, GP, PP, MP, VA, MA, KA, LA, FA, AP, FP, PA, LP, VP, LL, VV, HA, IPA, e IPI en las glutelinas de amaranto, de los cuales ya se ha reportado una actividad inhibitoria sobre la actividad de DPPIV (**Tabla 4**).

Tabla 4. Péptidos bioactivos encriptados en las glutelinas de *A. hypochondriacus*

Actividad	Secuencia	Frecuencia ^a	Descripción
Antihipertensiva	VMP,ILP, VLP, PLP, RL, IR, HIR, FQP, GPA, IKP, LKL, AVP, PQR, AAP, FGK, GRP, AKK, RY, LY, IY, VF, MF, KW, RFH, MY, LW, LPP, VRP, TAP, ALPP, LVL, GDAP, VW, VWY, YW, RF, FWN, VY, YGGY, HY, FP, GKP, IPA, GGY, VAA, VAP, IPP, VPP, LVR, PLW, GY, YPR, PR, VSP, LAA, LS, LQP, LRP, LNP, VAY, RA, YL, LF, YG, FY, FNQ, LAY, AY, LSPA, AFP, AIP, YP, LLP, LQQ, YGL, VPK, HLL, VFK, GTW, GVW, TVY, GPL, PGL, LGP, GLP, PLG, LPG, GP, PL, IVY, DLP, AW, IW, GPV, RP, WH, LKP, VFPS, GEP, VK, PSY, FFL, IA, LKA, LAP, GW, RW, IP, RP, AF, AP, LA, KR, VP, RA, YA, AA, GF, FR, IF, VG, IG, GI, GM, GA, GL, AG, GH, HL, GR, KG, FG, DA, GS, GV, MG, GQ, GK, GT, WG, HG, GE, GG, QG, SG, LG, GD, TG, EG, EA, NG PG, IAK, VR, MKG, PAP, YVP, VAV, SHP, LTF, IFG, MNP, NPP, TTN, ITT, PPK, GYK, YGG, LRY, NKL, YNK, IYK, LIY, AIPP, QK, DG, NY, NF, SY, SF, KY, KF, KL, YK, NK, RR, AR, KA, LVE, VIY, CF, EY, VVRP, LLF, KP, GEP, IAP, GPP, FAL, IAE, EI, IE, EV, VE, TE, LQ, LN, PT, TQ, AH, PP, PQ, EW, ME, EK, KE, HP, PH, HK, IEP, AGSS, IQY, ALEP, IQP, TF, AI, IEW, IKY, AGSP	14,605	Inhibidor de la ECA
Inhibidor de DPPIV	PPPP, GP, PP, MP, VA, MA, KA, LA, FA, AP, FP, PA, LP, VP, LL, VV, HA, IPA, IPI	2,658	Inhibidores de DPPIV

Resultados

Tabla 4. Continuación

Actividad	Secuencia	Frecuencia ^a	Descripción
Estimulantes	VPL, EEE, SSS, LLL, VL, LV, IV, IL, LI, II, LL, EE, SE	1,667	Estimuladores de la liberación de sustancia vasoactiva, péptido estimulante de la captación de glucosa
Antioxidantes	HHP, HHPL, HLH, LHH, LH, HL, HH, AHK, VHH, IKK, FKK, AY, GYY, ADF, SDF, LY, IY, AH, EL, WY, HDH, HEH, IHH, FHH, WHH, HHF, HHW, SHH, THH, DYY, YYD, YEY, YYR, YYL, YYF, YYY, YYS, YIY, YVY, FYY, WYY, YFY, YGY, YNY, YTY, YCY, DHH, HHH, HAH, HVH, KHH, LHA, LHD, LHE, LHF, LHG, LHI, LHK, LHL, LHM, LHR, LHS, LHV, LHW, LHY, LWA, LWE, LWF, LWG, LWK, LWN, LWR, LWT, LWY, PHA, PHD, PHE, PHG, PHK, PHL, PHM, PHN, PHR, PHS, PHV, PWA, PWD, PWE, PWG, PWI, PWL, PW, PWQ, PWR, PWW, PWY, RHA, RHE, RHF, RHG, RHN, RHR, RHS, RWG, RWL, RWN, RWR, MY, QGAR, VKL, VKV, IKL, GGE, GAH, EAK, KAI, KVI, KD, PEL, IQY, YVL, PW, RW, IR, LKP, LK, KP, TY, TFE, TSTA, VY, SWN	1,504	Antioxidante
Reguladora	GFW, GFL, LGY, GLY, GLF, DY, GP, PG, GPGG, PGP, SYSM	445	Péptido regulador del flujo de iones, péptido regulador del foinositol, péptido regulador de la actividad membranar de la mucosa estomacal
Antitrombótica	GPRG, GPR, RGDS, GP, PGP, PG, NQDK, SSGE, DEE, GPGG, PPK	427	Inhibidor de la coagulación por trombina y fibrinógeno, inhibidor de fibronectina, péptido antitrombótico
Activación de la proteólisis mediada por ubiquitina	RA, LA, WA	423	-
Antiamnésico	PPPLP, MPPPLP, TPPV, PPPV, VPL, GPGG, PGP PG, GP, MPPPL	394	Inhibidor PEP, Diprotin B, Inhibidor de prolil-endopeptidasa

Resultados

Tabla 4. Continuación

Actividad	Secuencia	Frecuencia ^a	Descripción
Otros inhibidores	MYMLT,GQ,PGVY, GAW, PPPA, PPPK, PPEP, PPLP, PPAP, PPPF, PPGP, IR, KF, EF	325	Inhibidor de quimiotripsina, inhibidor de dipeptidil carboxipeptidasa, inhibidor de CaMPDE
Hipotensivos	IR, KR, EF	202	-
Inmunomoduladores	YG, VDPP, GFL, EAE, RKP, YGG	120	Péptido inmunoestimulante, péptido tipo timosina
Anticáncer	VVV	20	Proteína de unión a Dvl
Inmunoestimulantes	LLY, GVM, LGY	17	-
Neuropéptidos	KPS, KPT, YL	71	Péptido ansiolítico
Quimiotácticos	PGP	11	-
Anoréxicos	PGP	11	-
Opioides	PLG, GLF, GYY	9	-
Embriotóxicos	RGD	3	-

^aFrecuencia: La frecuencia de la ocurrencia de los fragmentos bioactivos en una secuencia de proteína (A): $A=a/N$, donde a es el número de fragmentos con una actividad dada en una secuencia de proteína y N es el número de residuos de aminoácidos de la proteína

Hasta el momento no existe información sobre la estructura de las glutelinas de amaranto, pero las globulinas 11S de amaranto han sido clonadas, secuenciadas y recientemente se ha reportado su estructura tridimensional [78, 79]. Debido a esto se utilizó la estructura de la globulina para realizar un análisis de digestión *in silico* con tripsina. La **Figura 8A** muestra que la digestión con tripsina liberó al menos cuatro péptidos mayores a 4 residuos (**Tabla 5**). Recientemente se han reportado péptidos mayores a 13 residuos capaces de inhibir a la DPPIV; sin embargo, todavía no se han reportado sus mecanismos moleculares [48] por lo que se utilizaron herramientas bioinformáticas en este trabajo para predecir los modos de acción de los péptidos encontrados.

Se usaron herramientas para el diseño de fármacos y simulaciones tipo “docking” de ligando-enzima para analizar los modos de unión de los péptidos trípticos de

Resultados

Tabla 5. “Docking” molecular de los sitios potenciales de unión de la DPPIV con los péptidos de las globulinas 11S de amaranto

No.	Secuencia	No. Residuos (Color) ^a	Energía de unión (kCal/mol) ^b	pI/PM ^c
I	STNYFLISCLLFVLFNGCMGEG	1-13 (amarillo)	-7.27	6.6/1482.6
II	STHASGFFFFHPT	18-39 (magenta)	-9.49	4.0/2428.7
III	GLTEVWDSNEQEF	68-91 (azul)	-5.98	3.5/1553.6
IV	TIEPHGLLLPSFTSAPELIYIEQNGITGMMI PGCPETYESGSQQFQGGEDE	92-143 (naranja)	-7.34	3.7/5571.1

^aEl color es el utilizado en la **Figura 8**

^bEnergía calculada por el programa FoldX

^cValores teóricos, PM en kDa

amaranto con la enzima DPPIV (**Figura 8B y C**). La estructura activa de la DPPIV (código PDB: 1R9M) existe como un dímero con dos dominios formando un dominio propulsor de ocho láminas con una cavidad de 30-45 Å entre cada monómero donde los inhibidores se unen cerca del sitio catalítico [80]. Esta estructura dimérica forma dos aberturas de acceso a la cavidad; la abertura grande, cargada negativamente, se encuentra entre el dominio hidrolasa y el dominio propulsor de la enzima y se cree que es la ruta de entrada favorita de los sustratos [81]. Como se puede observar en la **Tabla 5**, el péptido más pequeño (residuos 1-13) mostrado en amarillo en la **Figura 8**, tiene un pI predicho cerca de los valores neutros. Este péptido se localizó dentro de la cavidad grande de la DPPIV bloqueando el acceso de los sustratos naturales. Los otros tres péptidos con un pI ácido (**Tabla 4**) se localizaron en la interfase de dimerización, bloqueando por tanto la formación de la forma activa de la DPPIV. La energía de unión predicha de los péptidos se encontraba entre -5.98 y -9.48 kCal/mol (**Tabla 5**); estos valores se encuentran dentro del rango reportado para interacciones estables [74].

La interacción potencial de los péptidos de las globulinas de amaranto con el dominio de la DPPIV se muestra en la **Figura 9**. El péptido I interacciona con los residuos Phe₂₀₈-Trp₂₁₆ de la DPPIV, el péptido II con los residuos Glu₇₃₁-His₇₅₀, el péptido III con los residuos Thr₇₀₆-Thr₇₅₃ y el péptido IV con los residuos Phe₇₃₀-Gln₇₄₉. Estas interacciones son principalmente interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno.

Resultados

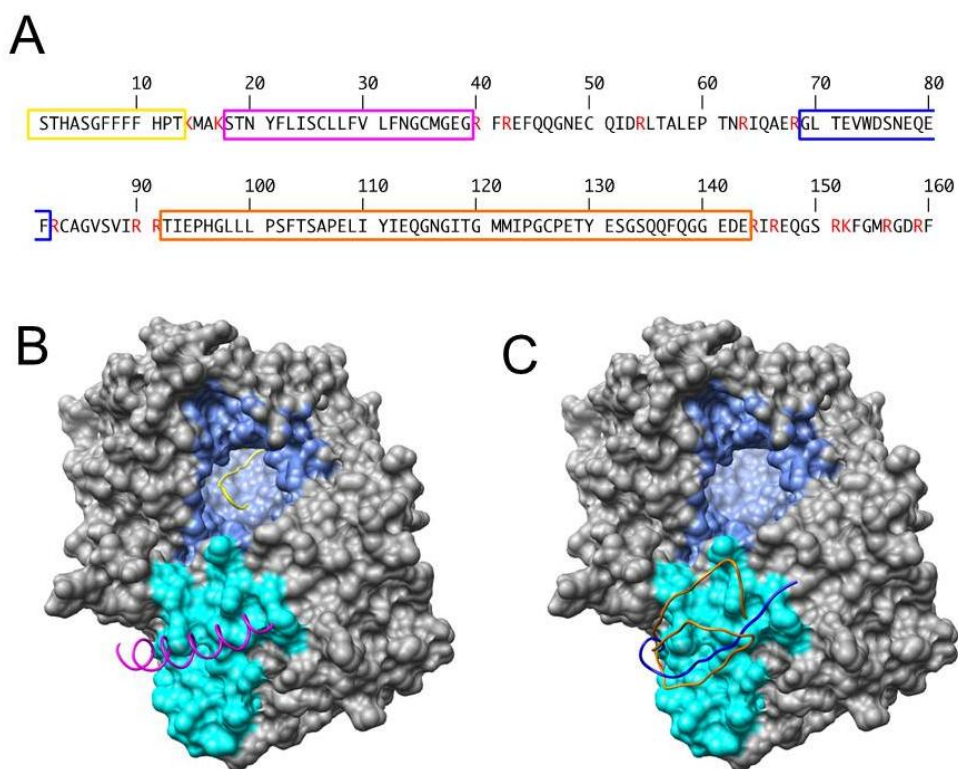
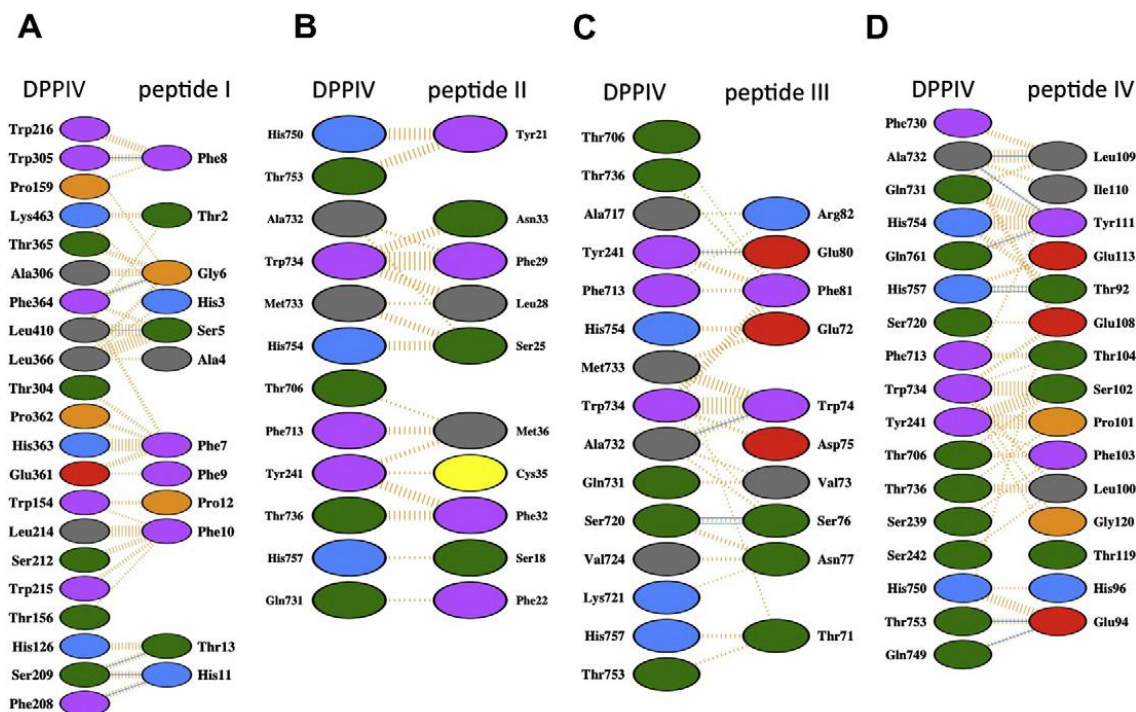


Figura 8. Modelo estructural de la interacción entre la DPPIV y los péptidos de la globulina 11S de amaranto. Se muestra a la DPPIV en forma de monómero. La cavidad interna de la enzima se coloreo en azul; los residuos que medían la dimerización de la DPPIV se muestran en cían. (A) Estructura primaria de la globulina 11S de amaranto. Los aminoácidos marcados con rojo muestran los sitios de corte de la tripsina. Las secuencias dentro de las cajas coloreadas corresponden a los péptidos utilizados para el modelaje con la DPPIV. (B) Los péptidos putativos que interaccionan de la globulina 11S del residuo 1 y 18 se muestran en la cavidad interna en amarillo y en la interface de dimerización en magenta. (C) Los péptidos del residuo 69 y 92 se muestran en la interface de dimerización en color azul y naranja respectivamente.

4.5 Purificación de los péptidos inhibidores de la DPPIV de las glutelinas de amaranto

Como parte de la caracterización del potencial antidiabético de las proteínas de amaranto se purificaron los péptidos con mayor actividad inhibitoria sobre la DPPIV de las glutelinas de amaranto mediante cromatografía de filtración en gel. Se utilizó la

Resultados



Figura

9. Interacción detallada entre la enzima DPPiV y los péptidos de amaranto, calculada con el servidor PDBsum. Las líneas naranjas discontinuas representan las interacciones hidrofóbicas, las líneas azules los puentes de hidrógeno. Los círculos coloreados describen las propiedades de los aminoácidos; residuos positivos (H, K, R) se muestran en azul, residuos negativos (D, E) en rojo, residuos neutros (S, T, N, Q) en verde, residuos alifáticos (A, V, L, I, M) en gris, residuos aromáticos (F, Y, W) en magenta; P y G se colorearon en café y C en amarillo. El número de interacciones de puentes de hidrógeno/no uniones identificado se muestra en paréntesis para los residuos de DPPiV interactuando con el péptido I (6/91) (A), el péptido II (0/52) (B), el péptido III (4/91) (C) y el péptido IV (7/107) de amaranto (D).

columna Superdex Peptide 10/300 GL con un rango de separación de 100 a 7000 Da. Se separaron diferentes digestiones grados de digestión de glutelinas con tripsina y se obtuvieron varios picos cuya distribución de tamaño, de acuerdo a la calibración de la columna, se encontraba entre 140 y 6700 Da (**Figura 10**). El patrón cromatográfico entre las diferentes digestiones era el mismo, solamente variaba la intensidad de los picos de acuerdo al grado de digestión, lo cual muestra la especificidad en el sitio de corte de la tripsina.

Resultados

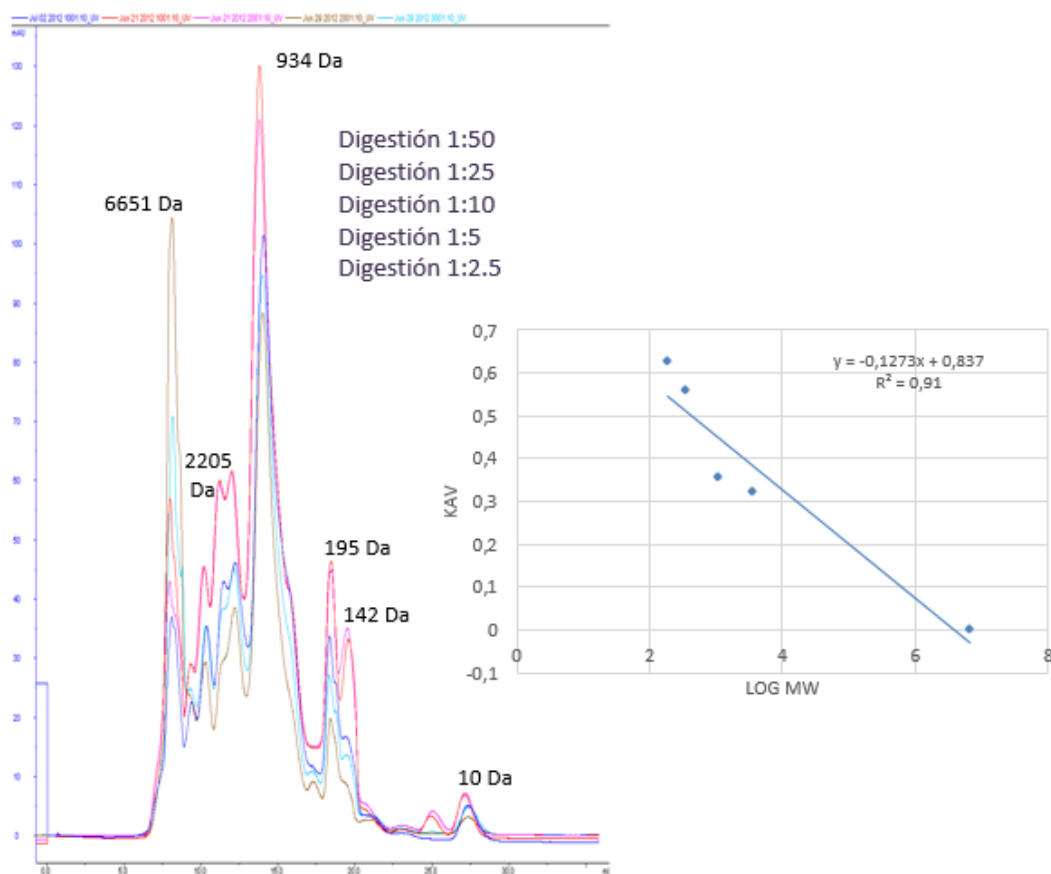


Figura 10. Separación cromatográfica de los péptidos trópticos de las glutelinas de amaranto. Las glutelinas de la semilla de amaranto (5 mg) fueron digeridas con diferentes concentraciones de tripsina y posteriormente separadas de acuerdo a su peso molecular por filtración en gel. Columna: Superdex Peptide 10/300 GL. Flujo 5 mL/min. Absorbancia a 280 nm.

Se colectaron las fracciones de varias corridas cromatográficas cada 0.5 mL y posteriormente se concentraron para los ensayos de actividad sobre la DPPIV. En la **Figura 11A** se puede observar que el patrón de las fracciones obtenidas conserva los mismos picos que la corrida cromatográfica. Particularmente se encontró que hubo dos picos con una fuerte inhibición de la DPPIV (más del 50% de inhibición) que, de acuerdo a la calibración de la columna, tenían un peso aproximado de 300 y 1000 Da (Fracción 27 y 18, respectivamente (**Figura 11B**)).

Resultados

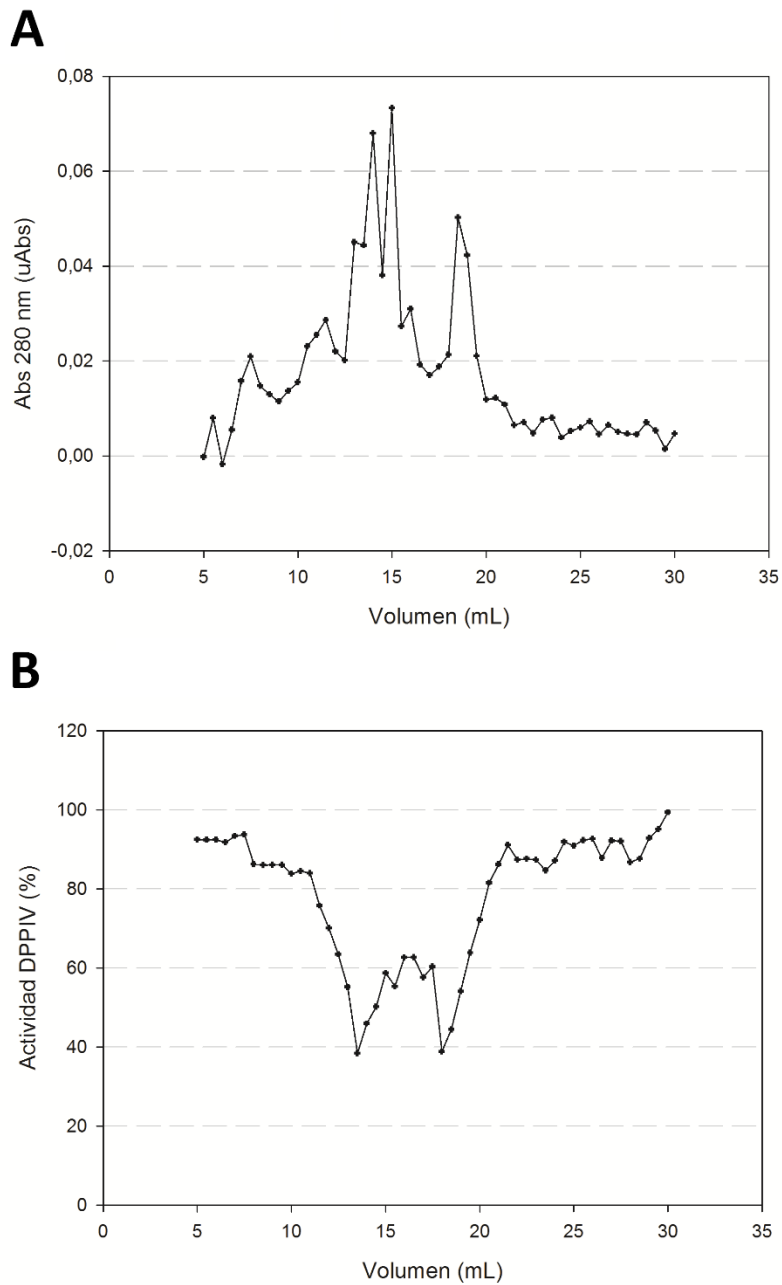


Figura 11. Purificación de los péptidos trípticos de las glutelinas de amaranto. Durante la separación de los péptidos de las glutelinas de filtración molecular se colectaron fracciones cada 0.5 mL (A). Después de varias separaciones las fracciones se concentraron y se su efecto sobre la actividad de DPPIV (B). Concentración de DPPIV: 100 ng/mL, concentración de sustrato: 500 µM.

Resultados

4.6 Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPPIV en líneas celulares

Para tratar de determinar si la inhibición sobre la DPPIV observada por los péptidos de los hidrolizados de amaranto en ensayos con la proteína purificada se conserva en otras condiciones, se montó el ensayo de actividad de esta enzima en dos líneas celulares. Se utilizó la línea Caki-1 para simular el efecto de la DPPIV producida por células de riñón y la línea HUVECC para simular el efecto de la DPPIV producida por las células endoteliales de la vasculatura.

En la **Figura 12** se muestra el efecto de los hidrolizados de amaranto y el diprotin A sobre las células Caki-1. El diprotin A tuvo un comportamiento similar al obtenido con la enzima purificada; sin embargo, observamos que los valores de inhibición fueron menores, logrando un máximo de 60% de inhibición (IC_{50} 16 μ g/mL o 47 μ M). Al probar los hidrolizados de amaranto, la fracción que produjo una mayor inhibición de la DPPIV fue la digestión gastrointestinal de las glutelinas (20% de inhibición máxima), mientras que los hidrolizados con tripsina presentaron un patrón similar sin importar el grado de digestión y cuyos valores fueron menores que los de la digestión gastrointestinal.

. En las células HUVECC, sin embargo, la inhibición producida por el diprotin A y los hidrolizados de amaranto fue nula (**Figura 13**).

4.7 Cambios en parámetros bioquímicos en sangre de animales de laboratorio bajo una suplementación con amaranto

Los cambios en el peso corporal y los niveles de glucosa en sangre de las ratas a lo largo del experimento se muestran en la **Figura 14**. Tanto las ratas normoglucémicas como diabéticas presentaron un incremento gradual en el peso, aunque las ratas normoglucémicas tuvieron mayor peso que las diabéticas y no se observaron diferencias entre las dietas. Los niveles de glucosa en ayuno fueron estables en las

Resultados

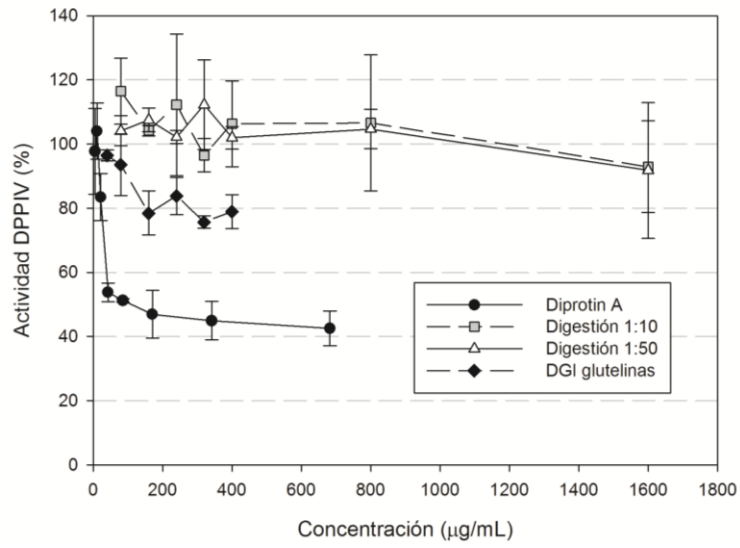


Figura 12. Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPP-IV en la línea celular Caki-1. Las células crecieron hasta confluencia y se expusieron durante 1 h a 37 °C a los péptidos menores a 10 kDa de los hidrolizados de las glutelinas de amaranto. Concentración de sustrato: 500 µM. Promedio ±DE.

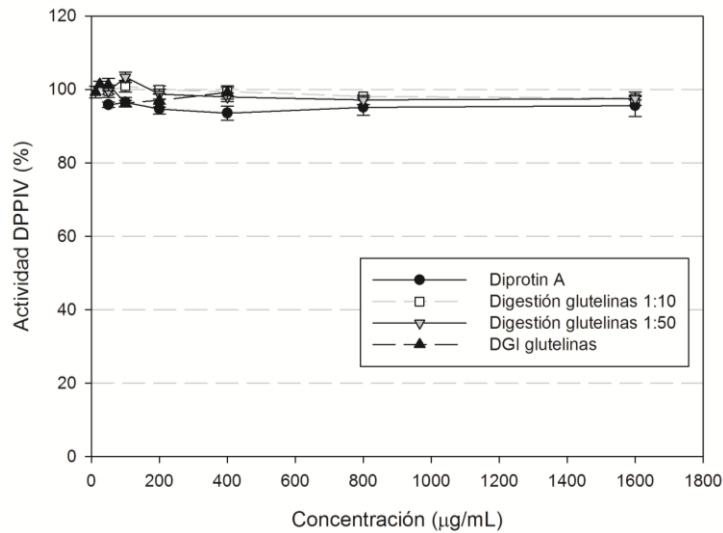


Figura 13. Efecto de los hidrolizados de glutelinas de amaranto sobre la actividad de DPP-IV en la línea celular HUVECC. Las células crecieron hasta confluencia y se expusieron durante 1 h a 37 °C a los péptidos menores a 10 kDa de los hidrolizados de las glutelinas de amaranto. Concentración de sustrato: 500 µM. Promedio ±DE.

Resultados

ratas normoglucémicas (alrededor de 150 mg/dL); por otro lado, las ratas diabéticas presentaron valores muy variables y elevados (de 400 a 500 mg/dL). Los niveles de glucosa reflejan las diferencias en el estado metabólico debido a la inducción de la diabetes, lo que confirma es estado hiperglucémico producido por la estreptozotocina. Debido a que la diabetes no sólo afecta los niveles de glucosa sino que también producen un desbalance en el metabolismo de lípidos debido a la desregulación en el procesamiento de carbohidratos, se realizó un perfil general de lípidos. La **Figura 15** muestra los cambios en los triglicéridos, HDL-c y colesterol total de los grupos experimentales a lo largo del experimento. La **Tabla 6** resume los resultados obtenidos al final del experimento (semana 12). En las ratas normoglucémicas los niveles de triglicéridos se mantuvieron constantes durante el experimento sin diferencias estadísticas entre las dietas. Las ratas diabéticas bajo una suplementación con amaranto mostraron los niveles más altos de triglicéridos y estos fueron estadísticamente mayores que el grupo normoglucémico con dieta control ($P < 0.01$). De manera interesante, en el estado diabético se observó un incremento gradual en HDL-c y a partir de la cuarta semana estas diferencias fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.001$) al compararlas con los grupos normoglucémicos (**Figura 15B, Tabla 6**); además, las ratas diabéticas bajo una suplementación con amaranto tuvieron los niveles más altos de HDL-c ($P < 0.001$). Con respecto al colesterol total (**Figura 15C, Tabla 6**), no hubo diferencias entre las dietas al comparar el mismo estado metabólico, pero se observó que la inducción de la diabetes incrementó los niveles de colesterol ($P < 0.001$) y que la suplementación con amaranto revirtió ligeramente este efecto ($P < 0.05$).

4.8 Cambios en la actividad y expresión de DPPIV en animales de laboratorio bajo una suplementación con amaranto

Previamente en este trabajo se mostró la presencia de péptidos inhibidores de la DPPIV en la proteínas de amaranto; además ya se ha reportado la acción antihipertensiva del amaranto [60], lo cual indica que el consumo de amaranto pudiera tener un potencial

Resultados

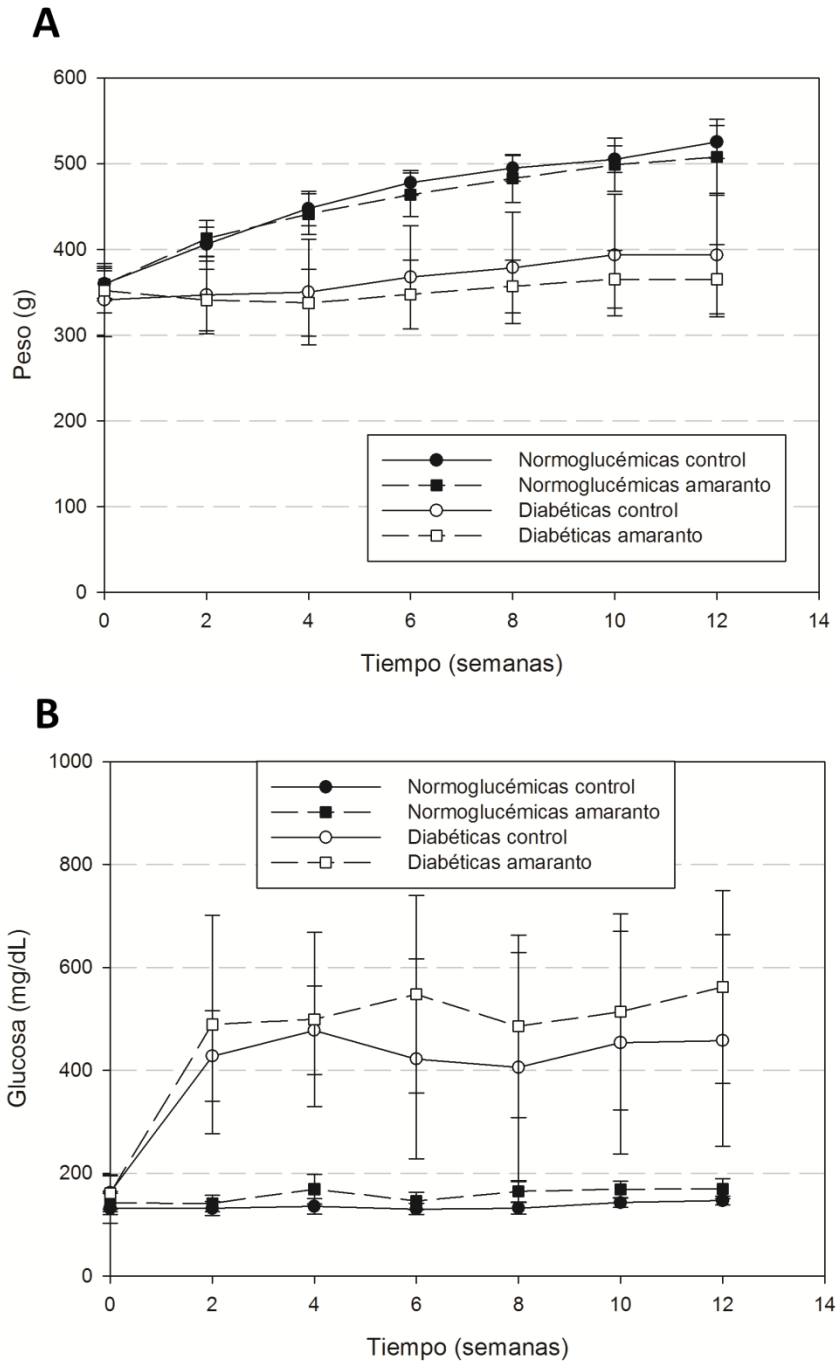


Figura 14. Cambios en el peso y niveles de glucosa de ratas normoglucémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto. La diabetes se generó por una dosis intraperitoneal de estreptozotocina. (A) Los cambios en el peso se registraron por 12 semanas y (B) se determinó la glucosa en ayuno por el método de glucosa oxidasa. Promedio \pm DE.

Resultados

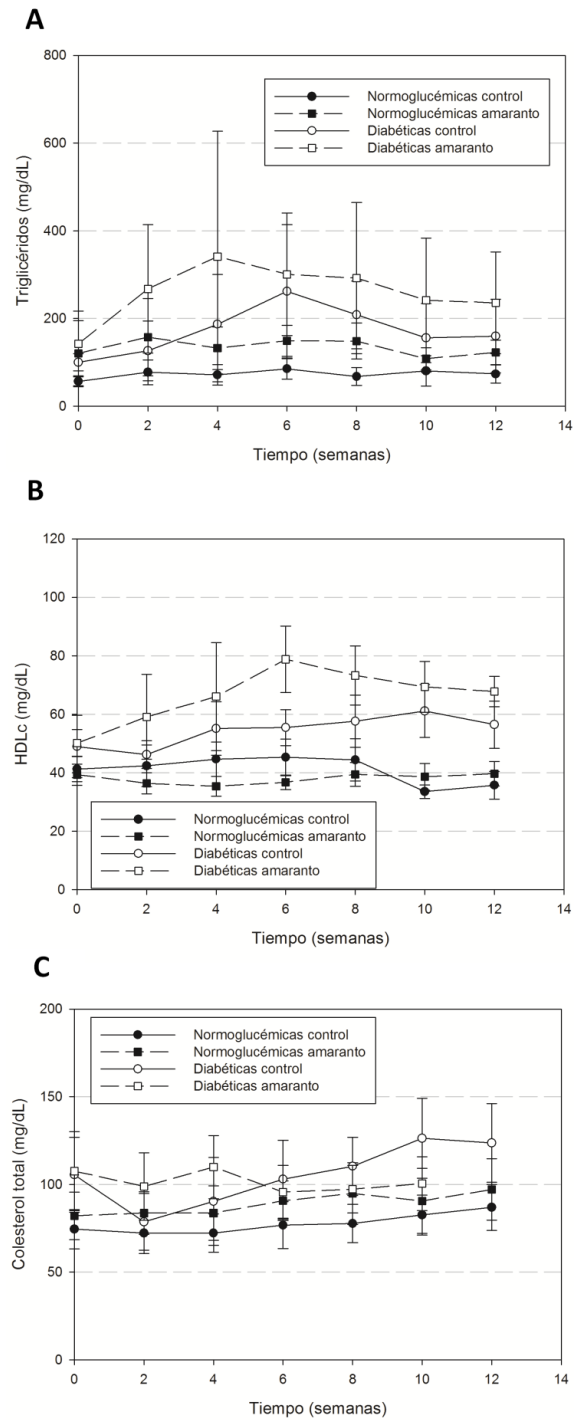


Figura 15. Cambios en el perfil de lípidos de ratas normoglicémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto. (A) Triglicéridos (B) HDL-c (C) Colesterol total. Promedio \pm DE.

Resultados

Tabla 6. Perfil de lípidos de ratas normoglucémicas y diabéticas bajo una dieta control o suplementación con amaranto al final del experimento

	NC	NA	DC	DA
Triglicéridos (mg/dL)*	73.4±20.4 ^a	122.7±27.8 ^{ab}	159.83±84.1 ^{ab}	235.66±116.0 ^b
HDLc (mg/dL)*	35.7±4.8 ^a	39.6±4.2 ^a	56.4±8.0 ^b	67.7±5.2 ^c
Colesterol total (mg/dL)*	86.9±13.1 ^a	97.1±17.6 ^a	123.6±22.4 ^b	107.0±15.0 ^{ab}

NC: Normoglucémicas control, NA: Normoglucémicas amaranto, DC: Diabéticas control, DA: Diabéticas amaranto. *Valores con diferente letra indicant diferencias estadísticas. Promedio ±DE.

efecto benéfico para la salud. En este trabajo se determinó la actividad de DPPIV en plasma de ratas para establecer el efecto *in vivo* de los péptidos inhibidores del amaranto. La **Figura 16A** muestra la actividad de la DPPIV en plasma en ayuno en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre dietas en las ratas normoglucémicas; sin embargo, las ratas diabéticas con una dieta control presentaron un incremento en la actividad de DPPIV a partir de la semana 10 ($P<0.001$); estas diferencias no se observaron en el grupo diabético suplementado con amaranto. Esta tendencia también se observo en la toma postprandial ($P<0.001$) (**Figura 16B**). El hecho de que estos resultados son consistentes tanto en ayuno como después del consumo de alimentos podrían confirmar la acción de los péptidos inhibitorios de la DPPIV encriptados en las proteínas del amaranto que son liberados después de la digestión gastrointestinal.

La DPPIV es una enzima ubicua con una amplia variedad de sustratos y se expresa en varios tejidos, principalmente en el riñón donde ayuda a la depuración de diferentes compuestos [35]. Se extrajeron las proteínas de membrana de riñón de los grupos experimentales y se determinó la actividad y niveles de transcrito de DPPIV (**Figura 17**). La actividad de DPPIV en riñón fue diferente a la observada en plasma. Aunque hay una ligera tendencia de una mayor actividad enzimática en las ratas diabéticas, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (**Figura 17A**). Por otro lado, como se muestra en la **Figura 17B**, la suplementación con amaranto en las ratas normoglucémicas indujo una regulación negativa en el transcrito de DPPIV

Resultados

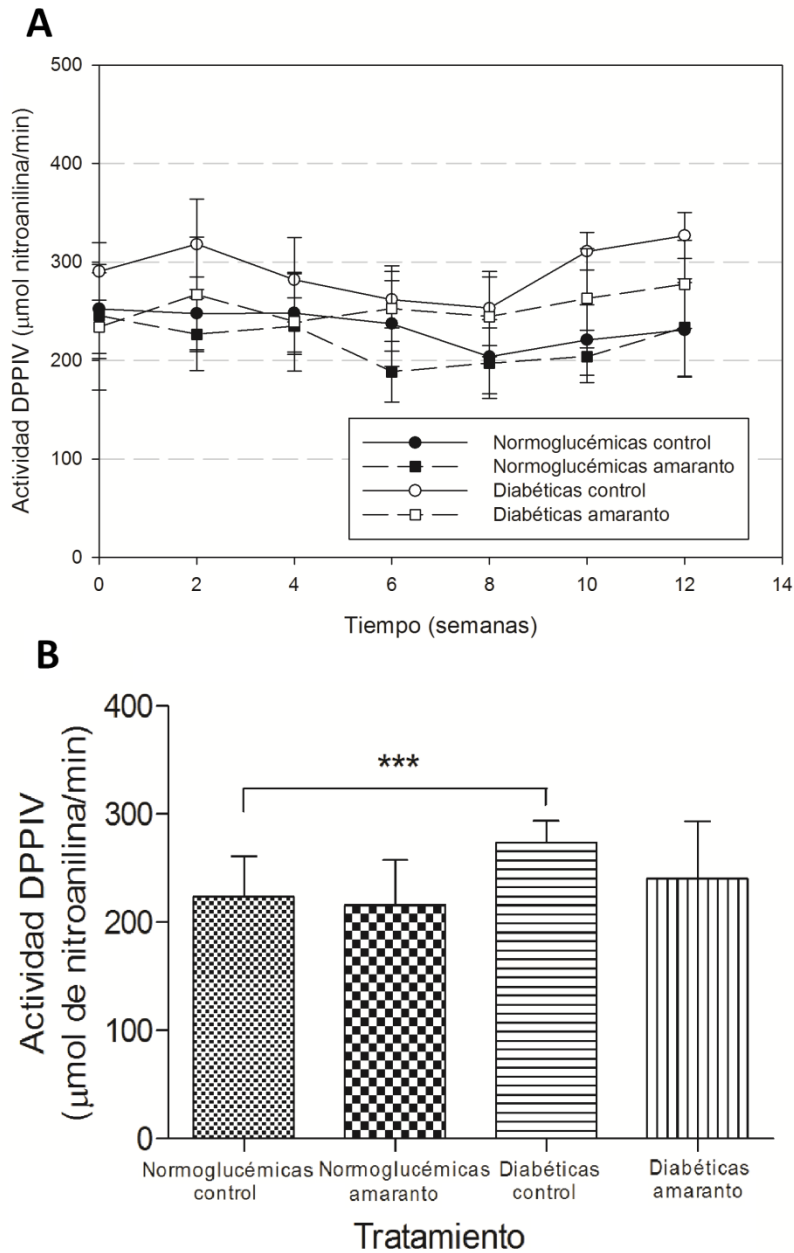


Figura 16. Cambios en la actividad de DPPIV en plasma de rata (A) Actividad de DPPIV en ayunas a lo largo del experimento (B) Actividad de DPPIV 1 h después de haber ingerido alimentos en la semana 11 del experimento. Reacción 1 h a 37 °C. Concentración de sustrato: 500 μM . Promedio \pm DE.

Resultados

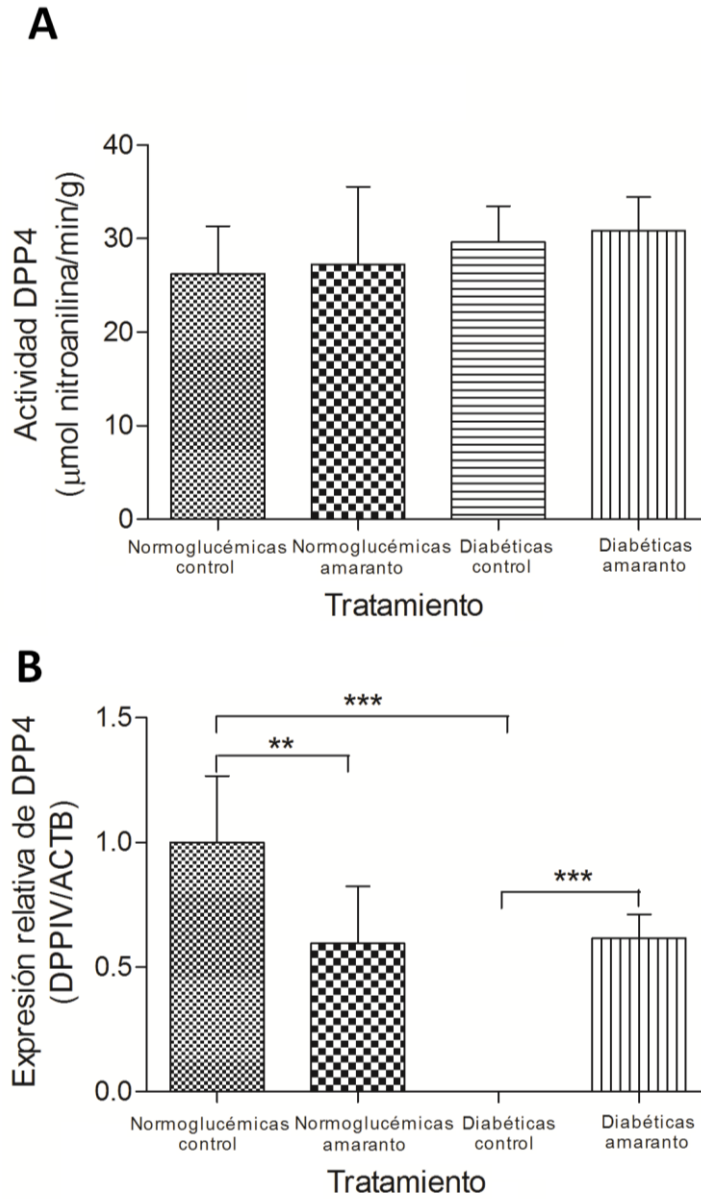


Figura 17. Cambios en DPPIV en riñón (A) Actividad de DPPIV de homogenado de riñón. Reacción: 1 h a 37 °C. Concentración de sustrato: 500 µM (B) Expresión de transcrito de DPPIV por RT-PCR. Se utilizaron 1.5 µg de ARN para la transcripción reversa. Se usó el transcrito de la β-actina como control de carga. Promedio ±DE.

($P < 0.01$). Entre los grupos diabéticos no se detectó transcrito en el grupo con dieta control y en, mientras que los niveles de transcrito en el grupo suplementado con

Resultados

amaranto fueron similares a los grupos normoglucémicos. Las diferencias entre los grupos con dieta control fueron drásticos (**Figura 17B**), ya que el grupo normoglucémico con dieta control mostró los mayores niveles de transcrito ($P < 0.001$).

4.9 Análisis proteómico

La sangre es uno de los tejidos más dinámicos y mantiene una conexión y comunicación entre los órganos y ayuda a mantener la homeostasis del cuerpo. Para establecer los cambios que produce una dieta suplementada con amaranto en dos estados metabólicos diferentes se realizó un análisis proteómico del plasma de las ratas. Uno de los principales retos al trabajar con las proteínas de la sangre es la presencia de proteínas altamente abundantes que enmascaran otras proteínas presentes en menor concentración pero que siguen siendo importantes como biomarcadores en una condición particular [82]; es por esto que el plasma fue fraccionado para obtener las proteínas abundantes y las poco abundantes. Se realizó el análisis proteómico de ambas fracciones y se detectaron las proteínas diferenciales entre los grupos experimentales.

Se utilizaron tres comparaciones estadísticas para establecer los cambios diferenciales en los spots de proteínas: el efecto de la inducción de la diabetes (NC vs. DC), el efecto de la suplementación de amaranto en los especímenes sanos (NC vs. NA) y el efecto de la suplementación con amaranto en los especímenes diabéticos (DC vs. DA). Los mapas 2D representativos de las proteínas abundantes y poco abundantes del plasma se muestran en la **Figura 18**. Se detectaron 141 spots en los geles de las proteínas poco abundantes y 150 spots en los geles de las proteínas abundantes. Del número total de spots de proteína, 37 de estos se acumularon diferencialmente, 8 spots en las proteínas poco abundantes y 29 en las proteínas abundantes. Las proteínas identificadas se enlistan en la **Tabla 7** (información detallada de los spots de proteínas de las proteínas poco abundantes y abundantes se muestran en la **Tabla 8** y **Tabla 9**, respectivamente). La inducción de la diabetes fue la condición que produjo más

Resultados

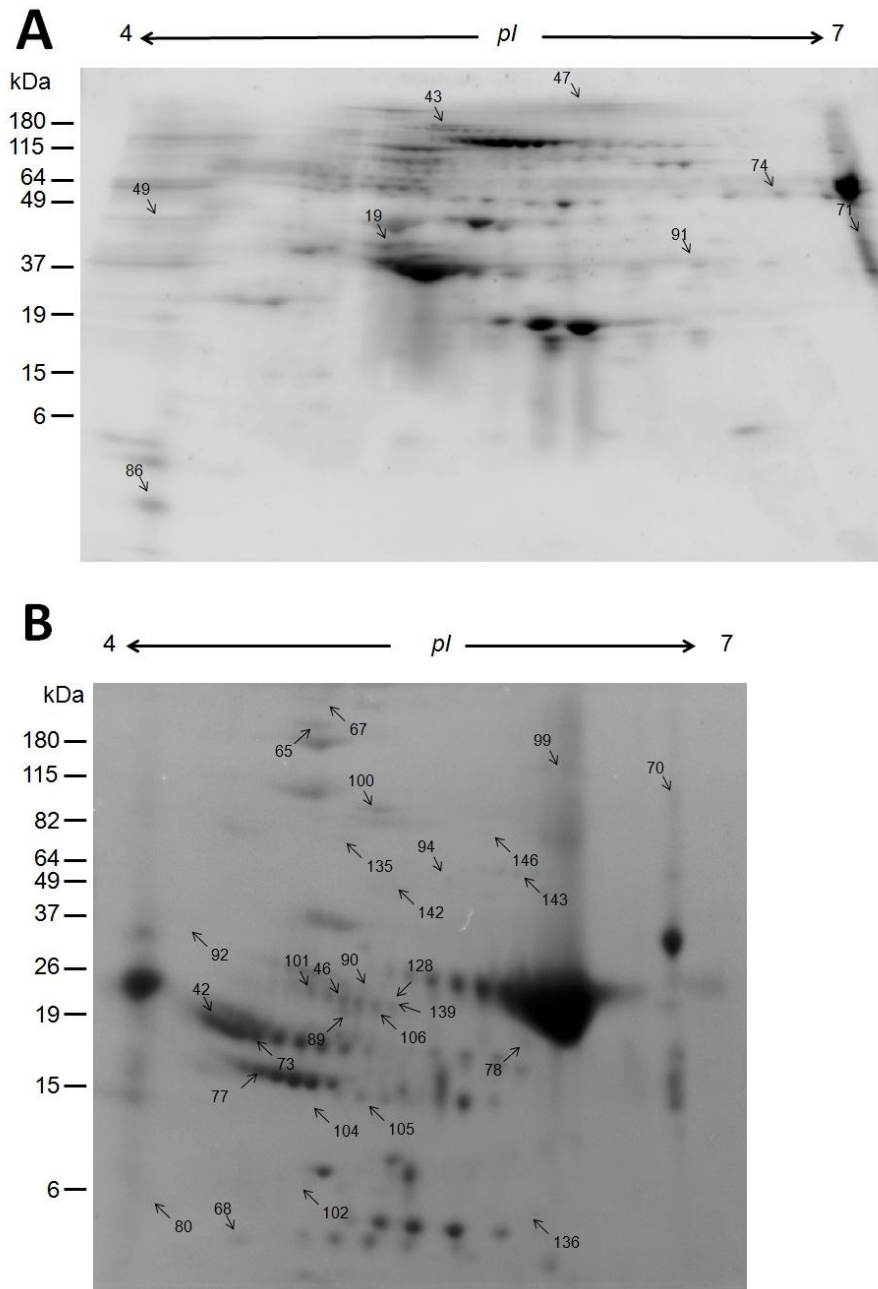


Figura 18. Electroforesis 2D de las proteínas de plasma de rata (A) Fracción de proteínas poco abundantes. Las proteínas de plasma se separaron por IEF con tiras de 7 cm (pH 4-7) seguido de una SDS-PAGE de 8-16%. Los geles fueron teñidos con Sypro Ruby (B) Fracción de proteínas abundantes. Las proteínas de plasma se separaron por IEF con tiras de 11 cm (pH 4-7) seguido de una SDS-PAGE al 8%. Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal. Los spots de proteína que se acumularon diferencialmente se marcan con flechas.

Resultados

cambios debido a la alteración metabólica y el daño producido por la administración de la estreptozotocina.

De los 37 spots que se acumularon diferencialmente, se pudieron identificar 29 proteínas exitosamente y se clasificaron de acuerdo a su proceso biológico de acuerdo a Gene Ontology (**Figura 19A**). La mayoría de las proteínas se agruparon como reguladores negativos de la actividad de peptidasa (12 proteínas) y en el proceso de metabolismo de lípidos (4 proteínas). Varias proteínas se identificaron en más de un spot y en algunos spots se detectaron más de una proteína.

Se observó una disminución en la acumulación del inhibidor de la proteasa de plasma C1 (spot 93 proteínas abundantes), la subunidad 2 de la carboxipeptidasa N (spot 92 de las proteínas abundantes), la fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano (spot 100 proteínas abundantes) y la cadena pesada H3 del inhibidor inter-alfa-tripsina por la inducción de la diabetes. La diabetes también indujo la disminución en la acumulación en la fracción de proteínas abundantes de dos proteínas responsables de la activación del complemento, complemento C3 (spots 89 y 135) y complemento C4 (spot 104) y el factor de complemento B (spot 143). Se identificaron varias proteínas de la superfamilia serpin (serine protease inhibitor) en las proteínas abundantes (spots 42, 68, 73, 77, 80, 102, 104 y 105), los cuales estuvieron principalmente disminuidos en las ratas diabéticas pero aumentados en las ratas bajo una suplementación con amaranto en ambas condiciones metabólicas. El mismo comportamiento se observó en los tres componentes del fibrinógeno, que se encontraron tanto en las proteínas poco abundantes (spots 19, 43, 47, 71 y 91) como en las proteínas abundantes (spot 94).

De manera interesante se identificaron en el spot 46 de las proteínas abundantes la murinoglobulina 1, el T-kininógeno 1 y el inhibidor 3 alfa-1; este spot estuvo ausente en las ratas diabéticas bajo una suplementación con amaranto pero estas proteínas aparecieron en los spots 102 y 106 en este grupo. Esto podría indicar cambios postraduccionales o la presencia de isoformas de estas proteínas.

Resultados

Tabla 7. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS

Proteína	No. de acceso ^a	Gene ID ^a	Spot ^b	kDa/pi Exp ^c	kDa/pi Teórico ^d	Mascot score ^e	PM/% C ^f	Relación de cambio ^g			
								NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	
Regulación negativa de actividad de peptidasa											
Precursor de la cadena pesada H3 del inhibidor inter-alfa-tripsina	gi 8393899	50693	100 (H)	90,25/5,33	99,38/5,85	58	2/2	-	↓	-	
Precursor de la cadena pesada H4 del inhibidor inter-alfa	gi 126722991	54404	100 (H)	90,25/5,33	103,86/5,82	633	14/18	-	↓	-	
			43 (L)	180,00/5,47		111	5/6	↓	-	-	
Precursor de serpin A3K	gi 266407	24794	42 (H)	18,66/4,43	46,76/5,31	539	8/26	-	-	-	
			73 (H)	17,83/4,66		161	8/21	↑	-	↑	
			80 (H)	5,57/4,08		139	4/11	-	↑	-	
			68 (H)	7,87/4,56		69	2/5	-	↓	-	
			77 (H)	15,83/4,66		44	2/6	-2,107	-	2,0622	-
Precursor de serpin A3L	gi 2507387	299282	42 (H)	18,66/4,43	46,42/5,48	442	9/24	-	-	-	
			80 (H)	5,57/4,08		170	4/11	-	↑	-	
			73 (H)	17,83/4,66		113	5/14	↑	-	↑	
			68 (H)	7,87/4,56		75	2/5	-	↓	-	
			77 (H)	15,83/4,66		44	2/6	-2,107	-	2,0622	-
Precursor de serpin A3M	gi 401664566	299276	77 (H)	15,83/4,65	46,92/5,46	139	4/11	-2,107	-	2,0622	
Precursor de serpin A3N	gi 2507388	24795	102 (H)	6,00/4,93	46,79/5,33	150	5/14	-	-	↑	
			77 (H)	15,83/4,66		133	3/8	-2,107	-	2,0622	-
			104 (H)	13,41/4,96		53	2/5	-	-	↑	
Precursor del inhibidor de la proteasa C1 de plasma	gi 40018558	295703	92 (H)	34,50/4,26	55,80/5,54	363	9/19	-	↓	-	
Precursor de la glicoproteína alfa-2-HS	gi 6978477	25373	73 (H)	17,83/4,66	38,78/6,30	115	4/16	↑	-	↑	

Resultados

Tabla 7. Continuación.

Proteína	No. de acceso ^a	Gene ID ^a	Spot ^b	kDa/pl Exp ^c	kDa/pl Teórico ^d	Mascot score ^e	PM/% C ^f	Relación de cambio ^g			
								NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	
Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794	101 (H)	23,2/4,96	166,59/5,68	108	6/5	-	↓	-	
			102 (H)	6,00/4,93		85	6/5	-	-	↑	
			106 (H)	20,86/5,33		84	3/2	-	-	↑	
			90 (H)	23,37/5,25		73	3/3	-	↓	-	
			135 (H)	72,30/5,13		61	4/3	↓	-	-	
			65(H)	212,50/4,99		54	3/2	-	-	2,7027	-
			68 (H)	7,87/4,56		42	4/2	-	↓	-	
			46 (H)	21,80/5,15	37	3/2	-	-	2,1464	↓	
Precursor de la murinoglobulina 2	gi 50647404	408236	65 (H)	212,50/4,99	162,85/6,15	56	3/2	-	-	2,7027	-
			105 (H)	13,94/5,29		45	3/3	-	-	↑	
			90 (H)	23,37/5,25		39	3/3	-	↓	-	
Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903	90 (H)	23,37/5,25	48,82/6,29	111	5/16	-	↓	-	
			128 (H)	21,80/5,41		110	5/13	↑	-	-	
			106 (H)	20,86/5,33		66	6/16	-	-	↑	
			46 (H)	21,80/5,15		63	4/11	-	-	2,1464	↓
			101 (H)	23,2/4,96		31	2/5	-	↓	-	
Precursor de la macroglobulina alfa-1	gi 307746876	252922	146 (H)	75,07/5,94	168,38/6,46	194	8/6	-	↓	-	
			136 (H)	4,92/6,16		164	5/4	↓	-	-	
Precursor de la antiproteinasa alfa-1	gi 51036655	24648	77 (H)	15,83/4,66	46,26/5,70	375	9/33	-2,107	-	2,0622	-
			105 (H)	13,94/5,29		168	6/16	-	-	↑	
			104 (H)	13,41/4,96		147	7/16	-	-	↑	

Resultados

Tabla 7. Continuación.

Proteína	No. de acceso ^a	Gene ID ^a	Spot ^b	kDa/pl Exp ^c	kDa/pl Teórico ^d	Mascot score ^e	PM/% C ^f	Relación de cambio ^g			
								NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	
Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568	101 (H)	23,20/4,96		361	8/6	-	↓	-	
			102 (H)	6,00/4,93		136	5/3	-	-	↑	
			142 (H)	47,80/5,39		90	3/2	↓	↓	-	
			46 (H)	21,80/5,15	165,04/5,70	75	3/2	-	-	2,1464	↓
			90 (H)	23,37/5,25		73	2/2	-	↓	-	
			104 (H)	13,41/4,96		54	3/2	-	-	-	↑
			105 (H)	13,94/5,29		45	3/3	-	-	-	↑
Metabolismo de lípidos											
Precursor de apolipoproteína E	gi 162287337	25728	19 (L)	40,00/5,1	35,78/5,23	63	9/28	-	-	-	
			43 (L)	180,00/5,47		36	2/5	↓	-	5,2192	
Preproteína de apolipoproteína A-II	gi 6978517	25649	86 (L)	3,97/4,14	11,49/6,23	40	2/19	-	-	↑	
Precursor de la glicoproteína 1 beta-2 (Apo H)	gi 57528174	287774	78 (H)	17,50/6,13	39,74/8,58	25	2/5	↓	-	-	
Precursor de la paraoxonasa/arilesterasa 1	gi 54292130	84024	49 (L)	45,40/4,17	39,56/5,06	26	2/5	-	-	↑	
Activación de complemento											
Precursor del factor B del complemento	gi 218156285	294257	143 (H)	52,75/6,11	86,66/6,57	94	8/11	-	↓	-	
Precursor de C3 del complemento	gi 158138561	24232	89 (H)	19,00/5,13	187,75/6,06	404	6/6	-	↓	-	
			135 (H)	72,30/5,13		43	5/3	↓	-	-	
Precursor de C4 del complemento	gi 29337194	24233	104 (H)	13,41/4,96	193,64/6,99	148	3/3	-	-	↑	
Coagulación sanguínea											
Precursor de la isoforma 1 de la cadena alfa del fibrinógeno	gi 56797757	361969	71 (L)	40,60/7,14		169	9/15	-	↓	-	
			91 (L)	37,00/6,35	87,37/5,52	140	6/8	-	-	↑	
			74 (L)	49,00/6,69		63	5/6	10,3017	-	-	

Resultados

Tabla 7. Continuación.

Proteína	No. de acceso ^a	Gene ID ^a	Spot ^b	kDa/pl Exp ^c	kDa/pl Teórico ^d	Mas cot score ^e	PM/% C ^f	Relación de cambio ^g		
								NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA
Precursor de la isoforma 2 de la cadena alfa del fibrinógeno	gi 144922622	361969	71 (L)	40,60/7,15	60,98/7,11	169	9/22	-	↓	-
			91 (L)	37,00/6,35		140	6/11	-	-	↑
			74 (L)	49,00/6,69		63	5/9	10,3017	-	-
Precursor de la cadena beta del fibrinógeno	gi 158186678	24366	91 (L)	37,00/6,35	54,83/7,90	124	7/15	-	-	↑
			71 (L)	40,60/7,14		89	6/21	-	↓	-
			74 (L)	49,00/6,69		63	5/12	10,3017	-	-
Precursor de la cadena gama del fibrinógeno	gi 61098186	24367	94 (H)	54,62/5,66	50,24/5,85	149	6/19	-	↓	-
			47 (L)	220,60/5,90		112	4/13	-	↓	↑
			43(L)	180,00/5,47		75	2/7	↓	-	-
			19 (L)	40,00/5,1		42	2/5	-	-	-
Homeostasis del hierro										
Precursor de la isoforma 1 de la ceruloplasmina	gi 401461786	24268	43 (L)	180,00/5,47	121,39/5,39	42	4/5	↓	-	-
Precursor de la isoforma 2 de la ceruloplasmina	gi 401461788	24268	44 (L)	180,00/5,48	124,39/5,42	42	4/5	↓	-	-
Precursor de la serotransferrina	gi 61556986	24825	70 (H)	98,50/6,94	78,51/7,14	126	9/13	-	↓	-
Regulador de actividad catalítica										
Precursor de la subunidad 2 de la carboxipeptidasa N	gi 157819231	303861	92 (H)	34,50/4,26	63,36/5,94	66	4/7	-	↓	-
Proceso metabólico de la vitamina D										
Precursor de la proteína de unión a vitamina D	gi 401709952	24384	139 (H)	20,86/5,41	55,08/5,65	203	10/19	↓	↓	-

Resultados

Tabla 7. Continuación.

Proteína	No. de acceso ^a	Gene ID ^a	Spot ^b	kDa/pl Exp ^c	kDa/pl Teórico ^d	Mascot score ^e	PM/% C ^f	Relación de cambio ^g		
								NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA
Transporte										
Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	99 (H)	125,83/6,33	70,71/6,09	244	9/18	-	↓	-
			143 (H)	52,75/6,11		232	4/8	-	↓	-
			128 (H)	21,80/5,41		228	6/11	↑	-	-
			136 (H)	4,92/6,16		182	6/13	↓	-	-
			78 (H)	17,50/6,13		178	8/15	↓	-	-
			90 (H)	23,37/5,25		178	5/10	-	↓	-
			146 (H)	75,07/5,94		130	4/7	-	↓	-
			101 (H)	23,2/4,96		91	5/10	-	↓	-
			89 (H)	19,00/5,13		74	3/6	-	↓	-
67 (H)	261,25/5,00	52	2/4	-	-	↓				
Otros										
Precursor de la fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano	gi 213688382	291132	100 (H)	90,25/5,33	94,18/6,21	59	7/8	-	↓	-

Para información detallada ver la **Tabla 7** y **8**.^a De acuerdo al a base de datos de NCBI, ^bNo. de spot de proteína como se indica en la **Figura 18** (L) Proteínas poco abundantes (H) Proteínas abundantes, ^cMasa experimental (kDa) y *pl* de los spots de proteína identificados, ^dMasa teórica (kDa) y *pl* de las proteína identificadas en la base de datos no redundante de NCBI, ^eScore de MASCOT reportado después de la búsqueda en las bases de datos. Scores de iones individuales >25 son estadísticamente significativos ($P < 0.01$), ^fNo. de péptidos que hicieron match y porcentaje de cobertura de la proteína, ^gLa relación de cambio esta expresada como el radio del % del volumen y cada valor representa el promedio de tres mediciones independientes. Para algunos spots de proteína la relación de cambio no se pudo calcular debido a que la proteína estaba ausente en el spot; esto está marcado como ↑ y ↓, indicando la presencia o ausencia del spot respectivamente, NC: Grupo normoglucémico con dieta control, NA: Grupo normoglucémico con suplementación de amaranto, DC: Grupo diabético con dieta control, DA: Grupo diabético con suplementación de amaranto.

Resultados

Tabla 8. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS (Proteínas poco abundantes)

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	
19	Precursor de la apolipoproteína E	gi 162287337	25728	40.00/5.1	35.788/5.23	63	9/28	RFWDYLRW RLGADMEDLRN RLQAEIFQARI RGRLEEVGNQARD RSKMEEQTQQIRL RTANLGAGAAQPLRDRA KGWFEPLVEDMQRQ RNEVNTMLGQSTEELRS RIKGWFEPLVEDMQRQ	-	-	-5.2192	
	Precursor de la cadena gama del fibrinógeno	gi 61098186	24367		50.247/5.85	42	2/5	RYLQDIYTSNKQ KYEALLLTHESSIRY				
43	Precursor de la cadena pesada H4 del inhibidor inter-alfa	gi 126722991	54404	180.00/5.47	103.862/5.82	111	5/6	KTLFSLVPLGLKM RVLGIDYPATRE KAVLSAVELLDKS KLRDQGPVLLAKV RADTVQEATFQVELPRK	↓	-	-	
	Precursor de la cadena gama del fibrinógeno	gi 61098186	24367		50.247/5.85	75	2/7	RTSTADYAMFRV KAIQVYYNPDQPPKPGMIEGATQKS				
	Precursor de la isoforma 1 de la ceruloplasmina Precursor de la isoforma 2 de la ceruloplasmina	gi 401461786 gi 401461788	24268 24268		121.387/5.39 124.393/5.42	42 42	4/5 4/5	RDTANLFPHKS KGQFPLSIQPMGVRF KALYSEYTDGTFTKT RMFTTAPENVDKEDDFQESNKM				
	Precursor de la apolipoproteína E	gi 162287337	25728		35.788/5.23	36	2/5	RLGPLVEQGRQ RLQAEIFQARI				
47	Precursor de la cadena gama del fibrinógeno	gi 61098186	24367	220.60/5.90	50.247/5.85	112	4/13	RTSTADYAMFRV KESGLYFIRPLKA KYEALLLTHESSIRY KAIQVYYNPDQPPKPGMIEGATQKS	-	↓	↑	
49	Precursor de la paraoxonasa/ariesterasa 1 de suero	gi 54292130	84024	45.40/4.17	39.561/5.06	26	2/5	KILLMDLNEKE RIQSILSEDPKV	-	-	↑	

Resultados

Tabla 8. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C ^e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
71	Precursor de la isoforma 1 de la cadena alfa del fibrinógeno Precursor de la isoforma 2 de la cadena alfa del fibrinógeno	gi 56797757 gi 144922622	361969 361969	40.60/7.14	87.37/5.52 60.98/7.11	169	9/15 9/22	KNSLDFQKN KRLEVDIDIKI KSQLQEGPPEWKA KMSPVPDLVPGSFKS RMHPELGSFYDSRF KGLIDEANQDFTNRI RGDFANANNFDNTFGQVSEDLRRR KTSDSDFITDIENPSSHVPEFSSSSKT	-	↓	-				
	Precursor de la cadena beta del fibrinógeno	gi 158186678	24366		54.82/7.90	89	6/21	RQDGSVDFGRK KEDGGGWYINRC RIGPTELLIEMEDWKGDKV RKEEPPSLRPAPPISGGGYRA KGETSEMYLIQPDTSKPYRV RTMTIHNGMFFSTYDRDNDGWVTTDP RK							
74	Precursor de la isoforma 1 de la cadena alfa del fibrinógeno Precursor de la isoforma 2 de la cadena alfa del fibrinógeno Precursor de la cadena beta del fibrinógeno	gi 56797757 gi 144922622 gi 158186678	361969 361969 24366	49.00/6.69	87.34/5.52 60.98/7.11 54.82/7.90	63 63 33	5/6 5/9 5/12	KNSLDFQKN RFGSLTSNFKE KDVRDQLIDMKR KMSPVPDLVPGSFKS KGLIDEANQDFTNRI	10,301 7	-	-				
86	Preproteína de la apolipoproteína A-II	gi 6978517	25649	3.97/4.14	11.48/6.23	40	2/19	KAYFQNAQERL RTGTNLMDFLSRL	-	-	↑				
91	Precursor de la isoforma 1 de la cadena alfa del fibrinógeno Precursor de la isoforma 2 de la cadena alfa del fibrinógeno	gi 56797757 gi 144922622	361969 361969	37.00/6.35	87.34/5.52 60.98/7.11	140 140	6/8 6/11	KNSLDFQKN RFGSLTSNFKE KAQQIQVLQKD KMSPVPDLVPGSFKS RMHPELGSFYDSRF KGLIDEANQDFTNRI	-	-	↑				
	Precursor de la cadena beta del fibrinógeno	gi 158186678	24366		54.82/7.90	124	7/15	KIRPVFPQQ KGFGNIATNEDTKK RQTLNHERPIKN KTENGGWTVIQNRQ KGFGNIATNEDTKKY KAHYGGFTVQTEANKY RIGPTELLIEMEDWKG							

^aNo. de spot de acuerdo al indicado en la **Figura 18**, ^bMasa experimental (kDa) y *pl* de los spots de proteína identificados, ^cMasa teórica (kDa) y *pl* de las proteínas identificadas en la base de datos no redundante de NCBI, ^dScore de MASCOT reportado después de la búsqueda en las bases de datos. Scores de iones individuales >25 son estadísticamente significativos ($P < 0.01$), ^eNo. de péptidos que hicieron match y porcentaje de cobertura de la proteína, ^fLa relación de cambio está expresada

Resultados

como el ratio del % del volumen y cada valor representa el promedio de tres mediciones independientes. change is expressed as a ratio of the vol% and each value represents the mean value of three independent measurements. Para algunos spots de proteína la relación de cambio no se pudo calcular debido a que la proteína estaba ausente en el spot; esto está marcado como ↑ y ↓, indicando la presencia o ausencia del spot respectivamente, NC: Grupo normoglucémico con dieta control, NA: Grupo normoglucémico con suplementación de amaranto, DC: Grupo diabético con dieta control, DA: Grupo diabético con suplementación de amaranto.

Resultados

Tabla 9. Proteínas diferenciales detectadas por LC-MS/MS (Proteínas abundantes).

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	
42	Precursor de serpin A3K	gi 266407	24794	18.66/4.43	46.76/5.31	539	8/26	RKIFSQQADLSRI KIAELFSELDERT KEQPILSEFQEK KDSTMEEILEGLKF RTSMVLVNYLLFKG RALYQAEAFVADFKQ KMQQVESSLQPETLKKW KAVLDVDETGTGEGAAATAVTAALKS	-	-	-2.5367	
	Precursor de serpin A3L	gi 2507387	299282		46.42/5.48	442	9/24	KEVLPELGIKK KVFSQQADLSRI KFSISTDYSLKE KDLYVSQVVHKA KIAELFSDLEERT KEQPILSEFQEK KDSTMEEILEGLKF RTSMVLVNYLLFKG KMQQVESSLQPETLKKW				
46	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568	21.80/5.15	165.04/5.70	75	3/2	KMLSGFIPLKPTVKK KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR	-	-2.1463	↓	
	Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903		48.82/6.29	63	4/11	KHHLFALRE KDGAETLYSFKY RAGPAPDHQAEASTVTS KYNAELESNGQFVLYRV				
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	37	3/2	KMLSGFIPLKPTVKK KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR				
65	Precursor de la murinoglobulina 2	gi 50657404	408236	212.50/4.99	162.85/6.15	56	3/2	KVLIVEPEGIKK RDTEELTYSVPYGRE KALMAYAFALAGNQEKR	-	-2.7027	-	
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	54	3/2	KVLIVEPEGIKK RDTEELTYSVPYGRE KALMAYAFAYALAGNQEKR				
67	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	261.25/5.00	70.71/6.09	52	2/4	KAPQVSTPTLVEAARN KLGEYGFQNAVLRVY	-	-	↓	

Resultados

Tabla 9. Continuación.

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
68	Precursor de serpin A3L	gi 2507387	299282	7.87/4.56	46.42/5.48	75	2/5	KIAELFSDLEERT KEQPILSEFQEKT	-	↓	-				
	Precursor de serpin A3K	gi 266407	24794		46.76/5.31	69	2/5	KIAELFSELDERT KEQPILSEFQEKT							
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	42	4/2	KVLIVEPEGIKK KVLIVEPEGIKKE RDMGLTAFTNLKI KMLSGFIPLKPTVKK							
70	Precursor de la serotransferrina	gi 61556986	24825	98.50/6.94	78.51/7.14	126	9/13	RTVLPADGPRRL RIPSHAVVARN RDGGGDVAFVKH KDLLFRDDTKC KDFQLFGSPLGKD KHTTIFEVLPQKA KASDSSINWNNLKG RLYLGHYSYVTAIRN RTAGWNIPMGLLFSRI	-	↓	-				
73	Precursor de serpin A3K	gi 266407	24794	17.83/4.66	46.76/5.31	161	8/21	KDSLRPRI RDTLPHEDQGKG RKIFSQQADLSRI KIAELFSDLERT KDSTMEEILEGLKF RTSMVLVNYLLFKG RALYQAEAFVADFKQ KMQQVESSLQPETLKKW	↑	-	↑				
	Precursor de la glicoproteína alfa-2-HS	gi 6978477	25373		38.78/6.30	115	4/16	KATLIHRL RLGGEEVSVACKL KVGQPGDAGAAGPVAPLCPGRV RHAFSPVASVESASGEVLHSPKV							
	Precursor de serpin A3L	gi 2507387	299282		46.42/5.48	113	5/14	KFSISTDYSLKE KKVFSQQADLSRI KDSTMEEILEGLKF RTSMVLVNYLLFKG KMQQVESSQPETLKKW							

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pi ^c	Mascot score ^d	PM/%C ^e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
77	Precursor de la antiproteínasa alfa-1	gi 51036655	24648	15.83/4.66	46.26/5.70	375	9/33	KLSISGTYNLKT KRPFNPEHTRD KMQHLEQTLTKD KISSNLADFAFSLYRE RKISSNLADFAFSLYRE RGTEAAGATVVEAVPMSLPPQVKF KNNYHSEAFSVNFADSEEAKKV KFDHPFIFMIVESETQSPLFVGKV KAFHLLQLNRPDSELQLNTGNGLF VNN	-2.1070	-2.0622	-				
	Precursor de serpin A3M	gi 401664566	299276		46.92/5.46	139	4/11	RDVFSQQADLSRI KGNTLEEILEVLRP RTSMVLVNYLLFRG RMQQVEASLQPETLKK							
	Precursor de serpin A3K	gi 2507388	24795		46.79/5.33	133	3/8	KKLINDYVSKQ KGNSMEEILEGLKF RDEIQISTGNALFIEKR							
	Precursor de serpin A3L Precursor de serpin A3K	gi 2507387 gi 266407	299282 24794		46.42/5.48 46.76/5.31	44 44	2/6 2/6	RTSMVLVNYLLFKG KMQQVESSLQPETLKK							
78	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	17.50/6.13	70.71/6.09	178	8/15	KTNCELYEKL RFKDLGEQHFQK RFPNAEFAEITKL KAPQVSTPTLVEAARN KVMCENQATISSKL KLGEYGFQNAILVRY KDVFLGTFLYEYSRR RRHPYFYAPELLYYAEKY	↓	-	-				
	Precursor de la glicoproteína 1 beta-2	gi 57528174	287774		39.74/8.58	25	2/5	RITCPPPIPKF KKATVLYQGQRV							
80	Precursor de serpin A3L	gi 2507387	299282	5.57/4.08	46.42/5.48	170	4/11	KIAELFSDLEERT KEQPILSEFQEK RTSMVLVNYLLFKG RALYQAEAFIADFKQ	-	↑	-				
	Precursor de serpin A3K	gi 266407	24794		46.76/5.31	139	4/11	KIAELFSELDERT KEQPILSEFQEK RTSMVLVNYLLFKG RALYQAEAFVADFKQ							

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No, de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
89	Precursor C3 del complemento	gi 158138561	24232	19.00/5.13	187.75/6.06	404	6/6	RYYQTIEIPPKS KSSVAVPYVIVPLKI RSDVDEDIPEEDIISRS RILLQGTPVAQMAEDAVIDGERL RSHFPESWLWTIEELKEPEKN RTLDPPEHLGQGGVQREDVPAADLSD QVPDTSSETRI	-	↓	-				
	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186		70.71/6.09	74	3/6	RFPNAEFAEITKL KAPQVSTPTLVEAARN KDVFLGTFLYEYSRR							
90	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	23.37/5.25	70.71/6.09	178	5/10	KLVQEVTDFAKT RFPNAEFAEITKL KLGEYGFQNAILVRY KDVFLGTFLYEYSRR RRHPYFYAPELLYYAEKY	-	↓	-				
	Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903		48.82/6.29	111	5/16	KHTHLFALRE KKDGAETLYSFKY RAGPAPDHQAEASTVTS KKYNAELESNGNFVLYRV KEALGHSIAQLNAQHNHIFYFKI							
	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568		165.04/5.70	73	2/2	KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR							
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	73	3/3	KTPLVTIQSSGSFSQKF KTLMAYAFALAGNQEKR KQNSHGGFSSTQDQTVVALDALSKEY							
	Precursor de la murinoglobulina 2	gi 50657404	408236		162.85/6.15	39	3/3	KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR KQNSHGGFSSTQDQTVVALDALSKEY							
92	Precursor del inhibidor de la proteasa C1 de plasma	gi 40018558	295703	34.5/4.26	55.80/5.54	363	9/19	KFPVFMGRV RHKFPVFMGRV KKMMASFLYKN KSNLEDILSYPKD KSSQDMLSIMEKL KFQPTYVMMPRI KKYPLALFNDQTLKA RDSSEATLSEALDQFVSVKL KGVTSVSVQIFHSPDLAIRD	-	↓	-				
	Precursor de la subunidad 2 de la carboxipeptidasa N	gi 157819231	303861		63.36/5.94	66	4/7	KLTLDFNRL KLQLLDLSRN RVHHLEPDAFGGLPRL RTLNLAAQNLTLQLPKG							

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C ^e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g		
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC
94	Precursor de la cadena gama del fibrinógeno	gi 61098186	24367	54.62/5.66	50.24/5.85	149	6/19	RDNCCILDERF RYLQDIYTSNKQ KESGLYFIRPLKA KYEALLTHESSIRY KEGFGHLSPTGTTEFWLGNEKI KAIQVYYNPDQPPKPGMIEGATQKS	-	↓	-			
99	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	125.83/6.33	70.71/6.09	244	9/18	KLVQEVTDFAKT RFKDLGEQHFVK RFPNAEFAEITKL RHPDYSVSLLLRL KTVMGDFAQFVDKC KGLVLIAFSQYLQKC KDVFLGTFLYEYSRR RLPCVEDYLSAILNRL RRHPYFYAPELLYYAEKY	-	↓	-			
100	Precursor de la cadena pesada H4 del inhibidor inter-alpha	gi 126722991	54404	90.25/5.33	103.86/5.82	633	14/18	RLGMYELLKLV RVLGIDYPATRE KIPAQGGTNINKA RYNFQHHFKG KAVLSAVELLDKS KKTLFVSLPGLKM KLRDQGPDVLLAKV KVTISLLSLDDPQRG KLFVDINQGLEVVGKY KAHIQFKPTLSQQRK KTFELIYQELLQRR RADTVQEATFQVELPRK KSQNEQDVLGDFTVRY KVVEQEGTTPPEESPNDHPRA	-	↓	-			
	Precursor de la fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano	gi 213688382	291132		94.18/6.21	59	7/8	RIYDONLYGRK RGIVAAFYSHPRR RALQFLQLQDGRI RWYVPIQDLLRI KAQYVLISPEASSRF RRWYVPIQDLLRI KTQPALLSTFSGDRRF						
	Precursor de la cadena pesada H3 del inhibidor inter-alfa-tripsina	gi 8393899	50693		99.38/5.85	58	2/2	KATPANLEEARA RSMTNINDGLLRG						

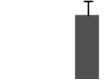

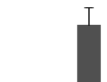
Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pi ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ±DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
101	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	112893	23.2/4.96	165.04/5.70	361	8/6	KYGAATFSKS KQQPAFALKV KMLSGFIPLKPTVKK KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR KEDNSIHWERPQKPTKS RLTAQPAPSPEDLALSMGTIKW KEAIKEDNSIHWERPQKPTKS	-	-	-				
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	108	6/5	KYGAATFSKS KQQPAFALKV KMLSGFIPLKPTVKK KTPLVTIQSSGSFSQKF REDNSIHWERPQKPTKS RLTAQPAPSPEDLALSMGTIKW	-	↓	-				
	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186		70.71/6.09	91	5/10	RFKDLGEQHFVK KAPQVSTPTLVEAARN RRHPDYSVSLRL KLGEYGFQNALVRY RRHPYFYAPELLYYAEKY							
	Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903		48.82/6.29	31	2/5	KHHLFALRE RAGPAPDHQAEASTVTS							
102	Precursor de serpin A3N	gi 2507388	24795	6.00/4.93	46.79/5.33	150	5/14	KIQGLITNLAKK RDTFQSEFYSGKR KGNSMEEILEGLKF KTSMVLVNYIYFKG KALYQAEAFADFQQSRE							
	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568		165.04/5.70	136	5/3	RYNVPLEKQ KQQPAFALKV KMLSGFIPLKPTVKK KTPSVTVQSSGSFSQKF KEDNSIHWERPQKPTKS	-	-	↑				
	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794		166.59/5.68	85	6/5	KQQPAFALKV KFQVDNSNRL KMLSGFIPLKPTVKK KTPLVTIQSSGSFSQKF REDNSIHWERPQKPTKS KQQNSHGGFSSSTQDTVVALDALSKY							

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g				
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA	
104	Precursor C4 del complemento	gi 29337194	24233	13.41/4.96	193.64/6.99	148	3/3	RDSSTWLTAFLVKI KILSLAQEQIGDSPEKL RVTASEPLETLGSEGALSPGGVASLLR L	-	-	↑					
	Precursor de la antiproteínasa alfa-1	gi 51036655	24648		46.26/5.70	147	7/16	RSAILYFPKL RDADFHVDKS KTLSSLGITRV KKVINDYVEKG KRPFNPEHTRD KMQHLEQTLTKD KISSNLADFAFSLYRE								
	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568		165.04/5.70	54	3/2	KMLSGFIPLKPTVKK KTPSVTVQSSGSFSQKF KALMAYAFALAGNQEKR								
	Precursor de serpin A3N	gi 2507388	24795		46.79/5.33	53	2/5	RDTFQSEFYSGKR KMQQVEASLQPETLRR								
105	Precursor de la antiproteínasa alfa-1	gi 51036655	24648	13.94/5.29	46.26/5.70	168	6/16	KFLEEVKN KAVLTLDERG RSAILYFPKL KMQHLEQTLTKD KISSNLADFAFSLYRE RGTEAAGATVVEAVPMSLPPQVKF	-	-	↑					
	Proteína parecida al inhibidor de proteínasa (202 aminoácidos)	gi 930263	24648		22.87/6.06	96	5/28	KAVLTLDERG RSAILYFPKL KTLSDSLGITRV KMQHLEQTLTKD RGTEAAGATVVEAVPMSLPPQVKF								
	Precursor del inhibidor 3 alfa-1 Precursor de la murinoglobulina 2	gi 112893 gi 50647404	297568 408236		165.04/5.70 162.85/6.15	45 45	3/3 3/3	RIMQWQDVKT KQLSFSLSAEPIQGPYKI KNKESVVFVQTDKPMYKPGQSVKF								
106	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794	20.86/5.33	166.59/5.68	84	3/2	KNLQPAIVKV KTPLVTIQSSGSFSQKF KTLMAYAFALAGNQEKR	-	-	↑					
	Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903		48.82/6.29	66	6/16	KHHLFALRE RLLNSCEYKG REIPVDSPELKE KDGAETLYSFKY KYNAELESQNQFVLYRV KEALGHSHIAQLNAQHNNHIFYFKI								

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No, de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C _e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
128	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	21.80/5.41	70.71/6.09	228	6/11	KLVQEVTDFAKT RFPNAEFAEITKL KTVMGDFFAQFVDKC KAPQVSTPTLVEAARN RRHPDYSVSLLLRL KLGEYGFQNAVLRVY	↑	-	-				
	Precursor del T-kininógeno 1	gi 80861401	24903		48.82/6.29	110	5/13	KHTHLFALRE REIPVDSPELKE KDGAETLYSFKY KFSVATQICNITPGKG KYNAELESNGQFVLYRV							
135	Precursor de la murinoglobulina 1	gi 12831225	497794	72.30/5.13	166.59/5.68	61	4/3	RHGIPFFVKI RDTEELTYSVPYGRE KQLSFSLSAEPIQGPYKI KNLHPLNELFPLAYIEDPKM	↓	-	-				
	Precursor C3 del complemento	gi 158138561	24232		187.75/6.06	43	5/3	KNTLIILEKI RLLWESGSLRS RYYQTIEIPPKS KSSVAVPYVIVPLKI KDLNMDVSLHLPSRS							
136	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	4.92/6.16	70.71/6.09	182	6/13	KKQATALAELVKH KAPQVSTPTLVEAARN KLGEYGFQNAVLRVY KDVFLGTFLYEYSRR RLPCVEDYLSAILNRL KAADKDNCFATEGPNLVARs	↓	-	-				
	Precursor de la macroglobulina alfa-1	gi 307746876	252922		168.38/6.46	164	5/4	KVNTLPLNFDKA RLADLPGNYITKV RDLSSSDLTTASKI KMOVSGFIPVKPSVKK KYNILPEAEAGEAPFTLKV							
139	Precursor de la proteína de unión a la vitamina D	gi 401709952	24384	20.86/5.41	55.08/5.65	203	10/19	RSLSLILYSRK KRQLTSFIEKG RVCSQYAAYGKE RTQVPEVFLSKV KQLSLLTTMSNRV RRTQVPEVFLSKV KDKVCQELSTLGKD KMPNASPEELADMVAKH RKFPSSTFEQVSQLVKE RTKMPNASPEELADMVAKH	↓	↓	-				

Resultados

Tabla 9. Continuación

Spot No. ^a	Proteína	No. de acceso	GeneID	Exp kDa/pl ^b	Teor kDa/pl ^c	Mascot score ^d	PM/%C ^e	Péptidos alineados	Relación de cambio ^f			V% ± DE ^g			
									NC vs NA	NC vs DC	DC vs DA	NC	NA	DC	DA
142	Precursor del inhibidor 3 alfa-1	gi 112893	297568	47.80/5.39	165.04/5.70	90	3/2	RIMQWQDVKT KGDPIPNEQVLIKA KNLHPLNELFPLAYIEDPKM	↓	↓	-	■	■	■	■
143	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186	52.75/6.11	70.71/6.09	232	4/8	RFPNAEFAEITKL KAPQVSTPTLVEAARN RRHPDYSVSLLLRL KLGEYGFQNAILVRY	-	↓	-	■	■	■	■
	Precursor del factor B del complemento	gi 218156285	294257		86.66/6.57	94	8/11	RQQLVPSYARD KALFVSEEGKLL RSSDADWVTEKL RYGLVTYATVPKV KSTGSWSVLQTRD KLNQISYEDHKL KDMEDLENVFKM KAEGISEFYDYDVALIKL							
146	Precursor de la macroglobulina alfa-1	gi 307746876	252922	75.07/5.94	168.38/6.46	194	8/6	KTVSWAVTPKS KVAEVPALVQKD KVPDTITEWKA KAEQGAYLGPLPYKG KLSPQSIYNLLPQKA KAEDITHNGIVYTPKQ KDTVVKPVIVEPEGIEKE RYVVLVPSELYAGVPEKV	-	↓	-	■	■	■	■
	Precursor de la albúmina de suero	gi 158138568	24186		70.71/6.09	130	4/7	KLVQEVTDFAKT RFPNAEFAEITKL KAPQVSTPTLVEAARN KLGEYGFQNAILVRY							

^aNo. de spot de acuerdo al indicado en la **Figura 18**, ^bMasa experimental (kDa) y *pl* de los spots de proteína identificados, ^cMasa teórica (kDa) y *pl* de las proteínas identificadas en la base de datos no redundante de NCBI, ^dScore de MASCOT reportado después de la búsqueda en las bases de datos. Scores de iones individuales >25 son estadísticamente significativos ($P < 0.01$), ^eNo. de péptidos que hicieron match y porcentaje de cobertura de la proteína, ^fLa relación de cambio está expresada como el radio del % del volumen y cada valor representa el promedio de tres mediciones independientes. Para algunos spots de proteína la relación de cambio no se pudo calcular debido a que la proteína estaba ausente en el spot; esto está marcado como ↑ y ↓, indicando la presencia o ausencia del spot respectivamente, NC: Grupo normoglucémico con dieta control, NA: Grupo normoglucémico con suplementación de amaranto, DC: Grupo diabético con dieta control, DA: Grupo diabético con suplementación de amaranto.

Resultados

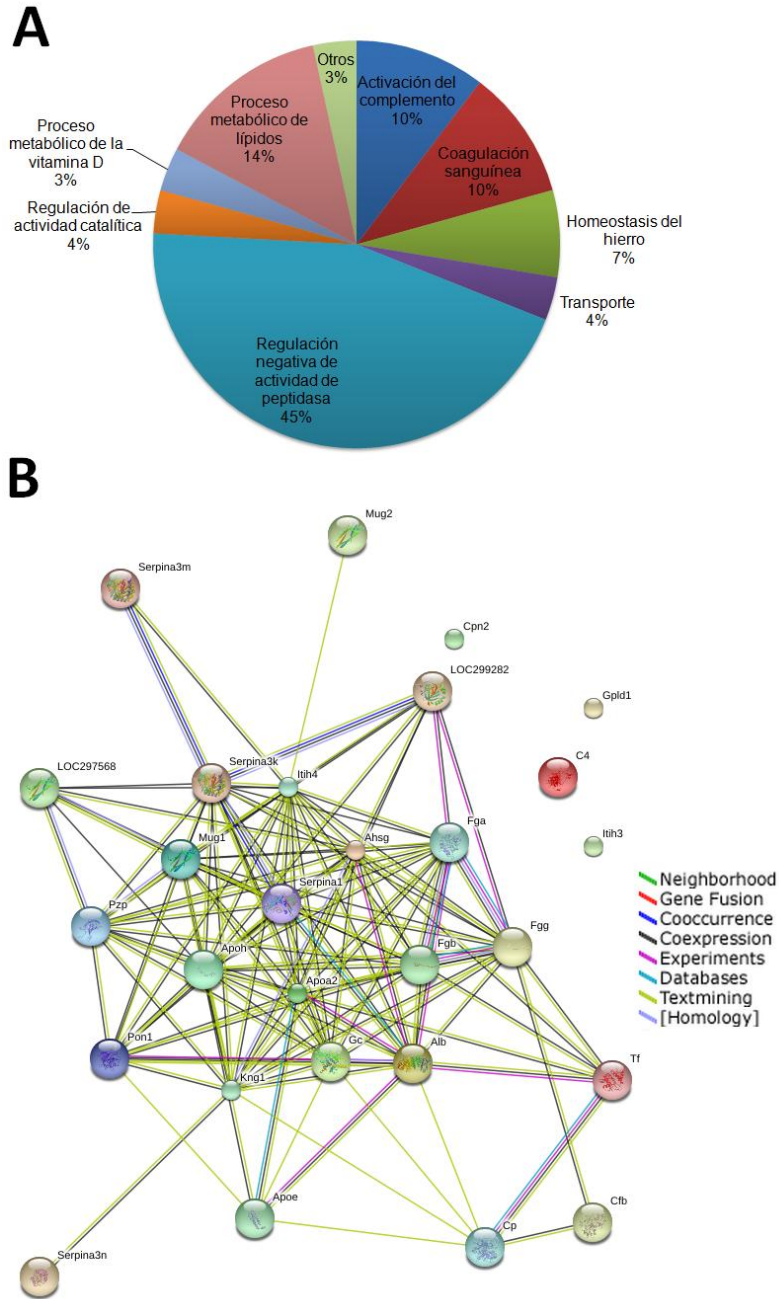


Figura 19. Clasificación e interacciones de las proteínas acumuladas diferencialmente en plasma de rata (A) Clasificación de las proteínas identificadas basadas en su proceso biológico de acuerdo a gene ontology (B) Red de interacción proteína-proteína usando la base de datos STRING. Alb: albúmina, C4: anafilotoxina C4a, Cp: ceruloplasmina, Fgb: cadena beta del fibrinógeno, Fga: cadena alfa del fibrinógeno, Fgg: cadena gamma del fibrinógeno, Tf: serotransferrina, Kng1: T-kininógeno 1, Apoe: apolipoproteína E, Apoh: glicoproteína 1 beta-2, Apoa2: apolipoproteína A-II, Itih3: cadena pesada H3 del inhibidor inter-alfa-tripsina, Itih4: cadena pesada H4 del inhibidor inter-alfa, Pon1: paraoxonasa/arilesterasa 1, Pzp: macroglobulin alfa-1, Gpld1: Fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano, Cfb: factor B del complemento, Gc: proteína de unión a vitamina D, Serpina1: antiproteínasa alfa-1, Serpina3k: serpin A3K, Serpina3n, serpin A3N,

Resultados

Serpina3m: serpine A3M, LOC299282: serpin A3L, Ahsg: glicoproteína alfa-2-HS, LOC297568: inhibidor 3 alfa-1, Cpn2: subunidad 2 de la carboxipeptidasa N, Mug1: murinoglobulina 1, Mug2: murinoglobulina 2.

La suplementación con amaranto en normoglucemia y diabetes indujo la acumulación de la glicoproteína alfa-2-HS (spot 73 de las proteínas abundantes) y una disminución en la acumulación de la apolipoproteína E (spots 19 y 43 de las proteínas poco abundantes). Los cambios en las proteínas clasificadas en el metabolismo de lípidos como la glicoproteína beta-2 (spot 78 de las proteínas abundantes), apolipoproteína A-II (spot 86 de las proteínas poco abundantes) y la paraoxonasa/arilesterasa 1 (spot 48 de las proteínas poco abundantes) fueron heterogéneos pero estos cambios se observaron solamente en las ratas alimentadas con amaranto en ambas condiciones metabólicas.

Con respecto a las proteínas involucradas en la homeostasis del hierro, se observó una disminución en la acumulación de la serotransferrina (spot 70 de las proteínas abundantes) y la ceruloplasmina (spot 43 de las proteínas poco abundantes) en las ratas diabéticas con dieta control y suplementación con amaranto, respectivamente. Otra isoforma de la ceruloplasmina se acumuló en las ratas normoglucémicas bajo suplementación con amaranto (spot 143 de las proteínas poco abundantes).

Las proteínas identificadas por LC-MS/MS se cargaron en el software STRING v9.1 para detectar las interacciones y asociaciones entre estas proteínas (**Figura 19B**). Se observó una interacción cercana y abundante en la mayoría de las proteínas. No se encontró asociación entre la subunidad 2 de la carboxipeptidasa N, la fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano, complemento C4 y la cadena pesada 3 del inhibidor inter-alfa-tripsina con el resto de las proteínas.

Discusión

5. Discusión

5.1 Efecto *in vitro* de los hidrolizados de amaranto sobre la actividad enzimática de la DPPIV

En este trabajo se realizaron diferentes digestiones enzimáticas de las proteínas de amaranto para liberar los péptidos bioactivos potenciales con actividad inhibitoria sobre la DPPIV. Se probaron diferentes concentraciones de tripsina para obtener diferentes grados de digestión. Particularmente se necesitaron grandes cantidades de tripsina para poder hidrolizar las glutelinas completamente (una relación 1:1); esto podría indicar cierta resistencia a la hidrólisis, como ya se ha reportado previamente para otras proteínas de amaranto [83]. Además, encontramos que el resto de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto contienen péptidos encriptados con una actividad inhibitoria sobre la DPPIV.

En las concentraciones utilizadas se logró obtener las IC_{50} de los hidrolizados trípticos de las glutelinas de amaranto. Si bien estos valores no son comparables con la IC_{50} del tripéptido diprotin A, son similares a los encontrados en hidrolizados de gelatina de piel de salmón [50]. El hecho de que la concentración de péptidos requerida para inhibir a la DPPIV sea mayor a 1 mg/mL sugiere que tal vez sea necesario incluir alimentos con esta actividad en la dieta para poder observar un efecto real a largo plazo. Es necesario realizar más experimentos para determinar la concentración real para obtener una inhibición significativa de esta enzima *in vivo*.

En el modelo de simulación de la digestión gastrointestinal encontramos que el frijol produjo la menor inhibición sobre la DPPIV. El frijol es una leguminosa rica en proteína y otros fitoquímicos [84]; sin embargo, es posible que las condiciones presentes en la hidrólisis no hayan sido efectivas para liberar péptidos inhibidores de la DPPIV de las proteínas de frijol, en el caso de que esta semilla contenga este tipo de péptidos. Es necesario realizar más trabajo en esta dirección.

Discusión

La harina de amaranto reventado presentó un menor efecto inhibitorio que la harina no procesada. Esto podría indicar que el proceso de calentamiento durante el reventado del grano afecta la hidrólisis y la disponibilidad de los péptidos bioactivos, debido tal vez a una desnaturalización de las proteínas, una hidrólisis espontánea, entrecruzamiento de los péptidos, fragmentación o incluso reacciones Maillard entre los carbohidratos y las proteínas [85].

Por otro lado, este es el primer reporte de la presencia de péptidos inhibidores de DPPIV en trigo. El trigo es una importante fuente de proteína en el mundo. Ya se ha reportado la presencia de péptidos bioactivos contenidos en este grano como péptidos inhibidores de la ECA y lunasin [86, 87]. En el trigo, las gliadinas (que se encuentran en la fracción de prolaminas del grano) son una de las principales fracciones responsables de la respuesta alérgica e inflamatoria y del daño a la mucosa del intestino delgado en la enfermedad celiaca en pacientes sensibles al gluten [88, 89]. El amaranto, como un pseudocereal, tiene la ventaja de ser una semilla libre de prolaminas y por lo tanto, es una excelente alternativa para la preparación de alimentos libres de gluten para pacientes con enfermedad celiaca [90].

Con respecto a la soya, ya se ha reportado la presencia de péptidos bioactivos en las proteínas de soya con actividad anticancerígena (lunasin), hipolipidémica, antiadipogénica y efectos antidiabéticos [67, 91, 92]. Es necesario determinar si el efecto antidiabético de la soya se debe a una actividad inhibitoria sobre la DPPIV. Lacroix y Li-Chan [49] encontraron mediante un análisis *in silico* que diferentes proteínas de soya y trigo contienen péptidos inhibitorios de la DPPIV en sus semillas, pero esta información no ha sido confirmada experimentalmente. Nuestros resultados corroboran esta evidencia, aunque no se puede aseverar que las secuencias que ellos reportan son las responsables de la inhibición observada en este trabajo.

Dentro de las secuencias identificadas por espectrometría de masas y la base de datos biopep en las glutelinas de amaranto se encontró la secuencia IPI, también

Discusión

conocida como diprotin A, un inhibidor bien establecido de esta enzima [50, 93, 94]. A nivel molecular, el diprotin A actúa como un inhibidor no covalente que se une transitoriamente al sitio catalítico de la DPPIV y bloquea la degradación de cadenas polipeptídicas más grandes como las incretinas [31].

Después del fraccionamiento de los digeridos trípitos de las glutelinas de amaranto por cromatografía de exclusión molecular se purificaron dos fracciones con una alta inhibición de la DPPIV. Debido al patrón de actividad de la DPPIV de las fracciones parece ser que estas dos fracciones son las responsables de la inhibición observada por los digeridos. Cabe mencionar que el peso molecular del diprotin A es de 340 Da y una de las fracciones con alta actividad inhibitoria se encuentra en el rango de tamaño de 300 Da; es muy probable que esta fracción contenga al tripéptido IPI, lo cual confirmaría lo observado por la base de datos biopep y que el corte proteolítico de las proteínas de amaranto efectivamente libera a este péptido inhibidor de la DPPIV. Es necesario secuenciar los componentes de esta fracción para corroborar este hallazgo

5.2 Comportamiento de la DPPIV en diferentes tipos celulares

La DPPIV se distribuye ampliamente en los órganos y sus niveles de expresión varían enormemente entre tejidos. Se localiza en el endotelio y epitelio del riñón, hígado, intestino, páncreas, bazo y placenta; así como en suero, líquido seminal y en una pequeña subpoblación de células T, donde presenta diferentes funciones [43]. En los ensayos de actividad implementados en este trabajo en dos líneas celulares se encontró que el patrón de inhibición fue diferente dependiendo del tipo celular. En las células de riñón observamos un patrón similar al obtenido con la enzima purificada con las muestras analizadas, excepto que los valores máximos de inhibición fueron menores. Se cree una de las funciones de la DPPIV en riñón es ayudar en la eliminación de sus sustratos por la orina, los cuales tiene que ser inactivados [35] y esto implica una función catalítica. Además, resultados preliminares de detección de transcrito de DPPIV en la línea Caki-1 muestran que los niveles de mensajero de esta enzima aumentan al estar en presencia de los

Discusión

inhibidores probados, diprotin A e hidrolizados de gluteínas, lo cual muestra un mecanismo compensatorio, explica que no se lograra abatir por completo la actividad enzimática de la DPPIV y sugiere que una de las funciones principales de la enzima en este tipo celular dependen de su actividad catalítica.

En la vasculatura se puede encontrar a la DPPIV en dos formas, una anclada a la membrana de las células endoteliales y linfocitos T y una forma soluble libre en la circulación, que se cree que proviene de un corte proteolítico de la forma unida a membrana [36]. Además la enzima puede interactuar con otras proteínas de membrana como la adenosin desaminasa y la proteína activadora de fibroblastos e incluso formar tetrámeros, que se cree ayuda a la comunicación célula-célula [43]. Al analizar la actividad de DPPIV en la línea celular HUVECC no se observó ninguna inhibición producida por los hidrolizados de amaranto, incluso con el tripéptido diprotin A. Cabe mencionar que en general los niveles de actividad de la DPPIV en esta línea celular fueron menores que en la línea Caki-1, esto probablemente se deba a que las células endoteliales estén liberando a la enzima en forma soluble y por tanto se pierda actividad enzimática durante los lavados previos al ensayo. Además existe la posibilidad que en este tipo celular la función de la DPPIV no esté mediada por su actividad enzimática sino más bien por una interacción y comunicación con otras proteínas de membrana. Es necesario analizar los niveles de transcrito de la enzima junto con otros experimentos para determinar la función de la DPPIV en las células endoteliales vasculares.

5.3 Efecto del consumo de amaranto en la diabetes

Se ha reportado un incremento en la actividad de DPPIV en suero en la diabetes tipo 1 con una hiperglucemia moderada o severa y se cree que esto está relacionado con la resistencia a la insulina [95-97]. En este trabajo la inducción de hiperglucemia se logró por un daño directo de las células β del páncreas, obteniendo así una diabetes insulino-dependiente; por lo tanto era esperado observar un incremento en la actividad de DPPIV en el grupo diabético con dieta control. El hecho de que las ratas diabéticas suplementadas con amaranto

Discusión

redujera ligeramente la actividad de DPPIV a un nivel intermedio entre el grupo diabético control y los grupos normoglucémicos muestra que el amaranto tiene un efecto protector en la diabetes debido a la presencia de péptidos inhibidores de la DPPIV y que esta reducción no es menor que los niveles basales.

Por otro lado, no se observaron cambios en la actividad enzimática de la DPPIV en el riñón, y esta actividad no correlacionó con los niveles de transcrito de la enzima. Se ha reportado previamente que la estreptozotocina (30 mg/kg) produce un incremento en la actividad y expresión de DPPIV en el riñón de rata [98]. La falta de correlación entre la expresión y actividad enzimática en este trabajo podría indicar que la regulación de la expresión de DPPIV es independiente de la actividad catalítica de la enzima en este órgano. Además, esto podría indicar que la función de la DPPIV en sangre es muy diferente que la función en riñón, lo cual indica la relevancia de la DPPIV en el cuerpo. La DPPIV es una proteína muy ubicua y es responsable de la inactivación de péptidos regulatorios como las incretinas, quimiocinas, neuropéptidos y hormonas [35]. La DPPIV se puede encontrar en una forma soluble o unida a membrana donde interacciona con otras proteínas como la adenosin desaminasa, el colágeno y la fibronectina [36]. Particularmente se sabe que la DPPIV modula la actividad de un intercambiador de Na^+/H^+ en las células proximales tubulares pero se sabe poco sobre la DPPIV en riñón aparte de su actividad catalítica [99].

5.4 El amaranto como un regulador negativo de actividad de peptidasas

Se observó una disminución en la acumulación de la subunidad 2 de la carboxipeptidasa N, el kininógeno 1 y el inhibidor de la proteasa de plasma C1 en las ratas diabéticas. Estas proteínas forman parte del sistema kallikreina-kinina (KKS) y sus reguladores. La kallikreina es una serin proteasa que corta el sustrato kininógeno para liberar kininas, siendo la bradicidina la más estudiada. El KKS tiene funciones renales (diuréticas), cardiovasculares (vasodilatación) e inmunológicas (regulación de procesos inflamatorios) [100]. El inhibidor C1 es el inhibidor plasmático de la activación de la kallikreina pero también es el regulador

Discusión

primario de la activación de la vía clásica del complemento [101]. La carboxipeptidasa N es una metaloproteasa responsable de la inactivación de la bradicidina y las anafilotoxinas del complemento C3a, C4a y C5a [102].

Se observó un comportamiento similar en las proteínas del complemento C3, C4 y el factor B en las ratas diabéticas. Esto claramente muestra una interrelación entre estas vías de señalización y una consecuencia directa del daño por estreptozotocina. Se ha demostrado que la diabetes inducida por estreptozotocina afecta el KKS, reduce la kallikreina cardiaca y renal y, por tanto reduce las kininas [103, 104]. Cabe mencionar que análisis por STRING no mostró ninguna asociación entre la carboxipeptidasa N y la proteínas C4 del complemento con el resto de las proteínas identificadas; aún cuando no existe una interacción directa entre estas proteínas, es obvio que existe una asociación cercana entre estas vías y el hecho de que las proteínas ligadas a las carboxipeptidasa N y complemento C4 no se acumularan diferencialmente no significa que no participan en estos procesos.

El fibrinógeno está formado por tres pares de subunidades alfa, beta y gama, participa en la formación del coágulo en hemorragias y ayuda a modular reacciones celulares inflamatorias [105]. En la diabetes hay complicaciones vasculares y se ha observado un incremento en los niveles de fibrinógeno [106-108]. En este trabajo se detectaron las tres unidades del fibrinógeno en varios spots con un comportamiento variable. Esto correlaciona con la alteración vascular causada por la inducción de la diabetes, la cual fue revertida por la dieta con amaranto.

Se identificaron varios miembros de la superfamilia serpin pertenecientes al clado A, el cual contiene proteínas extracelulares. Las serpinas tienen una extensa variedad de funciones como reguladores de proteasas en la fibrinólisis, procesos inflamatorios, apoptosis y coagulación sanguínea, aunque también actúan como chaperonas, reguladores de la presión arterial o transportadores de hormonas [109]. La antiproteínasa alfa-1 (serpinA1) y la serpin A3 están involucradas en la

Discusión

respuesta inflamatoria como activación del complemento y apoptosis [110]. Estas proteínas se identificaron en varios spots junto con otras proteínas, con diferentes patrones de acumulación. Las serpinas pueden formar complejos con sus proteasas blanco e incluso pueden polimerizar y acumularse, lo cual explicaría las diferencias en la distribución de los spots que observamos en este experimento. Se sabe que las mutantes en la serpinA1 llevan a una polimerización la cual resulta en enfisema y cirrosis, reflejando la importancia de esta familia de proteínas en la homeostasis en inflamación [109]. Los cambios observados en este tipo de proteínas pueden ser resultado del daño oxidativo producido por la estreptozotocina como un inductor de la diabetes.

5.5 El amaranto y el metabolismo de lípidos

Las semillas de amaranto contienen alrededor de 9% de aceite [59], el cual está compuesto principalmente por ácidos grasos insaturados, tocoferoles y esteroides como el escualeno [111]. El escualeno es un precursor directo del colesterol y su administración tiene un efecto positivo en la regulación de los lípidos plasmáticos al promover la secreción del colesterol en los ácidos biliares [112, 113]. Hemos mostrado que el estado diabético inducido por la estreptozotocina incrementó el colesterol total en suero y que el amaranto contrarrestó ligeramente este efecto. Además, se observó un incremento considerable en los niveles de HDL-c en las ratas diabéticas bajo una suplementación con amaranto. El escualeno y la fracción oleosa de la semilla del amaranto podrían ser responsables de estos resultados.

Varios estudios se han enfocado en determinar el efecto del escualeno presente en el amaranto sobre el perfil de lípidos y los resultados son diversos. Se ha reportado que el consumo de un extruido de amaranto reduce el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el colesterol total en conejos hipercolesterolémicos [114]. En hamsters, tanto el grano de amaranto como su fracción oleosa no afectaron significativamente los lípidos plasmáticos [111]. Además, se ha mostrado que el aceite de amaranto y el consumo de escualeno incrementa la excreción de ácidos biliares en las heces de hamsters, pero esto no

Discusión

tuvo un efecto hipocolesterolémico [115]. La adición de aceite de amaranto en la dieta de pacientes diabéticos con enfermedad cardiovascular reduce el colesterol total, los triglicéridos, LDL-c y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) [59]. Todos estos resultados dependen aparentemente en la especie estudiada y, además es necesario considerar a las proteínas presentes en la semilla de amaranto. Mendonça et al. [116] reportaron que el consumo de la proteína de amaranto resultó en una disminución en los lípidos plasmáticos de hamsters con hipercolesterolemia, pero los mecanismos por los que el amaranto actúa todavía no se conocen y la proteómica es una herramienta que podría ayudar a elucidar dichos mecanismos.

El análisis proteómico mostró cambios en las lipoproteínas sólo en las ratas alimentadas con amaranto. Se encontró que la acumulación de la glicoproteína beta-2 (apo H) disminuyó en las ratas normoglucémicas bajo una suplementación con amaranto. Apo H se puede considerar como un marcador de enfermedad cardiovascular, ya que esta proteína está involucrada en la progresión de la placa aterosclerótica, la depuración de triglicéridos y en la regulación de la degradación de las LDL-ox. Se ha reportado un incremento de apo H en pacientes diabéticos y se cree que su expresión puede estar relacionada con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico, sin embargo, su función fisiológica no está clara [117, 118]. En nuestro caso particular, una disminución en la expresión de apo H podría indicar un posible efecto preventivo del amaranto sobre la formación y progresión de la placa aterosclerótica en un estado no diabético, aunque es necesario realizar más experimentos para corroborar esta teoría. Por otro lado, apo A-II y apo E brindan estabilidad a las lipoproteínas [119-121]. Apo A-II es la segunda proteína más abundantes en las HDL y, en rata, la mayoría de apo E está asociada con estas lipoproteínas [122]. A pesar de que en este experimento apo E presentó una disminución en su acumulación, el aumento en la acumulación de apo A-II observado en las ratas diabéticas bajo una suplementación con amaranto correlaciona con los cambios observados en los niveles de HDL-c.

Discusión

La paraoxonasa 1 (PON1) estuvo ausente en las ratas alimentadas con la dieta control, pero esta proteína se detectó en las ratas alimentadas con amaranto. PON1 es una enzima hidrolítica sintetizada en el hígado con una amplia variedad de sustratos [123]. En sangre, esta proteína está asociada con las HDL y LDL previniendo su oxidación y presenta una función atero-protectora [124]. Se sabe que los antioxidantes naturales como la glabridina, quercetina e incluso el jugo de granada incrementan la actividad de PON1 y por tanto reducen la oxidación de lípidos en estas lipoproteínas [125-127]. Además, se ha reportado una correlación positiva entre las HDL que contienen apo A-II y la actividad de PON1 [128], lo cual explica la acumulación de estas dos proteínas en este experimento. En resumen, estos resultados muestran que el amaranto tiene un efecto positivo en la regulación del colesterol en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Los mecanismos moleculares asociados podrían estar asociados con una promoción del transporte reverso del colesterol por las HDL y, presumiblemente, en una disminución en la oxidación de los lípidos presentes en estas partículas.

Conclusión

6. Conclusión

La información presentada en este trabajo confirma la presencia de dos tipos de péptidos inhibidores de la DPPIV encriptados en la semilla de amaranto: péptidos pequeños como IPI y péptidos mayores a 13 residuos que interactúan con el sitio de dimerización de la DPPIV. Este es el primer reporte que evalúa la actividad inhibitoria de la DPPIV de hidrolizados de alimentos usando un modelo de digestión gastrointestinal.

El comportamiento en la actividad y expresión de la DPPIV varía dependiendo de las condiciones estudiadas, ya sea a partir de la enzima purificada, sintetizada por líneas celulares diferentes e incluso entre tejidos como sangre y riñón, lo que demuestra la multifuncionalidad de esta enzima como una molécula señalizadora y reguladora de la homeostasis.

El consumo de amaranto previene el aumento en la actividad de DPPIV en sangre en un modelo *in vivo* de diabetes inducida por una destrucción de las células β del páncreas. Esto probablemente se deba a la presencia de péptidos inhibidores de la DPPIV en sangre después de la incorporación del amaranto en la dieta. Además, el consumo de amaranto presenta un efecto positivo en la regulación de los lípidos plasmáticos, particularmente en el HDL-c mediado por la expresión de apo H, apo A-II y PON1, una enzima antioxidante. Este es el primer estudio que muestra algunos de los posibles mecanismos moleculares por los cuales el amaranto ejerce un efecto positivo en la salud *in vivo*, particularmente en la diabetes. Nuestros resultados justifican el uso del amaranto como un alimento funcional en la diabetes y que no presenta complicaciones en individuos sanos.

Estos resultados representan una nueva perspectiva de los beneficios que aportan los cereales más allá de sus propiedades nutricionales. También es importante tener presente que el procesamiento de los alimentos por calor podría cambiar la estructura de la proteína y por tanto afectar la disponibilidad de las enzimas para liberar los péptidos bioactivos. Por lo tanto es necesario desarrollar nuevas alternativas en el procesamiento de los alimentos para preservar su bioactividad

Conclusión

para su uso potencial como nuevos compuestos en la prevención y manejo de la diabetes tipo 2.

Referencias

7. Referencias

[1] Campbell, R. K., Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc (2003)* 2009, 49 Suppl 1, S10-15.

[2] Surampudi, P. N., John-Kalarickal, J., Fonseca, V. A., Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* 2009, 76, 216-226.

[3] Lorenz, M., Evers, A., Wagner, M., Recent progress and future options in the development of GLP-1 receptor agonists for the treatment of diabetes. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23, 4011-4018.

[4] Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., Schwarz, P. E., *et al.*, An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* 2009, 121, 317-331.

[5] Virally, M., Blickle, J. F., Girard, J., Halimi, S., *et al.*, Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab* 2007, 33, 231-244.

[6] OMS, *Nota Descriptiva No. 312* 2014.

[7] FID, Federación Internacional de la Diabetes 2014.

[8] ENSANUT, Instituto Nacional de Salud Pública 2012.

[9] Petrie, J. R., Pearson, E. R., Sutherland, C., Implications of genome wide association studies for the understanding of type 2 diabetes pathophysiology. *Biochem Pharmacol* 2011, 81, 471-477.

[10] Karam, J. G., McFarlane, S. I., Update on the prevention of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 2011, 11, 56-63.

[11] Drucker, D. J., Incretin-based therapy and the quest for sustained improvements in beta-cell health. *Diabetes Care* 2011, 34, 2133-2135.

Referencias

- [12] Lovshin, J. A., Drucker, D. J., Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2009, 5, 262-269.
- [13] Drucker, D. J., Sherman, S. I., Gorelick, F. S., Bergenstal, R. M., *et al.*, Incretin-based therapies for the treatment of type 2 diabetes: evaluation of the risks and benefits. *Diabetes Care* 2010, 33, 428-433.
- [14] Gude, D., Red carpeting the newer antidiabetics. *J Pharmacol Pharmacother* 2012, 3, 127-131.
- [15] Jung, C. H., Jang, J. E., Park, J. Y., A Novel Therapeutic Agent for Type 2 Diabetes Mellitus: SGLT2 Inhibitor. *Diabetes Metab J* 2014, 38, 261-273.
- [16] Al-Zubairi, A. S., Eid, E. E. M., Molecular Targets in the Development of Antidiabetic Drugs. *Int J Pharmacol* 2010, 6, 784-795.
- [17] Nauck, M. A., Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: properties, functions, and clinical implications. *Am J Med* 2011, 124, S3-18.
- [18] Ahren, B., GLP-1 for type 2 diabetes. *Exp Cell Res* 2011, 317, 1239-1245.
- [19] Holst, J. J., Knop, F. K., Vilsboll, T., Krarup, T., Madsbad, S., Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011, 34 Suppl 2, S251-257.
- [20] Kim, W., Egan, J. M., The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* 2008, 60, 470-512.
- [21] McIntosh, C. H., Demuth, H. U., Kim, S. J., Pospisilik, J. A., Pederson, R. A., Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006, 38, 860-872.
- [22] Drab, S. R., Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: current status and future prospects. *Pharmacotherapy* 2010, 30, 609-624.

Referencias

- [23] Nauck, M. A., Vardarli, I., Comparative evaluation of incretin-based antidiabetic medications and alternative therapies to be added to metformin in the case of monotherapy failure. *J Diabetes Investig* 2010, 1, 24-36.
- [24] Seino, Y., Fukushima, M., Yabe, D., GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig* 2010, 1, 8-23.
- [25] McIntosh, C. H., Widenmaier, S., Kim, S. J., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). *Vitam Horm* 2009, 80, 409-471.
- [26] Conarello, S. L., Li, Z., Ronan, J., Roy, R. S., *et al.*, Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100, 6825-6830.
- [27] Gerich, J., DPP-4 inhibitors: what may be the clinical differentiators? *Diabetes Res Clin Pract* 2010, 90, 131-140.
- [28] Stephan, M., Radicke, A., Leutloff, S., Schmiedl, A., *et al.*, Dipeptidyl peptidase IV (DPP4)-deficiency attenuates diet-induced obesity in rats: possible implications for the hypothalamic neuropeptidergic system. *Behav Brain Res* 2011, 216, 712-718.
- [29] Drucker, D. J., Sherman, S. I., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., The safety of incretin-based therapies--review of the scientific evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96, 2027-2031.
- [30] Langley, A. K., Suffoletta, T. J., Jennings, H. R., Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and the incretin system in type 2 diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 2007, 27, 1163-1180.
- [31] Wiedeman, P. E., Trevillyan, J. M., Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* 2003, 4, 412-420.

Referencias

- [32] Kos, K., Baker, A. R., Jernas, M., Harte, A. L., *et al.*, DPP-IV inhibition enhances the antilipolytic action of NPY in human adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2009, 11, 285-292.
- [33] Keating, G. M., Vildagliptin: a review of its use in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2010, 70, 2089-2112.
- [34] Richard, K. R., Shelburne, J. S., Kirk, J. K., Tolerability of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a review. *Clin Ther* 2011, 33, 1609-1629.
- [35] Mentlein, R., Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999, 85, 9-24.
- [36] Matteucci, E., Giampietro, O., Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem* 2009, 16, 2943-2951.
- [37] Velarde-Salcedo, A. J., Gonzalez de Mejia, E., Barba de la Rosa, A. P., in: Tunick, M. (Ed.), *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*, Washington, DC 2012, pp. 189-198.
- [38] Matteucci, E., Giampietro, O., Dipeptidyl peptidase-4 inhibition: linking chemical properties to clinical safety. *Curr Med Chem* 2011, 18, 4753-4760.
- [39] Yu, D. M., Yao, T. W., Chowdhury, S., Nadvi, N. A., *et al.*, The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010, 277, 1126-1144.
- [40] De Meester, I., Durinx, C., Bal, G., Proost, P., *et al.*, Natural substrates of dipeptidyl peptidase IV. *Adv Exp Med Biol* 2000, 477, 67-87.
- [41] Stulc, T., Sedo, A., Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: is there a risk of oncological and immunological adverse effects? *Diabetes Res Clin Pract* 2010, 88, 125-131.

Referencias

[42] Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A., Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite* 2008, 51, 456-467.

[43] Augustyns, K., Van der Veken, P., Senten, K., Haemers, A., The therapeutic potential of inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related proline-specific dipeptidyl aminopeptidases. *Curr Med Chem* 2005, 12, 971-998.

[44] Erdmann, K., Cheung, B. W., Schroder, H., The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2008, 19, 643-654.

[45] Samaranyaka, A. G. P., Li-Chan, E. C. Y., Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Funct Foods* 2011, 3, 229-254.

[46] Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., Schrezenmeir, J., Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008, 47, 171-182.

[47] Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C., Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res Int* 2004, 37, 123-131.

[48] Uchida, M., Ohshiba, Y., Mogami, O., Novel Dipeptidyl Peptidase-4-Inhibiting Peptide Derived From beta-Lactoglobulin. *J Pharmacol Sci* 2011, 117, 63-66.

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

[50] Li-Chan, E. C., Hunag, S. L., Jao, C. L., Ho, K. P., Hsu, K. C., Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *J Agric Food Chem* 2012, 60, 973-978.

Referencias

- [51] Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J., Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J Funct Foods* 2013, 5, 1909-1917.
- [52] Lacroix, I. M., Li-Chan, E. C., Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and alpha-glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *J Agric Food Chem* 2013, 61, 7500-7506.
- [53] Lacroix, I. M., Li-Chan, E. C., Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides* 2014, 54, 39-48.
- [54] Silveira, S. T., Martinez-Maqueda, D., Recio, I., Hernandez-Ledesma, B., Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in beta-lactoglobulin. *Food Chem* 2013, 141, 1072-1077.
- [55] Connolly, A., Piggott, C. O., FitzGerald, R. J., In vitro alpha-glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Res Int* 2014, 56, 100-107.
- [56] Gallego, M., Aristoy, M. C., Toldra, F., Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Sci* 2014, 96, 757-761.
- [57] Rastogi, A., Shukla, S., Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013, 53, 109-125.
- [58] Huerta-Ocampo, J. A., Barba de la Rosa, A. P., Amaranth: A Pseudo-Cereal with Nutraceutical Properties. *Curr Nutr Food Sci* 2011, 7, 1-9.
- [59] Martirosyan, D. M., Miroshnichenko, L. A., Kulakova, S. N., Pogojeva, A. V., Zoloedov, V. I., Amaranth oil application for coronary heart disease and hypertension. *Lipids Health Dis* 2007, 6, 1.

Referencias

- [60] Barba de la Rosa, A. P., Montoya, A. B., Martinez-Cuevas, P., Hernandez-Ledesma, B., *et al.*, Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* 2010, 23, 106-111.
- [61] Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H. J., Leon-Galvan, F., Barrera-Pacheco, A., *et al.*, Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 2010, 31, 1635-1642.
- [62] Delgado, M. C. O., Tironi, V. A., Anon, M. C., Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Lwt-Food Sci Technol* 2011, 44, 1752-1760.
- [63] Tironi, V. A., Anon, M. C., Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Res Int* 2010, 43, 315-322.
- [64] Silva-Sanchez, C., de la Rosa, A. P., Leon-Galvan, M. F., de Lumen, B. O., *et al.*, Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 1233-1240.
- [65] Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O., Viroben, G., Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J Agric Food Chem* 1992, 40, 931-936.
- [66] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970, 227, 680-&.
- [67] Wang, W., Bringe, N. A., Berhow, M. A., Gonzalez de Mejia, E., b-conglycinins among sources of bioactives in hydrolysates of different soybean varieties that inhibit leukemia cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 4012-4020.
- [68] Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y., I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 2010, 5, 725-738.

Referencias

- [69] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K., Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2010, 66, 486-501.
- [70] Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., Camacho, C. J., ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research* 2004, 32, W96-99.
- [71] London, N., Raveh, B., Cohen, E., Fathi, G., Schueler-Furman, O., Rosetta FlexPepDock web server--high resolution modeling of peptide-protein interactions. *Nucleic Acids Research* 2011, 39, W249-253.
- [72] Liang, J., Edelsbrunner, H., Woodward, C., Anatomy of protein pockets and cavities: measurement of binding site geometry and implications for ligand design. *Protein Sci* 1998, 7, 1884-1897.
- [73] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., *et al.*, UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004, 25, 1605-1612.
- [74] Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., *et al.*, The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acids Research* 2005, 33, W382-388.
- [75] Laskowski, R. A., PDBsum new things. *Nucleic Acids Research* 2009, 37, D355-359.
- [76] Glube, N., Giessl, A., Wolfrum, U., Langguth, P., Caki-1 cells represent an in vitro model system for studying the human proximal tubule epithelium. *Nephron Exp Nephrol* 2007, 107, e47-56.
- [77] Santos-Gonzalez, M., Gomez Diaz, C., Navas, P., Villalba, J. M., Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol* 2007, 42, 798-806.

Referencias

- [78] Barba de la Rosa, A. P., HerreraEstrella, A., Utsumi, S., ParedesLopez, O., Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J Plant Physiol* 1996, *149*, 527-532.
- [79] Tandang-Silvas, M. R., Cabanos, C. S., Carrazco Pena, L. D., De la Rosa, A. P., *et al.*, Crystal structure of a major seed storage protein, 11S proglobulin, from *Amaranthus hypochondriacus*: insight into its physico-chemical properties. *Food Chemistry* 2012, *135*, 819-826.
- [80] Wiedeman, P. E., DPPIV inhibition: promising therapy for the treatment of type 2 diabetes. *Prog Med Chem* 2007, *45*, 63-109.
- [81] Hiramatsu, H., Kyono, K., Higashiyama, Y., Fukushima, C., *et al.*, The structure and function of human dipeptidyl peptidase IV, possessing a unique eight-bladed beta-propeller fold. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, *302*, 849-854.
- [82] Kim, M. R., Kim, C. W., Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007, *849*, 203-210.
- [83] Condés, M. C., Scilingo, A. A., Añón, M. C., Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *Lwt-Food Sci Technol* 2009, *42*, 936-970.
- [84] Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gomez, M., Loarca-Piña, G., in: Guevara-González, R. G., Torres-Pacheco, I. (Eds.), *Advances in Agricultural and Food biotechnology*, Signpost, Kerala, India 2006, pp. 217-236.
- [85] Van Lanker, F., Adams, A., De Kimpe, N., Chemical modifications of peptides and their impact on food properties. *Chemical Reviews* 2011, *111*, 7876-7903.

Referencias

[86] Jeong, H. J., Jeong, J. B., Kim, D. S., Park, J. H., *et al.*, The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett* 2007, 255, 42-48.

[87] Motoi, H., Kodama, T., Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung* 2003, 47, 354-358.

[88] Dewar, D. H., Amato, M., Ellis, H. J., Pollock, E. L., *et al.*, The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006, 18, 483-491.

[89] McGough, N., Cummings, J. H., Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye. *Proc Nutr Soc* 2005, 64, 434-450.

[90] Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., Gallagher, E., Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends Food Sci Tech* 2010, 21, 106-113.

[91] Kwon, D. Y., Daily, J. W., 3rd, Kim, H. J., Park, S., Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr Res* 2010, 30, 1-13.

[92] Gonzalez de Mejia, E., Martinez-Villaluenga, C., Roman, M., Bringe, N. A., Fatty acid synthase and *in vitro* adipogenic response of human adipocytes inhibited by a and a' subunits of soybean b-gonglycinin hydrolysates. *Food Chem* 2010, 119, 1571-1577.

[93] Rahfeld, J., Schierhorn, M., Hartrodt, B., Neubert, K., Heins, J., Are diprotin A (Ile-Pro-Ile) and diprotin B (Val-Pro-Leu) inhibitors or substrates of dipeptidyl peptidase IV? *Biochim Biophys Acta* 1991, 1076, 314-316.

[94] Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Naganawa, H., *et al.*, Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* 1984, 37, 422-425.

Referencias

[95] Fadini, G. P., Albiero, M., Menegazzo, L., de Kreutzenberg, S. V., Avogaro, A., The increased dipeptidyl peptidase-4 activity is not counteracted by optimized glucose control in type 2 diabetes, but is lower in metformin-treated patients. *Diabetes Obes Metab* 2012, 14, 518-522.

[96] Mannucci, E., Pala, L., Ciani, S., Bardini, G., *et al.*, Hyperglycaemia increases dipeptidyl peptidase IV activity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2005, 48, 1168-1172.

[97] Blaslov, K., Bulum, T., Duvnjak, L., Circulating dipeptidyl peptidase-4 activity is associated with insulin resistance in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2015, 29, 390-394.

[98] Yang, J., Campitelli, J., Hu, G., Lin, Y., *et al.*, Increase in DPP-IV in the intestine, liver and kidney of the rat treated with high fat diet and streptozotocin. *Life Sci* 2007, 81, 272-279.

[99] Girardi, A. C., Fukuda, L. E., Rossoni, L. V., Malnic, G., Reboucas, N. A., Dipeptidyl peptidase IV inhibition downregulates Na⁺ - H⁺ exchanger NHE3 in rat renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 294, F414-422.

[100] Hillmeister, P., Persson, P. B., The Kallikrein-Kinin system. *Acta Physiol (Oxf)* 2012, 206, 215-219.

[101] Kaplan, A. P., Ghebrehiwet, B., The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 2010, 47, 2161-2169.

[102] Skidgel, R. A., Erdos, E. G., Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *Int Immunopharmacol* 2007, 7, 1888-1899.

[103] Koch, M., Wendorf, M., Dendorfer, A., Wolfrum, S., *et al.*, Cardiac kinin level in experimental diabetes mellitus: role of kininases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285, H418-423.

Referencias

- [104] Kwak, S. J., Paeng, J., Kim do, H., Lee, S. H., *et al.*, Local kallikrein-kinin system is involved in podocyte apoptosis under diabetic conditions. *Apoptosis* 2011, 16, 478-490.
- [105] Levy, J. H., Szlam, F., Tanaka, K. A., Sniecinski, R. M., Fibrinogen and hemostasis: a primary hemostatic target for the management of acquired bleeding. *Anesth Analg* 2012, 114, 261-274.
- [106] Mahendra, J. V., Kumar, S. D., Anuradha, T. S., Talikoti, P., *et al.*, Plasma Fibrinogen in Type 2 Diabetic Patients with Metabolic Syndrome and its Relation with Ischemic Heart Disease (IHD) and Retinopathy. *J Clin Diagn Res* 2015, 9, BC18-21.
- [107] Sleddering, M. A., Markvoort, A. J., Dharuri, H. K., Jeyakar, S., *et al.*, Proteomic analysis in type 2 diabetes patients before and after a very low calorie diet reveals potential disease state and intervention specific biomarkers. *PLoS One* 2014, 9, e112835.
- [108] Bhonsle, H. S., Korwar, A. M., Chougale, A. D., Kote, S. S., *et al.*, Proteomic study reveals downregulation of apolipoprotein A1 in plasma of poorly controlled diabetes: a pilot study. *Mol Med Rep* 2013, 7, 495-498.
- [109] Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., *et al.*, An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 2006, 7, 216.
- [110] Heit, C., Jackson, B. C., McAndrews, M., Wright, M. W., *et al.*, Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Hum Genomics* 2013, 7, 22.
- [111] Berger, A., Gremaud, G., Baumgartner, M., Rein, D., *et al.*, Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. *Int J Vitam Nutr Res* 2003, 73, 39-47.

Referencias

- [112] Farvin, K. H., Anandan, R., Kumar, S. H., Shiny, K. S., *et al.*, Cardioprotective effect of squalene on lipid profile in isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *J Med Food* 2006, 9, 531-536.
- [113] Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T. P., Maguire, A. R., O'Brien, N. M., Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. *Plant Foods Hum Nutr* 2007, 62, 85-91.
- [114] Plate, A. Y. A., Areas, J. A. G., Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chemistry* 2002, 76, 1-6.
- [115] de Castro, L. I., Soares, R. A., Saldiva, P. H., Ferrari, R. A., *et al.*, Amaranth oil increased fecal excretion of bile Acid but had no effect in reducing plasma cholesterol in hamsters. *Lipids* 2013, 48, 609-618.
- [116] Mendonca, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J., Areas, J. A. G., Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry* 2009, 116, 738-742.
- [117] Sundsten, T., Zethelius, B., Berne, C., Bergsten, P., Plasma proteome changes in subjects with Type 2 diabetes mellitus with a low or high early insulin response. *Clin Sci (Lond)* 2008, 114, 499-507.
- [118] Banzato, A., Pengo, V., Clinical relevance of beta(2)-glycoprotein-I plasma levels in antiphospholipid syndrome (APS). *Curr Rheumatol Rep* 2014, 16, 424.
- [119] Tailleux, A., Duriez, P., Fruchart, J. C., Clavey, V., Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002, 164, 1-13.
- [120] Maiga, S. F., Kalopissis, A. D., Chabert, M., Apolipoprotein A-II is a key regulatory factor of HDL metabolism as appears from studies with transgenic animals and clinical outcomes. *Biochimie* 2014, 96, 56-66.

Referencias

- [121] Villeneuve, S., Brisson, D., Marchant, N. L., Gaudet, D., The potential applications of Apolipoprotein E in personalized medicine. *Front Aging Neurosci* 2014, 6, 154.
- [122] Leininger-Muller, B., Siest, G., The rat, a useful animal model for pharmacological studies on apolipoprotein E. *Life Sci* 1996, 58, 455-467.
- [123] Ceron, J. J., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res* 2014, 10, 74.
- [124] van Himbergen, T. M., van Tits, L. J., Roest, M., Stalenhoef, A. F., The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med* 2006, 64, 34-38.
- [125] Rosenblat, M., Hayek, T., Aviram, M., Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* 2006, 187, 363-371.
- [126] Rock, W., Rosenblat, M., Miller-Lotan, R., Levy, A. P., *et al.*, Consumption of wonderful variety pomegranate juice and extract by diabetic patients increases paraoxonase 1 association with high-density lipoprotein and stimulates its catalytic activities. *J Agric Food Chem* 2008, 56, 8704-8713.
- [127] Rosenblat, M., Aviram, M., Paraoxonases role in the prevention of cardiovascular diseases. *Biofactors* 2009, 35, 98-104.
- [128] James, R. W., Deakin, S. P., The contribution of high density lipoprotein apolipoproteins and derivatives to serum paraoxonase-1 activity and function. *Adv Exp Med Biol* 2010, 660, 173-181.

Anexos

Anexo 1
Protocolos y fichas técnicas

Protocolos y fichas técnicas

Tabla 10. Composición de las dietas para animales de laboratorio

Ingrediente*	Dieta control	Dieta suplementada con amaranto
Contenido energético (Kcal/g)	3,1	3,166
Contenido energético (kJ/g)	13	12,896
Proteína (%)	18,6	18,08
Lípidos (%)	6,2	5,76
Hidratos de carbono (%)	3,5	8,332
Fibra cruda (%)	3,5	2,8
Cenizas (%)	5,3	4,24
Calcio (%)	1	0,8
Fosforo (%)	0,7	0,56
Sodio (%)	0,2	0,16
Potasio (%)	0,6	0,48
Cloro (%)	0,4	0,32
Magnesio (%)	0,2	0,16
Zinc (mg/kg)	70	56
Manganeso (mg/kg)	100	80
Cobre (mg/kg)	15	12
Yodo (mg/kg)	6	4,8
Hierro (mg/kg)	200	160
Selenio (mg/kg)	0,23	0,184
Amioácidos		
Acido aspártico (%)	1,4	1,12
Acido glutámico (%)	3,4	2,72
Alanina (%)	1,1	0,88
Glicina (%)	0,8	0,64
Treonina (%)	0,7	0,56
Prolina (%)	1,6	1,28
Serina (%)	1,1	0,88
Leucina (%)	1,8	1,44
Isoleucina (%)	0,8	0,64
Valina (%)	0,9	0,72
Fenilalanilalanina (%)	1	0,8
Tirosina (%)	0,6	0,48
Metionina (%)	0,6	0,48
Cisteína (%)	0,3	0,24
Lisina (%)	1,1	0,88
Histidina (%)	0,4	0,32
Arginina (%)	1	0,8
Triptofano (%)	0,2	0,16
Vitaminas		
Vitamina A (UI/g)	30	24

Protocolos y fichas técnicas

Vitamina D ₃ (UI/g)	2	1,6
Vitamina E (UI/kg)	135	108

Tabla 10. Continuación

Ingrediente*	Dieta control	Dieta suplementada con amaranto
Vitamina K (mg/kg)	100	80
Vitamina B ₁ (mg/kg)	117	93,6
Vitamina B ₂ (mg/kg)	27	21,6
Niacina (mg/kg)	115	92
Vitamina B ₆ (mg/kg)	26	20,8
Acido pantoténico (mg/kg)	140	112
Vitamina B ₁₂ (mg/kg)	0,15	0,12
Biotina (mg/kg)	0,9	0,72
Folato (mg/kg)	9	7,2
Colina (mg/kg)	1200	960
Acidos grasos (%)	0,7	0,56
Palmítico C16:0 (%)	0,2	0,16
Estearico C18:0 (%)	1,2	0,96
Oleico C18:1ω9 (%)	3,1	2,48
Linoleico C18:3ω3 (%)	0,3	0,24
Saturados (%)	0,9	0,72
Monoinsaturados (%)	1,3	1,04
Poliinsaturados (%)	3,4	2,72

* Contenido calculado de acuerdo con la información nutrimental reportada en cada producto

Protocolos y fichas técnicas

Cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay)

Fundamento

Es un método simple para la determinación de la concentración de proteína solubilizada. Involucra la adición de un colorante ácido a la solución de proteína y una subsecuente lectura a 595 nm con un espectrofotómetro o un lector de microplacas. La comparación con una curva estándar provee una medida relativa de la concentración de proteína. Ocurre un cambio diferencial en el colorante en respuesta a varias concentraciones de proteína. La absorbancia máxima para una solución ácida del colorante azul de Coomassie G-250 cambia de 465 a 595 nm cuando existe una unión con proteína. El colorante azul de Coomassie se une principalmente a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente argininas. Se ha encontrado que el coeficiente de extinción de una solución del complejo colorante-albúmina es constante en un rango de concentración de más de diez veces. Por lo tanto, la ley de Beer puede aplicarse para una cuantificación precisa de proteína al seleccionar un radio apropiado de volumen de colorante con respecto a la concentración de la muestra.

Procedimiento para microplacas

1. Preparar el colorante diluyendo 1 parte de colorante con 4 partes de agua desionizada. Filtrar a través de un papel filtro o equivalente para remover partículas. Este colorante diluido puede ser usado por 2 semanas si se guarda a temperatura ambiente.
2. Preparar de tres a cinco diluciones de un estándar de proteína, el cual es representativo de la solución de proteína que se desea medir y por tanto debe de diluirse en la misma solución en la que se encuentran las muestras. El rango lineal para este ensayo en microplaca es de 0.2 a 0.9 mg/ml aproximadamente. Las soluciones de proteína normalmente son evaluadas por duplicado o triplicado
3. Pipetear 4 uL de cada muestra o estándar a los pozos de la microplaca

Protocolos y fichas técnicas

4. Agregar 200 uL de colorante diluido a cada pozo. Mezclar el reactivo con la muestra por agitación o pipeteo
5. Incubar a temperatura ambiente al menos 15 min. La absorbancia aumentara conforme el tiempo; las muestras deben incubarse a temperatura ambiente por no más de una hora
6. Leer la absorbancia a 595nm
7. Graficar los estándares de BSA o IgG (Absorbancia a 595nm vs Concentración) para posteriormente interpolar las lecturas de las muestras en la curva estándar

Protocolos y fichas técnicas

Cuantificación de proteína soluble por el método de Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay)

Fundamento

El ensayo se basa en la reacción de la proteína con una solución alcalina de tartarato de cobre y reactivo de Folin. Hay dos pasos que llevan al desarrollo de color. La reacción entre la proteína y el cobre en medio alcalino y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por el cobre tratado con la proteína. El desarrollo de color se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptófano, y en menor medida a la cistina, cisteína e histidina. Las proteínas ejercen una reducción en el reactivo de Folin por la pérdida de 1, 2 o 3 átomos de oxígeno, produciendo así una o más de varias especies reducidas posibles, que tienen un color azul característico con un máximo de absorbancia a 750 nm y un mínimo a 405 nm

Procedimiento para microplacas

1. Preparar de tres a cinco diluciones de un estándar de proteína de 0.2 a 1.5 mg/mL. Se debe preparar una curva estándar cada vez que haga el ensayo. Para mejores resultados, los estándares deben siempre prepararse en la misma solución que la muestra
2. Pipetear 5 uL de los estándares y las muestras a tubos nuevos y secos
3. Agregar 25 uL de reactivo A a cada tubo y mezclar en vortex
4. Agregar 200 uL de reactivo B a cada tubo y mezclar en vortex inmediatamente
5. Después de 15 min, se pueden leer las absorbancias a 750 nm. Las absorbancias serán estables al menos una hora
6. Graficar los estándares de BSA o IgG (Absorbancia a 595nm vs Concentración) para posteriormente interpolar las lecturas de las muestras en la curva estándar

Protocolos y fichas técnicas

Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie coloidal

- Solución stock de Azul de Coomassie G-250 al 5% en agua bidestilada. Agitar por unos minutos para dispersar el colorante. El colorante no se disolverá completamente.
 - Solución stock de Azul de Coomassie G-250 coloidal: Sulfato de amonio al 10%, ácido fosfórico al 1% p/p, azul de Coomassie G-250 al 0.1%.
 - Solución de teñido de Azul de Coomassie G-250 coloidal: Sulfato de amonio al 8%, ácido fosfórico al 0.8%, azul de Coomassie G-250 al 0.08%, metanol al 20%. Preparar esta solución antes de teñir el gel
1. Fijar el gel al menos 30 min en una solución con ácido acético al 10% y etanol al 40%
 2. Decantar la solución de fijado y colocar la solución de teñido recién preparada (100-300 mL por gel, dependiendo del tamaño)
 3. Teñir toda la noche o más. La tinción se intensifica gradualmente hasta por 7 días
 4. Enjuagar el gel repetidamente con agua para remover el colorante residual
 5. Si se va a secar el gel, sumergirlo previamente en una solución de glicerol al 5% y etanol al 20% por no más de 30 min

Protocolos y fichas técnicas

Tinción de geles de poliacrilamida con Sypro® Ruby Protein Gel Stain

- Realizar los pasos de fijado, teñido y lavado en agitación continua y suave en un agitador orbital.
- Los contenedores de teñido deben estar muy limpios. Se recomienda enjuagarlos previamente con etanol. No utilizar contenedores de vidrio. Se recomiendan recipientes de polipropileno o policarbonato.
- El volumen mínimo de tinción recomendado es aproximadamente 10 veces el volumen del gel.
- Cubrir el contenedor del gel durante la tinción y en pasos subsecuentes para protegerlo de la luz.

Solución de fijado para geles 1D: Metanol al 50%, ácido acético al 7%.

Solución de fijado para geles 2D: Metanol al 40%, 10% ácido tricloro acético

Solución de lavado: Metanol al 10%, ácido acético al 7%

1. Fijar el gel con solución de fijado por 30 min. Repetir una vez más con solución nueva. Para geles de isoelectroenfoque fijar por 3 horas y lavar 3 veces con agua ultrapura por 10 min
2. Teñir con el colorante toda la noche
3. Transferir el gel a un recipiente limpio y lavarlo con solución de lavado por 30 min. Es necesario enjuagar el gel en agua antes de capturar la imagen del gel para prevenir corrosión al aparato

Protocolos y fichas técnicas

Extracción de ARN con el reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific Inc.)

Nota: Al trabajar con el reactivo Trizol usar guantes y lentes de protección. Evitar el contacto con la piel o ropa. Si es posible, trabajar en una campana de extracción y evitar respirar los vapores.

Reactivos:

- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75% (en agua tratada con DEPC)
- Agua libre de ARNsas. Para prepararla utilizar frascos limpios, agregar dietilpirocarbonato (DEPC) a una concentración 0.01% (v/v), agitar toda la noche y esterilizarla.

Nota: Todo el procedimiento se lleva a cabo de 15 a 30°C a menos que se indique lo contrario

1. Determinar el tipo de muestra. El volumen de la muestra no debe de exceder el 10% del volumen del reactivo Trizol usado para la homogenización. Hay que tener cuidado de usar la cantidad apropiada de reactivo, de lo contrario puede haber contaminación de ADN en la muestra de ARN aislado.

Para tejidos agregar 1 mL de Trizol por cada 50-100 mg de muestra de tejido y homogenizar con un homogenizador de vidrio-teflon. Procesar inmediatamente después de coleccionar el tejido o congelarlo.

Para células adherentes en monocapa lisar las células directamente en la placa de cultivo agregando 1 mL de reactivo Trizol a una placa de 3.5 cm de diámetro y pasar el lisado varias veces por una pipeta. La cantidad de reactivo agregado está basada en el área del plato de cultivo y no en el número de células presentes (1 mL por cada 10 cm²)

Protocolos y fichas técnicas

Para suspensiones celulares coleccionar las células por centrifugación y retirar el medio. Agregar 0.75 mL de trizol por cada 0.25 mL de muestra. Lisar las células por pipeteo

2. Remover el material insoluble del homogenado centrifugando a 12000 x *g* por 10 min de 2 a 8 °C. En caso de que la muestra presente mucha grasa, se crea una capa oleosa que debe ser removida. Transferir la solución con el ARN en un tubo nuevo.
3. Incubar las muestras homogenizadas por 5 min para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteínicos.
4. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada ml de Trizol, agitar vigorosamente con la mano por 15 s e incubar por 2 o 3 min
5. Centrifugar a no más de 12000 x *g* por 10 min de 2 a 8°C. La mezcla se separa en una fase roja de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa incolora superior. El ARN se encuentra en la fase acuosa. El volumen de la fase acuosa es aproximadamente el 60% del volumen de Trizol utilizado en la homogenización.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Si se desea se puede guardar la fase orgánica para extraer el ADN o las proteínas
7. Agregar 0.5 mL de isopropanol por cada ml de Trizol usado, mezclar e incubar por 10 min
8. Centrifugar a no más de 12000 x *g* por 10 min de 2 a 8°C. Desechar el sobrenadante
9. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 75% por cada ml de Trizol utilizado y mezclar en vortex
10. Centrifugar a no más de 7500 x *g* por 5 min de 2 a 8°C. Desechar el sobrenadante.
11. Secar la pastilla de ARN. Es importante no dejar que la pastilla se seque completamente ya que esto afecta su solubilidad.
12. Disolver el ARN en agua libre de RNAsas y guardar a -70°C. Muestras de ARN parcialmente disueltas tienen un radio $Abs_{260/280} < 1.6$

Protocolos y fichas técnicas

Notas:

1. Para purificar el ARN de cantidades pequeñas de muestra (10^2 a 10^4 células): Agregar 0.8 mL de Trizol. Después de la lisis, agregar cloroformo y seguir con la separación de fases del paso 3. Antes de la precipitación con isopropanol agregar de 5 a 10 μ g de glicógeno libre de RNAsas como un acarreador de la fase acuosa. Para reducir la viscosidad, disgregar el ADN genómico pasándolo dos veces por una jeringa de 26 calibres antes de agregar el cloroformo. El glicógeno permanece en la fase acuosa y es co-precipitado con el ARN. No inhibe la síntesis de ADNc a concentraciones de hasta 4 mg/mL y no inhibe la PCR.
2. Después de la homogenización y antes de agregar el cloroformo, las muestras pueden almacenarse de -60 a -70°C por un mes. El precipitado de RNA puede almacenarse en etanol al 75% por una semana de 2 a 8°C o un año de -5 a -20°C
3. .Se pueden cambiar las velocidades de centrifugación a 2600 x *g* si se incrementa el tiempo de 30 a 60 min en los pasos 5 y 8

Protocolos y fichas técnicas

Protocolo para la eliminación de proteínas abundantes en plasma utilizando el kit ProteoMiner Large-Capacity (Bio,Rad No. 163-3007)

El kit contiene los reactivos necesarios para procesar 10 muestras. Es compatible con electroforesis 2D.

Guardar el kit a 4°C. Después de haber reconstituido el reactivo de elución liofilizado, guardar el material restante a -20°C hasta una semana.

Preparación del reactivo

Para preparar el reactivo de elución agregue 610 µL de reactivo de rehidratación a un vial de reactivo de elución liofilizado. Después de la rehidratación, cada vial contendrá suficiente reactivo para procesar dos muestras. Si se va a preparar un número impar de columnas, quedará material que será requerido para preparaciones subsecuentes. El material restante puede almacenarse a -20°C hasta por una semana. Sin embargo, es recomendable usar solución fresca cada vez que utilice el kit.

Consideraciones de la muestra

El kit ha sido optimizado para muestras de suero y plasma (no heparinizado). La cantidad de muestra y la compatibilidad del buffer no han sido validadas para otros tipos de muestras. Sin embargo, ya se ha reportado el uso de este kit en otras muestras como orina, bilis, plaquetas, extracto de glóbulos rojos y clara de huevo.

Resultados con otros tipos de muestra variarán dependiendo de la cantidad de proteína presente en la muestra; se obtienen mejores resultados con 50 mg de proteína. **Precaución: Es importante seguir los lineamientos para el procesamiento de muestras biológico infecciosas cuando se trabaje con suero/plasma humano.**

La relación proteína-perlas es crucial para el desempeño óptimo del kit. El rango dinámico de la concentración de proteína en la muestra se reduce cuando las

Protocolos y fichas técnicas

proteínas abundantes saturan sus ligandos y las proteínas poco abundantes se unen a un número suficiente de ligandos para permitir el enriquecimiento. Por tanto, para obtener resultados óptimos, es importante cargar la cantidad de proteína recomendada.

Protocolo

Este protocolo ha sido optimizado para muestras de suero o plasma con una concentración de proteína mayor a 50 mg/mL.

Preparación de la columna

1. Primero remover la tapa superior y después la inferior de las columnas que se vayan a utilizar.

Nota: No desechar las tapas. Si hay perlas en la tapa superior, volverla a colocar después de retirar el tapón inferior y centrifugar con la tapa superior en la columna. Para usar la tapa inferior como tapón, invertir y firmemente colocar en el fondo de la columna.

2. Colocar la columna en un tubo de colección sin tapa y centrifugar a 1000 x g de 30 a 60 s para remover la solución de almacenamiento. Desechar el material colectado.

Nota: El kit contiene un tubo de colección sin tapa por cada columna para los siguientes pasos: preparación de la columna, unión de la muestra y lavado de la muestra. El kit contiene un tubo de colección con tapa por cada columna para ser usado en el paso de elución, permitiendo un fácil almacenamiento de la muestra eluida.

3. Volver a colocar la tapa inferior y agregar 600 μ L de buffer de lavado, luego volver a colocar la tapa superior.
4. Rotar la columna de un lado a otro varias veces por un periodo de 5 min.
5. Retirar la tapa inferior, colocar la columna en un tubo de colección sin tapa y centrifugar a 1000 x g de 30 a 60 s para remover el buffer de lavado. Desechar el material colectado.

Protocolos y fichas técnicas

6. Repetir pasos 3 y 4.
7. Retirar las tapas, colocar la columna en un tubo de colección sin tapa y centrifugar a 1000 x *g* de 30 a 60 s para remover el buffer de lavado. Desechar el material colectado.
8. Volver a colocar la tapa inferior en la columna. La columna ahora contiene 100 μ L de las perlas asentadas y esta lista para unir la muestra.

Unión de la muestra

Las muestras no deben tener precipitados. De ser necesario, centrifugar las muestras a 10000 x *g* por 10 min. Evitar las proteínas agregadas en el fondo y la capa lipídica superior al momento de recuperar la muestra. Se recomienda agregar a la columna al menos 1 mL de muestra (con una concentración de proteína mayor a 50 mg/mL), ya que con volúmenes menores no se obtendrán resultados óptimos.

1. Agregar 1 mL de muestra a la columna. Volver a colocar la tapa superior y rotar la columna en una plataforma o en un agitador rotacional por 2 h a temperatura ambiente.

Nota: Si se usa plasma puede haber algutinación después de 1 h; esto es normal y no tendrá un impacto negativo en la preparación de la muestra. Plasma heparinizado no es compatible con este kit.

Lavado de la muestra

1. Retirar la tapa inferior, colocar la columna en un tubo de colección sin tapa y centrifugar a 1000 x *g* de 30 a 60 s. Desechar el material colectado.
2. Volver a colocar la tapa inferior y agregar 600 μ L de buffer de lavado a la columna. Volver a colocar la tapa superior y rotar de un extremo a otro varias veces en un periodo de 5 min.
3. Remover la tapa inferior, colocar la columna en un tubo de colección y centrifugar a 1000 x *g* de 30 a 60 s. Desechar el material colectado.
4. Repetir los pasos 2 y 3 tres veces.

Protocolos y fichas técnicas

Elución

1. Después de haber removido todo el buffer de lavado, volver a colocar la tapa inferior y agregar 600 μL de agua desionizada.
2. Colocar la tapa superior y rotar de un extremo a otro por 1 min.
3. Retirar las tapas, colocar la columna en un tubo de colección sin tapa y centrifugar a 1000 x g de 30 a 60 s para remover el agua. Desechar el material colectado
4. Colocar la tapa inferior a la columna (asegurarse de que la tapa este bien asegurada). Agregar 100 μL de reactivo de elución rehidratado a la columna y volver a colocar la tapa superior. Agitar ligeramente en vortex por 5 s.
5. Incubar la columna a temperatura ambiente y agitar ligeramente en el vortex varias veces en un periodo de 15 min.
6. Retirar las tapas, colocar la columna en un tubo de colección con la etiqueta E1 y centrifugar a 1000 x g de 30 a 60 s. Este tubo contiene las proteínas eluidas, no desechar.
7. Repetir los pasos 5 y 6 dos veces. (Las eluciones pueden colectarse en conjunto o analizarse individualmente. Si se van a analizar individualmente, serán necesarios más tubos de colección que no vienen en el kit.)
8. Almacenar las elución a -20°C o proceder o con el análisis posterior. (Para mejores resultados, se recomienda limpiar la muestra antes de analizarla.)

Protocolos y fichas técnicas

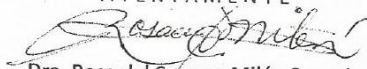


30 de Mayo de 2013

EBC JUAN MANUAL VARGAS MORALES
PROFESOR INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
PRESENTE

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL AMARANTO CRUDO Y REVENTADO SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO EN RATAS NORMOGLUCÉMICAS Y DIABÉTICAS, el Comité de Investigación y Docencia (CEID) por mi conducto le informa que una vez que se revisaron las modificaciones y sugerencias observadas en el documento original, la decisión ha sido de dictaminar este protocolo APROBADO, al cual se aplicarán los criterios de seguimiento especificados en el reglamento del CEID (Art. 13).

ATENTAMENTE



Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
Presidenta del CEID



FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS
Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria - CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 21 40 al 46
fax (444) 826 2372
www.uaslp.mx

ccp archivo

Protocolos y fichas técnicas

COD 12503 10 x 50 mL
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para medir la concentración de glucosa Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

GLUCOSE

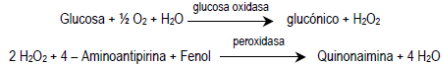


GLUCOSA

GLUCOSA OXIDASA/PEROXIDASA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La glucosa presente en la muestra origina, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría¹.



COMPOSICIÓN

A. Reactivo: 10 x 50 mL. Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 U/mL, peroxidasa > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, pH 7,5

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

El Reactivo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserve bien cerrado y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivo: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco superior a 0,150 a 500 nm (cubeta de 1 cm).

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El Reactivo está listo para su uso.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. El suero o plasma deben separarse de los elementos celulares lo antes posible para evitar la glucólisis. La adición de fluoruro sódico a la muestra de sangre previene la glucólisis.

La glucosa en suero o plasma es estable 5 días a 2-8°C. Los anticoagulantes como la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro no interfieren.

VALORES DE REFERENCIA

Suero y plasma²:

Neonato, prematuro	25-80 mg/dL = 1,39-4,44 mmol/L
Neonato, a término	30-90 mg/dL = 1,67-5,00 mmol/L
Niños, adultos	70-105 mg/dL = 3,89-5,83 mmol/L

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

Según el National Diabetes Data Group (US)³, valores de glucosa plasmática en ayunas superiores a 140 mg/dL (7,77 mmol/L) obtenidos en más de una ocasión, permiten el diagnóstico de diabetes mellitus.

CALIBRACIÓN

Se recomienda el uso de un calibrador con base de suero (Calibrador de Bioquímica, cod. 18011).

PARÁMETROS DEL ENSAYO

		A25	A15	
GENERAL	Test name	GLUCOSE	GLUCOSE	
	Analysis mode	endpoint mon.	endpoint mon.	
	Sample type	serum	serum	
	Units	mg/dL	mg/dL	
	Reaction type	increasing	increasing	
	Decimals	0	0	
	Replicates	1	1	
Name of assoc. constituent		-	-	
PROCEDURE	Type of reading	bichrom.	bichrom.	
	Volumes			
	Sample	3	3	
	Reagent 1	300	300	
	Reagent 2	-	-	
	Washing	1.2	1.2	
	Predilution factor	-	-	
	Filters	Main	505	505
		Reference	670	670
	Times	Reading 1	300 s	312 s
Reading 2		-	-	
Reagent 2		-	-	
Postdilution factor		2	2	
CALIBRATION	Type of calibration	multiple	multiple	
	Calibrator replicates	3	3	
	Blank replicates	3	3	
	Calibration curve	-	-	
OPTIONS	Blank absorbance limit	0.150	0.150	
	Kinetic blank limit	-	-	
	Linearity limit	500	500	

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Sueros Control Bioquímica niveles I (cod. 18005, 18009 y 18042) y II (cod. 18007, 18010 y 18043), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Los datos siguientes se obtuvieron usando un analizador A25. Los resultados son similares a los del A15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

- Límite de detección: 1,6 mg/dL = 0,08 mmol/L

- Límite de linealidad: 500 mg/dL = 27,5 mmol/L

- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
84 mg/dL = 4,66 mmol/L	1,3 %	20
260 mg/dL = 14,43 mmol/L	1,5 %	20

- Reproducibilidad (inter-serie):

Concentración media	CV	n
84 mg/dL = 4,66 mmol/L	1,2 %	25
260 mg/dL = 14,43 mmol/L	1,4 %	25

- Veracidad: Los resultados obtenidos con este procedimiento no mostraron diferencias sistemáticas cuando se compararon con un procedimiento de referencia. Los detalles de los experimentos de comparación están disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: la hemoglobina (>3 g/L), la lipemia (triglicéridos >1,25 g/L) y la bilirrubina (10 mg/dL) interfieren. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir⁴.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La glucosa es la principal fuente de energía del organismo. La insulina, producida en las células de los islotes del páncreas, facilita la entrada de glucosa en las células de los tejidos. Una deficiencia de insulina o una disminución de su actividad ocasiona un aumento de la glucosa en sangre.

Se encuentran concentraciones elevadas de glucosa en suero o plasma en pacientes con diabetes mellitus (dependiente de insulina o no dependiente de insulina) y con otras condiciones o síndromes^{3,5}.

La hipoglucemia puede darse como respuesta al ayuno, o bien puede ser debida a fármacos, venenos, errores congénitos del metabolismo o gastrectomía previa^{2,5}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 1969; 6: 24-27.
- Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
- National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
- Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACCC Press, 1995.
- Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACCC Press, 1997.

Protocolos y fichas técnicas

COD 11805 1 x 50 mL	COD 11505 1 x 200 mL	COD 11506 1 x 500 mL	COD 11539 1 x 1 L
CONSERVAR A 2-8°C			
Reactivos para medir la concentración de colesterol Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico			

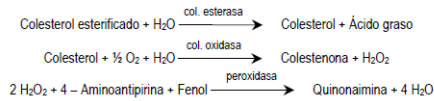
CHOLESTEROL



COLESTEROL
COLESTEROL OXIDASA/PEROXIDASA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Tanto el colesterol libre como el esterificado presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría^{1,2}.



CONTENIDO

	COD 11805	COD 11505	COD 11506	COD 11539
A. Reactivo	1 x 50 mL	1 x 200 mL	1 x 500 mL	1 x 1 L
S. Patrón	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL

COMPOSICIÓN

A. Reactivo. Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0.

S. Patrón de Colesterol. Colesterol 200 mg/dL (5,18 mmol/L). Patrón primario acuoso.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

El Reactivo y el Patrón son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivo: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco superior a 0,200 a 500 nm (cubeta de 1 cm).
- Patrón: Presencia de partículas o turbidez.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tanto el Reactivo como el Patrón están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C
- Analizador, espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 500 ± 20 nm

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar.

El colesterol en suero o plasma es estable 7 días a 2-8°C. Pueden utilizarse como anticoagulantes la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro.

PROCEDIMIENTO

1. Atemperar el Reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en tubos de ensayo: (Nota 1)

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón Colesterol (S)	—	10 µL	—
Muestra	—	—	10 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

CÁLCULOS

La concentración de colesterol en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Si se utiliza para calibrar el Patrón de Colesterol suministrado (Nota 2):

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	x 200 = mg/dL colesterol
	x 5,18 = mmol/L colesterol

VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes valores discriminantes universales han sido establecidos por el US National Cholesterol Education Program y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias³.

Hasta 200 mg/dL = 5,2 mmol/L	Óptimo
200-239 mg/dL = 5,2-6,21 mmol/L	Moderado
> 240 mg/dL = > 6,24 mmol/L	Elevido

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Sueros Control Bioquímica niveles I (cod. 18005, 18009 y 18042) y II (cod. 18007, 18010 y 18043), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 0,3 mg/dL = 0,008 mmol/L
- Límite de linealidad: 1000 mg/dL = 26 mmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.
- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
121 mg/dL = 3,13 mmol/L	1,1 %	20
257 mg/dL = 6,66 mmol/L	0,9 %	20

- Reproducibilidad (inter-serie):

Concentración media	CV	n
121 mg/dL = 3,13 mmol/L	1,9 %	25
257 mg/dL = 6,66 mmol/L	1,0 %	25

- Sensibilidad analítica: 1,75 mA·dL/mg = 67,6 mA·L/mmol
 - Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia (Nota 2). Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
 - Interferencias: La hemoglobina (>5 g/L) y la bilirrubina (>10 mg/dL) interfieren. La lipemia (triglicéidos 10 g/L) no interfiere. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir⁴.
- Estos datos han sido obtenidos utilizando un analizador. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o realizar el procedimiento manualmente

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

El colesterol es un esteroide de alto peso molecular que contiene una estructura ciclopentanofenántreno. El colesterol de la dieta se absorbe parcialmente y también se sintetiza en el hígado y otros tejidos. El colesterol se transporta en el plasma en las lipoproteínas. Se excreta a la bilis como tal o tras su transformación en ácidos biliares.

Las concentraciones elevadas de colesterol se asocian con un riesgo progresivamente creciente de aterosclerosis y enfermedad de las arterias coronarias^{5,6}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Este reactivo puede utilizarse en la mayoría de analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.
2. La calibración con el patrón acuoso suministrado puede causar sesgos, especialmente en algunos analizadores. En estos casos, se recomienda calibrar usando un patrón de base seca (Calibrador Bioquímica, cod. 18011 y 18044).

BIBLIOGRAFÍA

1. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W and Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974; 20: 470-475.
2. Meattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G and Tartì P. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem* 1978; 24: 2161-2165.
3. National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

Protocolos y fichas técnicas

COD 11828 1 x 50 mL	COD 11528 4 x 50 mL	COD 11529 2 x 250 mL
CONSERVAR A 2-8°C		
Reactivos para medir la concentración de triglicéridos Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico		

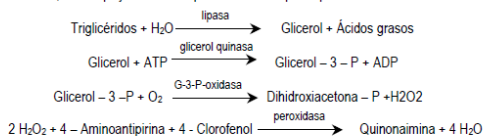
TRIGLYCERIDES



TRIGLICERIDOS
GLICEROL FOSFATO OXIDASA/PEROXIDASA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los triglicéridos presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría^{1,2}.



CONTENIDO

	COD 11828	COD 11528	COD 11529
A. Reactivo	1 x 50 mL	4 x 50 mL	2 x 250 mL
S. Patrón	1 x 5 mL	1 x 5 mL	1 x 5 mL

COMPOSICIÓN

A. Reactivo: Pipes 45 mmol/L, 4 - clorofenol 6 mmol/L, cloruro magnésico 5 mmol/L, lipasa > 100 U/mL, glicerol quinasa > 1,5 U/mL, glicerol-3-fosfato oxidasa > 4 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/L, pH 7,0.

S. Patrón de Triglicéridos: Glicerol equivalente a trioleína 200 mg/dL (2,26 mmol/L). Patrón primario acuoso.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

El Reactivo y el Patrón son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivo: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco superior a 0,150 a 500 nm (cubeta de 1 cm).
- Patrón: Presencia de partículas o turbidez.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Tanto el Reactivo como el Patrón están listos para su uso.

EQUIPO ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C
- Analizador, espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 500 ± 20 nm

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar.

Los triglicéridos en suero o plasma son estables 5 días a 2-8°C. Los anticoagulantes como la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro no interfieren.

PROCEDIMIENTO

- Atemperar el Reactivo a temperatura ambiente.
- Pipetear en tubos de ensayo: (Nota 1)

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón Triglicéridos (S)	—	10 µL	—
Muestra	—	—	10 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien e incubar los tubos durante 15 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

CÁLCULOS

La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Si se utiliza para calibrar el Patrón de Triglicéridos suministrado (Nota 2):

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}}$	x 200 = mg/dL triglicéridos
	x 2,26 = mmol/L triglicéridos

VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes valores discriminantes universales han sido establecidos por el US National Institutes of Health y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo³.

Hasta 150 mg/dL = 1,7 mmol/L	Bajo
150-199 mg/dL = 1,70-2,25 mmol/L	Dudoso
200-499 mg/dL = 2,26-5,64 mmol/L	Alto
> 500 mg/dL => 5,65 mmol/L	Muy alto

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Sueros Control Bioquímica niveles I (cod. 18005, 18009 y 18042) y II (cod. 18007, 18010 y 18043), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 1,6 mg/dL = 0,018 mmol/L
- Límite de linealidad: 600 mg/dL = 6,78 mmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/4 con agua destilada y repetir la medición.
- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
100 mg/dL = 1,13 mmol/L	1,7 %	20
245 mg/dL = 2,77 mmol/L	0,7 %	20

- Reproducibilidad (inter-serie):

Concentración media	CV	n
100 mg/dL = 1,13 mmol/L	2,6 %	25
245 mg/dL = 2,77 mmol/L	1,7 %	25

- Sensibilidad analítica: 1,2 mA dL/mg = 112 mA-L/mmol
- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia (Nota 2). Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Interferencias: La hemoglobina (10 g/L) no interfiere. La bilirrubina (2,5 mg/dL) interfiere. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir.

Estos datos han sido obtenidos utilizando un analizador. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o realizar el procedimiento manualmente.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Los triglicéridos son ésteres de glicerol y ácidos grasos que provienen de la dieta o son sintetizados principalmente en el hígado. Los triglicéridos se transportan en el plasma en las lipoproteínas y son utilizados por el tejido adiposo, músculo y otros. Su principal función es suministrar energía a la célula.

Las concentraciones elevadas de triglicéridos en suero pueden ser debidas a alteraciones hepato biliares, diabetes mellitus, nefrosis, hipotiroidismo, alcoholismo, hiperlipoproteinemia familiar IV y V y otras^{3,5}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

- Estos reactivos pueden utilizarse en la mayoría de analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.
- La calibración con el patrón acuoso suministrado puede causar sesgos, especialmente en algunos analizadores. En estos casos, se recomienda calibrar usando un patrón de base sérica (Calibrador Bioquímica, cod. 18011 y 18044).

BIBLIOGRAFÍA

- Bucolo G and David H. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem* 1973; 19: 476-482.
- Fossati P and Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem* 1982; 28: 2077-2080.
- National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

Protocolos y fichas técnicas

COD 11557 1 x 80 mL
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para medir la concentración de colesterol HDL Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

CHOLESTEROL HDL DIRECT

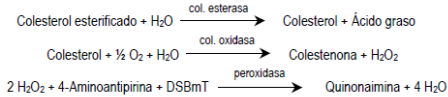


COLESTEROL HDL
DIRECTO
DETERGENTE



FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por la colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo B solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación¹.



CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- A. Reactivo. 1 x 80 mL. Buffer Good, colesterol oxidasa < 1 U/mL, peroxidasa < 1 U/mL, N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina (DSBmT) 1 mmol/L, acelerador 1 mmol/L.
- B. Reactivo. 1 x 20 mL. Buffer Good, colesterol esterasa < 1.5 U/mL, 4-aminoantipirina 1 mmol/L, ascobato oxidasa < 3.0 KU/L, detergente.
- S. Calibrador HDL/LDL. Suero humano. La concentración viene indicada en la etiqueta del vial. Todos los componentes de origen humano han resultado ser negativos para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro: Presencia de partículas, turbidez.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para su uso.

Calibrador HDL/LDL: reconstituir con 1,0 mL de agua destilada. Estable 1 semana a 2-8°C o bien durante 2 meses a -18°C congelado en alícuotas.

EQUIPO ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C

- Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostabilizable a 37°C para lecturas a (longitud de onda principal) 600 ± 20 nm y (longitud de onda secundaria) 700 nm ± 20 nm

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar.

El Colesterol HDL en suero o plasma es estable 7 días a 2-8°C. Como anticoagulante puede utilizarse EDTA, litio o heparina sódica.

PROCEDIMIENTO

1. Precalear los reactivos a 37°C durante unos minutos.
2. Pipetear en una cubeta (Nota 1)

Reactivo A	750 µL
Muestra/Calibrador	7 µL

3. Mezclar e insertarla en el portacubetas termostabilizado a 37°C. Poner el cronómetro en marcha. A los 5 minutos, leer la absorbancia (A₁) a 600/700 nm frente a agua destilada.

4. Pipetear en la cubeta:

Reactivo B	250 µL
------------	--------

Mezclar.

5. Después de 5 minutos, leer la absorbancia (A₂) a 600/700 nm.

CÁLCULOS

La concentración de colesterol HDL se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{Muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{Calibrador}}} \times C_{\text{Calibrador}} = C_{\text{Muestra}}$$

VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de colesterol de HDL varían considerablemente con la edad y el sexo. El siguiente valor discriminante ha sido recomendado para identificar individuos con elevado riesgo de enfermedad coronaria².

Hasta 35 mg/dL = 0,91 mmol/L	Riesgo elevado
> 60 mg/dL = > 1,56 mmol/L	Riesgo bajo

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Sueros Control de Lípidos niveles I (cod. 18040) y II (cod. 18041) para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 0,5 mg/dL = 0,01 mmol/L.
- Límite de linealidad: 200 mg/dL = 5,18 mmol/L.
- Repetibilidad (intra-serie):

Concentración media	CV	n
32,9 mg/dL = 0,85 mmol/L	0,8 %	20
50,6 mg/dL = 1,31 mmol/L	0,5 %	20

- Reproducibilidad (inter-serie):

Concentración media	CV	n
32,8 mg/dL = 0,85 mmol/L	1,3 %	40
50,0 mg/dL = 1,30 mmol/L	1,5 %	40

- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: Hemoglobina (10 g/L), lipemia (triglicéridos 18 g/L) y la bilirrubina (60 mg/dL) no interfieren. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir³.

Estos datos han sido obtenidos utilizando un analizador. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o realizar el procedimiento manualmente.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Las HDL participan en la captación del colesterol de los tejidos y en su transporte hacia el hígado donde se elimina en forma de ácidos biliares.

Existe una correlación positiva entre concentraciones bajas de HDL-colesterol en plasma y la incidencia de aterosclerosis, base del infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares^{4,5}.

Existen diversos estados patológicos o influencias ambientales asociados con niveles reducidos de HDL: enfermedades hepatocelulares agudas o crónicas, hiperalimentación intravenosa, malnutrición severa, diabetes, anemia crónica, alteraciones mieloproliferativas, enfermedad de Tangier, anafalipoproteinemia, estrés agudo, algunos medicamentos y el tabaco^{4,5}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Se pueden modificar los volúmenes de muestra y reactivos, manteniendo la misma proporción.
2. Estos reactivos pueden utilizarse en la mayoría de analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Warnick GR, Nauck M., Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem* 2001; 47: 1579-96.
2. National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
4. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.



Cell Line Designation: Caki-1
ATCC® Catalog No. HTB-46

Table of Contents:

- Cell Line Description
- Biosafety Level
- Use Restrictions
- Handling Procedure for Frozen Cells
- Handling Procedure for Flask Cultures
- Medium Renewal
- Complete Growth Medium
- Cryoprotectant Medium
- References
- Replacement Policy
- Specific Batch Information

Cell Line Description

Organism: *Homo sapiens* (human)
Tissue: clear cell carcinoma; kidney; metastatic site: skin
Age: 49 years
Gender: male
Ethnicity: Caucasian
Morphology: epithelial
Growth properties: adherent
Tumorigenic: yes, in nude mice; forms clear cell carcinoma in nude mice consistent with renal primary; also forms tumors in steroid treated hamsters
AntigenExp: Blood Type O; Rh-; HLA A9, B12, Bw35
Depositors: J. Fogh
Comments: Ultrastructural features include many microvilli, few filaments, many small mitochondria, well developed Golgi and ER, many lipid droplets and multilaminar bodies, secondary lysosomes, no virus particles.
Karyotype: modal number = 68; range = 63 to 71. The cell line is aneuploid human, with chromosome counts in the triploid range. The Y chromosome is absent; however, loss of the Y chromosome is not unusual from male tumor cell lines. All normal autosomes except chromosome N9 and N19 are represented, usually by two or three copies. Chromosome N9 is recognized as a marker chromosome (M1) that is usually trisomic. Normal chromosome N5 is and chromosomes N10 and N16 tend to be over-represented with respect to the copy number of other normal chromosomes. Thirteen marker chromosomes are identified: 9q+, t(1p:?), t(1qter>1q21::20), t(1q17q), der(11)t(3;11)(q21;q14), 19q+, 4q+, 4p+ and others. The chromosome counts and general cytogenetic features are in keeping with those described by J. Fogh, et al., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 58: 209, 1977.
Note: Cytogenetic information is based on initial seed stock at ATCC. Cytogenetic instability has been reported in the literature for some cell lines.

Biosafety Level: 1

This cell line is not known to harbor an agent known to cause disease in healthy adult humans. Handle as a potentially biohazardous material under at least Biosafety Level 1 containment. This cell line has **NOT** been screened for Hepatitis B, human immunodeficiency viruses or other adventitious agents. Cell lines derived from primate lymphoid tissue may fall under the

regulations of 29 CFR 1910.1030 Bloodborne Pathogens. ATCC recommends that appropriate safety procedures be used when handling all cell lines, especially those derived from human or other primate material. Detailed discussions of laboratory safety procedures are provided in **Laboratory Safety: Principles and Practice** (Fleming et al., 1995) the ATCC manual on quality control (Hay et al., 1992), the Journal of Tissue Culture Methods (Caputo, 1988), and in the U.S. Government Publication, **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1999. The entire text is available online at www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bml4/bml4toc.htm.

Use Restrictions

These cells are distributed for research purposes only.
 The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center releases the line subject to the following: 1.) The cells or their products must not be distributed to third parties. Commercial interests are the exclusive property of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. 2.) Any proposed commercial use of these cells must first be negotiated with The Director, Office of Industrial Affairs, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, New York, NY 10021; phone (212) 639-6181; FAX (212) 717-3439.

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. *It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.*

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. *All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.*
3. Transfer the vial contents to a 75 cm² tissue culture flask and dilute with the recommended complete culture medium (see the specific batch information for the recommended dilution ratio). *It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).*

American Type Culture Collection
 P.O. Box 1549
 Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico)
 703-365-2700
 Fax: 703-365-2750
 E-mail: tech@atcc.org

- Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

If it is desired that the cryoprotective agent be removed immediately, or that a more concentrated cell suspension be obtained, centrifuge the cell suspension at approximately 125 xg for 5 to 10 minutes. Discard the supernatant and resuspend the cells with fresh growth medium at the dilution ratio recommended in the specific batch information.

Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

- Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
- If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
- If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 xg for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 ml of this medium and add to 25 cm² flask. Incubate at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.

Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm² flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes.

- Remove and discard culture medium.
- Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin-0.53mM EDTA solution to remove all traces of serum, which contains trypsin inhibitor.
- Add 2.0 to 3.0 ml of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).

Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.

- Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.

- Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.

Subcultivation Ratio: 1:2 to 1:4.

- Incubate cultures at 37°C.

Note: For more information on enzymatic dissociation and subculturing of cell lines consult Chapter 10 in *Culture of Animal Cells, a manual of Basic Technique* by R. Ian Freshney, 3rd edition, published by Alan R. Liss, N.Y., 1994.

Medium Renewal

Two to three times weekly

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated McCoy's 5a Medium Modified, Catalog No. 30-2007.

To make the complete growth medium, add the following components to the base medium:

- fetal bovine serum to a final concentration of 10%

This medium is formulated for use with a 5% CO₂ in air atmosphere.

ATCC tested fetal bovine serum is available as ATCC Catalog No. 30-2020 and ATCC Catalog No. 30-2021 (100ml).

Cryoprotectant Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO.

Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.

Additional Information

Additional product and technical information can be obtained from the catalog references and the ATCC Web site at www.atcc.org, or by e-mail at tech@atcc.org.

References

(additional references may be available in the catalog description at www.atcc.org)

Fogh, J., ed., **Human tumor cells in vitro**. New York: Plenum Press; 1975:pp. 115-159

Fogh J et al. **Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors**. J. Natl. Cancer Inst. 58: 209-214, 1977 PubMed: 77097006

Fogh J et al. **One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice**. J. Natl. Cancer Inst. 59: 221-226, 1977 PubMed: 77210034

Fogh J. **Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors**. Natl. Cancer Inst. Monogr. 49: 5-9, 1978 PubMed: 79156922

Pollack MS et al. **HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines**. J. Natl. Cancer Inst. 66: 1003-1012, 1981 PubMed: 8121899

Hay, R. J., Caputo, J. L., and Macy, M. L., Eds. (1992). **ATCC Quality Control Methods for Cell Lines**. 2nd edition, Published by ATCC.

Caputo, J. L., **Biosafety procedures in cell culture**. J. Tissue Culture Methods 11:223-227, 1988.



Fleming, D.O., Richardson, J. H., Tulis, J.J. and Vesley, D. (1995) **Laboratory Safety: Principles and Practice**. Second edition, ASM press, Washington, DC.

Centers for Disease Control (1993), **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories** Human Health Service Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Dept. of Health and Human Services; 3rd Edition U.S. Government Printing Office Washington D.C.

ATCC Warranty

The viability of ATCC products is warranted for 30 days from the date of shipment. If you feel there is a problem with this product, contact Technical Services by phone at 800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico) or 703-365-2700 (elsewhere) or by e-mail at tech@atcc.org.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.

© ATCC 2007. All rights reserved.
ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection. 07/07

American Type Culture Collection
P.O. Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico)
703-365-2700
Fax: 703-365-2750
E-mail: tech@atcc.org

Protocolos y fichas técnicas



Product Sheet

HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated of F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.1 mg/ml heparin; 0.03-0.05 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS); adjust to a final concentration of 10% fetal bovine serum.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 3

Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue:
umbilical vein/vascular endothelium

Disease: normal

Cell Type: endothelial

Morphology: endothelial

Growth Properties: adherent

DNA Profile:

Amelogenin: X

CSF1PO: 11,12

D13S317: 9,11

D16S539: 11,12

D5S818: 11,12

D7S820: 8,12

THO1: 6,9,3

TPOX: 8,11

vWA: 16

Cytogenetic Analysis: Karyology performed for one batch of CRL-1730 in 1996 reflected a hypodiploid human cell line with a modal chromosome number of 45 occurring in 72% of the cells counted, all of which had monosomic N13. The rate of polyploid cells among this population was 15.8%. This karyology differed from earlier work-ups performed on the cells that showed approximately 60% of the cells retained 2 chromosomes 13. The apparent clonal variation in cultures of CRL-1730 (most likely dependent upon passage and growth conditions) has also been noted in STR profiles with unstable alleles at D13S317 allele #9, D13S317 allele #11, and D7S820 allele #12. Other coexisting subclones include those with 46,XX,-11,-13,i(11p),i(11q) and 46,XX,+11,-13 karyotypes. For all karyotypes performed, both X chromosomes appear normal.

SAFETY PRECAUTION

ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

Unpacking & Storage Instructions

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C, preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Handling Procedure for Frozen Cells

Handling Procedure for Frozen Cells

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials. It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium, and spin at approximately 125 xg for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into
5. a new culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH

Protocolos y fichas técnicas



Product Sheet

HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
liquid nitrogen
vapor phase

Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated of F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.1 mg/ml heparin; 0.03-0.05 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS); adjust to a final concentration of 10% fetal bovine serum.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 2 of 3

(7.0 to 7.6), pH (7.0 to 7.6).

6. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO₂ in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet



Handling Procedure for Flask Cultures

Handling Procedure for Flask Cultures

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination. Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).
2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all of the growth medium except for approximately 5 to 10 mL to cover the floor of the flask. The old medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 37°C in a 5% carbon dioxide gas phase until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 xg for 5 to 10 minutes to spin down the suspended cells into a soft pellet. Remove all but 5 mL of supernatant medium, then resuspend the cells in the remaining medium and add back to a 25 cm² flask. The old medium can be saved for reuse. Incubate at 37°C in a 5% carbon dioxide gas phase until they are ready to be subcultured.



Subculturing Procedure

Note: A high quality ECGS prepared from bovine neural tissue (Sigma Cat no. E-2759 or equivalent) should be used to propagate CRL-1730. It is best to initiate the cells with the highest recommended concentration of ECGS. **Protocol:**

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin-0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).
Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.
4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
6. Incubate cultures at 37°C.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:2 to 1:3 is recommended

Medium Renewal: Two to three times per week



Cryopreservation Medium

Cryoprotectant Medium

Complete growth medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO. Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.



Comments

Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) and unidentified factors from bovine pituitary, hypothalamus or whole brain extracts are mitogenic for this line. The cells have a life expectancy of 50 to 60 population doublings.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty



Protocolos y fichas técnicas



Product Sheet

HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

Please read this FIRST

	Storage Temp. liquid nitrogen vapor phase
.....	
	Biosafety Level 1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Complete Growth Medium

The base medium for this cell line is ATCC-formulated of F-12K Medium, Catalog No. 30-2004. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: 0.1 mg/ml heparin; 0.03-0.05 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS); adjust to a final concentration of 10% fetal bovine serum.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: HUV-EC-C (ATCC® CRL-1730™)

The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.

© ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [01/28]

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 3 of 3

For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.



Cell Proliferation Kit I (MTT)

Colorimetric assay (MTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability

Cat. No. 11 465 007 001

1 Kit (for 2,500 tests)

Version 17
Content version: September 2005

Store at -15 to -25°C

1. Kit contents

Bottle	Label	Contents
1	MTT labeling reagent	<ul style="list-style-type: none"> 5 vials containing 5 ml MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) labeling reagent (1 ×), 5 mg/ml in phosphate buffered saline (PBS), non-sterile ready to use.
2	Solubilization solution (1 ×, ready-to-use)	<ul style="list-style-type: none"> 3 bottles with 90 ml 10% SDS in 0.01 M HCl.

Basic steps

Stage	Description
1	Cells, grown in a 96 well tissue culture plate, are incubated with the yellow MTT solution for approx. 4 h.
2	After this incubation period, purple formazan salt crystals are formed. These salt crystals are insoluble in aqueous solution, but may be solubilized by adding the solubilization solution and incubating the plates overnight in humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂).
3	The solubilized formazan product is spectrophotometrically quantified using an ELISA reader. An increase in number of living cells results in an increase in the total metabolic activity in the sample. This increase directly correlates to the amount of purple formazan crystals formed, as monitored by the absorbance (see Fig. 3).

2. Introduction

2.1 Product overview

Assay principle

The assay is based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt MTT to purple formazan crystals by metabolic active cells (Fig. 1) (6, 7, 35).

This cellular reduction involves the pyridine nucleotide cofactors NADH and NADPH (36). The formazan crystals formed are solubilized and the resulting colored solution is quantified using a scanning multiwell spectrophotometer (ELISA reader).

This ensures a high degree of accuracy, enables on-line computer processing of the data (data collection, calculation and report generation) and, thereby, allows the rapid and convenient handling of a high number of samples.

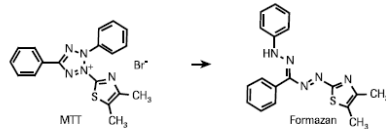


Fig. 1: Metabolization of MTT to a formazan salt by viable cells.

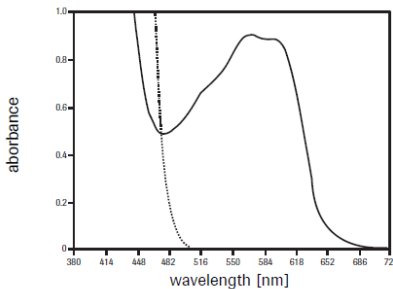


Fig. 2: Comparison of UV-spectra of MTT labeling reagent (dotted line) and the formazan salt after solubilization with solubilization solution.

Background information

The determination of cellular proliferation, viability and activation are key areas in a wide variety of cell biological approaches. The need for sensitive, quantitative, reliable and automated methods led to the development of standard assays. Such an example is based on the capability of the cells to incorporate a radioactively labeled substance (³H]-thymidine), or to release a radioisotope such as [⁵¹Cr] after cell lysis. Alternatively, the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)* in place of thymidine is monitored as a parameter for DNA synthesis and cellular proliferation in immunohisto- and cytochemistry, in a cell ELISA and FACS analysis. (kits and reagents for these applications are available from Roche Applied Science). Cell proliferation and viability assays are of particular importance for routine applications. Tetrazolium salts (e.g., MTT, XTT, WST-1) are especially useful for assaying the quantification of viable cells, because they are cleaved to form a formazan dye (Fig. 1); for UV absorbance spectrum, see Fig. 2) only by metabolic active cells.

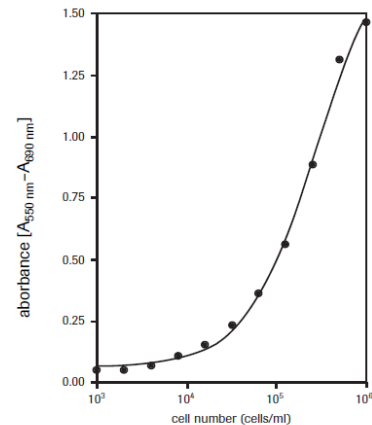


Fig. 3: Effect of different numbers of cells on color formation (example given, using Ag8 cells).

Protocolos y fichas técnicas

Application

The non-radioactive, colorimetric assay system using MTT was first described by Mosmann, T. *et al.* (1) and improved in subsequent years by several other investigators (2–6).

The assay is designed for the spectrophotometric quantification of cell growth and viability (1, 3, 5–7) without the use of radioactive isotopes.

- It is used for the measurement of cell proliferation in response to growth factors, cytokines and nutrients (1–3, 6, 8–12) (see fig. 4).
- The MTT assay is also useful for the measurement of cytotoxicity. Examples are the quantification of tumor necrosis factor- α or - β effects (13, 14). (see fig. 5) or macrophage induced cell death (15, 16) and the assessment of cytotoxic (17–34) or growth inhibiting agents such as inhibitory antibodies (see fig. 6).
- For the replacement of the radioactive [⁵¹Cr]-release cytotoxicity assay, protocols using MTT have been developed. The MTT assay is as sensitive as the radioactive method, but shows a significantly lower background especially after long term incubation (34).
- The MTT assay can also be used to study cell activation (4).

Storage and stability

Stable at -15 to -25°C until the expiration date printed on the label.

Note: Protect from light. Repeated thaw-freeze cycles do not affect product stability. Precipitates may form during shipment or storage, in which case the container should be warmed to +37°C and thoroughly mixed.

After thawing, the MTT labeling reagents may be stored protected from light at +2 to +8°C for up to 4 weeks, in which case a sterile filtration of the reagent is recommended.

Advantages

Compared to radioactive isotope techniques, the Cell Proliferation Kit I (MTT) shows the following benefits.

Benefit	Feature
Safe	No radioactive isotopes are used.
Accurate	The absorbance revealed, strongly correlates to the cell number, (see fig. 3).
Sensitive	Low cell numbers are detected (see fig. 3).
Fast	The use of multiwell-ELISA readers allows for processing a large number of samples.
Easy	No washing steps and no additional reagents are required.

3. Protocols and required material

3.1 Assay procedure

Overview

Please refer to the following table.

Step	Description	Volume/well	Time/Temp
	Perform tissue culture using 96 well microplates (tissue culture grade, flat-bottom)	100 μ l	24–96 h +37°C.
1	Add MTT labeling reagent and incubate in a humidified atmosphere	10 μ l	4 h +37°C.
2	Add solubilization solution and incubate in a humidified atmosphere	100 μ l	overnight +37°C
3	Evaluate microplate with the use of an ELISA reader at 550–600 nm with a reference wavelength of >650 nm.		

Handling instruction for larger volumes

If for the initial incubation of the cells a larger volume of culture medium is required, increase the amount of MTT labeling reagent correspondingly (e.g., 20 μ l MTT labeling reagent, when cells are cultured in 200 μ l culture medium).

Protocol

Please refer to the following table.

Note: If for the initial incubation of the cells a larger volume of culture medium is required, increase then amount of MTT labeling reagent correspondingly (e.g., 20 μ l MTT labeling reagent, when cells are cultured in 200 μ l culture medium).

Step	Action
1	Cells are grown in microplates (tissue culture grade, 96 wells, flat bottom) in a final volume of 100 μ l culture medium per well, according to the media needs of the cells, in a humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂). The incubation period of the cell cultures depends on the particular experimental approach and on the cell line used for the assay. For most experimental setups, the incubation of cells for 24 to 96 h is appropriate.
2	After the incubation period, add 10 μ l of the MTT labeling reagent (final concentration 0.5 mg/ml) to each well.
3	Incubate the microplate for 4 h in a humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂).
4	Add 100 μ l of the Solubilization solution into each well.
5	Allow the plate to stand overnight in the incubator in a humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂).
6	Check for complete solubilization of the purple formazan crystals and measure the spectrophotometrical absorbance of the samples using a microplate (ELISA) reader. The wavelength to measure absorbance of the formazan product is between 550 and 600 nm according to the filters available for the ELISA reader, used. The reference wavelength should be more than 650 nm.

3.2 Examples

3.2.1. Cell growth assay procedure

Additional reagents required

- Culture medium, e.g., DMEM containing 10% heat inactivated FCS (fetal calf serum), 2 mM glutamine, 0.55 mM L-arginine, 0.24 mM L-asparagine-monohydrate, 50 μ M 2-mercaptoethanol, HT-media supplement (1 \times), containing 0.1 mM hypoxanthine and 16 μ M thymidine. If an antibiotic is to be used, additionally supplement media with penicillin/streptomycin or gentamicin *
- Interleukin-6, human (hIL-6) (200,000 U/ml, 2 μ g/ml) sterile*.

Protocol

For the determination of human interleukin-6 (hIL-6) activity on 7TD1 cells (mouse-mouse hybridoma) (see fig. 4).

Step	Action
1	Seed 7TD1 cells at a concentration of 2 \times 10 ³ cells/well in 100 μ l culture medium containing various amounts of IL-6 [final concentration e.g., 0.1–10 U/ml (0.001–0.1 ng/ml)] into microplates (tissue culture grade, 96 wells, flat bottom).
2	Incubate cell cultures for 4 days at +37°C and 6.5% CO ₂ .
3	After the incubation period, add 10 μ l of the MTT labeling reagent (final concentration 0.5 mg/ml) to each well.
4	Incubate the microplate for 4 h in a humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂).
5	Add 100 μ l of the Solubilization solution into each well.
6	Allow the plate to stand overnight in the incubator in a humidified atmosphere (e.g., +37°C, 6.5% CO ₂).
7	Check for complete solubilization of the purple formazan crystals and measure the spectrophotometrical absorbance of the samples using a microplate (ELISA) reader. The wavelength to measure absorbance of the formazan product is between 550 and 600 nm according to the filters available for the ELISA reader, used. The reference wavelength should be more than 650 nm.

Anexo 2

Publicaciones generadas y premios

Publicaciones generadas y premios

Capítulo de libro: Velarde-Salcedo AJ, González de Mejía E, Barba de la Rosa AP. "In vitro Evaluation of the Antidiabetic and Antiadipogenic potential of amaranth protein Hydrolysates" En: *Hispanic Foods: Bioactive Compounds*. Tunick M et al. ACS Symposium Series: American Chemical Society. Washington DC, 2012

In Vitro Evaluation of the Antidiabetic and Antiadipogenic Potential of Amaranth Protein Hydrolysates

Aída Jimena Velarde-Salcedo,¹ Elvira González de Mejía,² and Ana Paulina Barba de la Rosa^{*,1}

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la presa San José 2055, San Luis Potosí, SLP 78216, México

²Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, 228 E.R. Madigan Lab, MC-051, 1201 W. Gregory Drive, Urbana, IL 61801

*E-mail: apbarba@ipicyt.edu.mx

Obesity, which is a major recognized risk factor for type-2 diabetes, is rapidly increasing in prevalence resulting in a "diabesity" epidemic. Diabesity represents one of the major public health problems in the 21st century. Some of the strategies that have shown to be effective in reducing type-2 diabetes incidence are exercise and a healthy diet. New drugs that have as a target the inhibition of the enzyme dipeptidyl dipeptidase IV (DPPiV) have been released. However some of these drugs have secondary effects; for that reason, the food industry is exploring the aspects related to the components present in food that promote a healthy life, such as the bioactive peptides encrypted in the proteins of several foods. Amaranth is a plant native from North, Central and South America which contains antihypertensive, antioxidant and cancer preventive peptides. Also there is evidence that amaranth has some hypoglycemic action; however, the antidiabetic potential and the effect upon body weight of the seed proteins have not been well characterized. The aim of this study was to identify the ability of amaranth peptides to inhibit the DPPiV activity and the effect of these peptides upon fat accumulation in mouse adipocyte cultures.

© 2012 American Chemical Society

In *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*; Tunick, M., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2012.

Publicaciones generadas y premios

Artículo de investigación: Velarde-Salcedo AJ, et al. 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. Este artículo es de libre acceso y puede ser consultado en la siguiente liga: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612013167>

Food Chemistry 136 (2013) 758–764



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins

Aída J. Velarde-Salcedo^{a,b}, Alberto Barrera-Pacheco^a, Samuel Lara-González^a, Gabriela M. Montero-Morán^a, Agustín Díaz-Gois^c, Elvira González de Mejía^{b,*}, Ana P. Barba de la Rosa^{a,*}

^aIPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis Potosí, Mexico

^bFood Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL, United States

^cCentros de Salud, Jurisdicción Sanitaria No.1, Calzada de Guadalupe 530, San Luis Potosí, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2012

Received in revised form 26 July 2012

Accepted 14 August 2012

Available online 25 August 2012

Keywords:

Amaranthus hypochondriacus

Dipeptidyl peptidase IV

Diabetes

Docking modeling

Encrypted peptides

ABSTRACT

Bioactive compounds present in foods could potentially have beneficial effects on human health. In this study we report the *in vitro* inhibitory capacity of peptides released from amaranth seed proteins after enzymatic digestion, against dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV); an enzyme known to deactivate incretins, hormones involved in insulin secretion. Other seeds, such as soybean, black bean, and wheat were also tested. The highest inhibition of DPP-IV was observed with amaranth peptides released after simulated gastrointestinal digestion, showing an IC_{50} of 1.1 mg/mL in a dose-dependent manner. *In silico* tryptic digestion of amaranth globulins was carried out releasing peptides larger than 13 residues. Some of these peptides were used for the *in silico* prediction of their binding modes with DPP-IV. Docking models showed that the possible mechanism of globulin peptides to inhibit DPP-IV was through blocking the active dimer formation. Peptides were also found inside the major cavity where the natural substrates reach the catalytic site of the enzyme. This is the first report of the identification of inhibitory DPP-IV peptides from amaranth hydrolysates and the prediction of their binding modes at the molecular level, leading to their possible use as functional food ingredients in the prevention of diabetes.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Publicaciones generadas y premios

Capítulo de libro: Velarde-Salcedo AJ, Barba de la Rosa AP. “Tecnologías “ómicas” en las ciencias ambientales y en la búsqueda de biomarcadores moleculares”. En: Bioindicadores: guardianes de nuestro futuro ambiental. González Zuarth CA, et al. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) e Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). México, D.F. 2014

Tecnologías “ómicas” en las ciencias ambientales y en la búsqueda de biomarcadores moleculares

“Omic” technologies in the environmental sciences and on the search for molecular biomarkers

Aída Jimena Velarde-Salcedo y Ana Paulina Barba de la Rosa

Resumen. El término biomarcador o marcador biológico se refiere a la medición de una característica como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica o ambiental. Estos incluyen a las mutaciones genéticas o polimorfismos, y cambios en péptidos, proteínas, lípidos y metabolitos. Los indicadores o marcadores ambientales emplean las técnicas de medición de contaminantes en el medio ambiente y el efecto sobre diferentes individuos (exposoma). Para la identificación de los biomarcadores se emplean las tecnologías “ómicas”. En este capítulo se abordará el uso de las tecnologías “ómicas”, en particular de la proteómica, para el descubrimiento de nuevos biomarcadores relacionados con el efecto de las condiciones ambientales que influyen sobre la salud, en especial su efecto en el desarrollo de enfermedades metabólicas, declaradas como las pandemias del siglo XXI. También discutiremos el uso de la proteómica como plataforma para la medición de la contaminación ambiental.

Palabras clave: biomarcadores, exposoma, metagenómica, proteómica, salud

Abstract. The term biomarker or biological marker refers to the measurement of a special feature as an indicator of normal or pathogenic processes or a pharmacological response to a therapeutic intervention. Such attributes include genetic mutations, polymorphisms, and changes in peptides, proteins, lipids, and metabolites. Environmental markers or indicators to environmental exposures use techniques based in the detection and measurement of pollutants in an ecosystem and their effect upon different individuals; this is called the “exposome”. In this field “omics” are very useful for the identification of biomarkers. In this chapter, we will discuss the use of “omics” technologies, particularly proteomics, for the discovery of new biomarkers related to

Artículo de investigación: Pérez-Aguilar S, et al. 2014. G protein-coupled receptors mediate coronary flow- and agonist-induced responses via lectin-oligosaccharide interactions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 306(5): H699-H708. Este artículo es de libre acceso y puede ser consultado en la siguiente liga: <http://ajpheart.physiology.org/content/306/5/H699.full-text.pdf+html>

Am J Physiol Heart Circ Physiol 306: H699–H708, 2014.
First published December 20, 2013; doi:10.1152/ajpheart.00481.2013.

G protein-coupled receptors mediate coronary flow- and agonist-induced responses via lectin-oligosaccharide interactions

Sandra Perez-Aguilar,¹ David Torres-Tirado,¹ Guadalupe Martell-Gallegos,¹ Jimena Velarde-Salcedo,² Ana Paulina Barba-de la Rosa,² Maureen Knabb,³ and Rafael Rubio¹

¹Departamento de Fisiología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico; ²Departamento de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, Mexico; and ³Department of Biology, West Chester University, West Chester, Pennsylvania

Submitted 19 June 2013; accepted in final form 18 December 2013

Pérez-Aguilar S, Torres-Tirado D, Martell-Gallegos G, Velarde-Salcedo J, Barba-de la Rosa AP, Knabb M, Rubio R. G protein-coupled receptors mediate coronary flow- and agonist-induced responses via lectin-oligosaccharide interactions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H699–H708, 2014. First published December 20, 2013; doi:10.1152/ajpheart.00481.2013.—Blood flow acts parallel to the coronary luminal endothelial surface layer (LESL) and modulates multiple parenchymal functions via the release of paracrine agents. Evidence indicates that the LESL may be a flow-sensing organelle and that perhaps through flow-induced lectin (L)-oligosaccharide (O) complex formation (L-O) participates in this process. LESL integrins and selectins are both lectinic and flow sensitive, but the L properties of flow-sensitive G protein-coupled receptors (GPCRs) are unknown. Therefore, we investigated the presence of L in the LESL and hypothesized that if flow-sensitive GPCRs are L, flow and O will determine their response to receptor activation. The LESL protein fraction isolated from guinea pig hearts was passed through an affinity chromatography column made of three sugars, mannose, galactose, and N-acetylglucosamine, and the lectinic fraction was eluted. Immune dot blot was used to identify L proteins in the LESL fraction. Our results indicate the following. 1) Two-dimensional SDS-PAGE (2D-SDS-PAGE) of the LESL lectinic fraction revealed at least 167 Ls. 2) Among these Ls, we identified three selectins and the GPCRs: angiotensin II, bradykinin (B2-R), adenosine A₁ and A₂, prolactin, endothelin, α_1 -adrenergic (α_1 A-R), thromboxane A₂, β_1 -adrenergic, β_3 -adrenergic, and insulin receptors; the first six GPCRs are known to be flow sensitive. 3) The amplitude of receptor-induced vascular responses by α_1 A-R and B2-R activation (phenylephrine or bradykinin, respectively) was a function of flow and O (hyaluronidate). Our results support a novel mechanism of GPCR-mediated responses to flow via L-O interaction.

flow sensitivity requirements; G protein-coupled receptors; lectins and sugars of glycoalkalix; mechanosensors; regulatory extracellular matrix

THE DETAILED MOLECULAR and physical mechanisms by which endothelial cells transduce flow into biochemical responses are not well understood (2, 3a, 9, 28, 33, 35, 37, 38, 40, 41, 48, 49). Part of the problem is the measurement and identification of the flow-sensing signals as well the transducing molecule(s) that first and directly responds to flow; the “true mechanosensor” is unknown. Although several cell-specific molecules have been found to respond to mechanical stimuli (1, 2, 9, 24, 26, 31, 33, 34, 38, 39, 41, 45, 46, 48, 49, 54, 58), it has not been shown whether their response is due to the direct impact of flow.

Address for reprint requests and other correspondence: R. Rubio, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. V. Carranza 2405, San Luis Potosí, SLP, Mexico (e-mail: rubio@uaslp.mx).

One of the proposed mechanisms has been that some of the flow-sensing properties may reside in the glycocalyx of the luminal endothelial surface layer (LESL), which has an ideal location to be acted upon by flow (3a, 17, 19, 30, 35, 37, 38, 40, 41, 48, 49). The LESL is 0.2–0.7 μ m thick and made of highly hydrated polyanions, numerous diversely glycosylated proteins, glycosaminoglycans, proteoglycans, and glycolipids (3, 12, 30, 47, 56, 57) that on the LESL are distributed in well-ordered microdomains (60). We and others have shown that flow-induced responses require the presence of LESL glycosidic, lectinic structures. Interestingly, several flow-sensitive G protein-coupled receptors (GPCRs) are present in the LESL (2, 7, 8, 9, 26, 33, 38, 42, 46, 54, 58, 61, 62).

Coronary flow (CF) regulation of diverse cardiac functions as well as other flow-regulated vascular functions requires the presence of various LESL oligosaccharides. These CF effects are specifically obliterated if LESL-specific glycans are enzymatically hydrolyzed or bound to selective plant lectins. For example, if N-linked β -1,3 N-acetylglucosamine (GlcNAc) groups are enzymatically hydrolyzed by endoglycanase-H or bound to the lectin of *Lycopersicon esculentum*, both act equally to depress CF-induced responses (40). Similar results were demonstrated with other enzyme-lectin pairs (40). The glycosaminoglycans hyaluronidate and heparinate are also important participants in flow-mediated responses (3a, 30, 35, 38, 40, 41, 49), but we do not know whether being glycosidic is obligatory to sense flow. Interestingly, the roles of LESL sugars in flow-induced responses are specific for diverse functions (3a, 15, 19, 30, 38, 40, 41), but our understanding of the mechanism behind this specificity is incomplete.

Our laboratory has shown that LESL lectinic proteins also participate in flow sensing (3a, 17, 19, 38). Lectins have high affinity for specific oligosaccharide sequences, a requisite characteristic for specific molecule-molecule recognition (52, 59). LESL contains lectins with affinity toward glucose, mannose, galactose, GlcNAc, and likely other sugars (3a, 17, 19, 37, 38). Intracoronary infusions of various polymers of galactose, mannose, or GlcNAc that bind irreversibly to LESL lectins alter CF-induced cardiac responses in a concentration-dependent manner. Only the last two polymers inhibited irreversibly CF-induced inotropism and dromotropism and blood vessel vasodilation (3a, 38). These results indicate that their physiological effects are not the result of indiscriminate binding but imply a selective chemical interaction. Thus the identity and number of LESL proteins whose function derives from their lectinic nature need to be defined. These three monosaccharide polymers were also used separately as affinity resins to isolate and separate by two-dimensional SDS (2D-SDS) three appar-

Publicaciones generadas y premios

Artículo de investigación: Velarde-Salcedo AJ, et al. 2015. Enviado a *Molecular Nutrition and Food Research*. Junio 2015. En revisión.

1 **Dipeptidyl peptidase IV activity and plasma proteomic profile of**
2 **streptozotocin-induced diabetic rats fed an amaranth supplemented**
3 **diet**

4 *Aída J. Velarde-Salcedo*¹, *Evelyn Regalado-Renteria*², *Bertha I. Juárez-Flores*²,
5 *Alberto Barrera-Pacheco*¹, *Elvira González de Mejía*³, *Ana P., Barba de la Rosa*^{1,*}

6

7 ¹ IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., San Luis
8 Potosí, México.

9 ² Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis
10 Potosí, San Luis Potosí, México.

11 ³ Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Champaign, IL,
12 United States.

13 **Keywords:** Amaranth, Bioactive peptides, Diabetes, Dipeptidyl peptidase IV, Plasma
14 proteomics

15 ***Correspondence:** IPICYT, Camino a la Presa San José No. 2055, Lomas 4a Sección,
16 San Luis Potosí, S.L.P., 78216 México. Tel: +52 444 8342082; fax: +52 444 8342010.

17 E-mail address: apbarba@ipicyt.edu.mx (A.P. Barba de la Rosa).

Publicaciones generadas y premios

Artículo de investigación: Gómez-Cardona EE, et al. 2015. Enviado a *Diabetes Research and Clinical Practice*. Junio 2015. En revisión.

Effect of amaranth consumption on diabetes-related biomarkers in patients with diabetes

Erik Elvin Gómez-Cardona^{1,§}, Eric Edmundo Hernández-Domínguez^{1,§}, José Ángel Huerta-Ocampo¹, Hugo Jiménez-Islas², Agustín Díaz-Gois³, Aída Jimena Velarde-Salcedo¹, Alberto Barrera-Pacheco¹, Alberto Goñi-Ochoa⁴, Ana Paulina Barba de la Rosa¹

¹ IPICYT, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., Camino a la Presa San José No. 2055, Lomas 4ª Sección, San Luis Potosí, S.L.P., 78216, México.

² Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica y Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Avenida Tecnológico y A. García Cubas s/n. Celaya, Gto. CP 38010. México.

³ Centros de Salud, Jurisdicción Sanitaria No. 1, Avenida Juárez 530, Col. Juliár Carrillo, San Luis Potosí, S.L.P., 78340, México.

⁴ Panaderías La Superior, Amado Nervo 705, Col. Del Valle, San Luis Potosí, S.L.P., 78200, México.

§These authors contributed equally to this work

*Corresponding author:
Ana P. Barba de la Rosa
Fax: +524448342000
E-mail: apbarba@ipicyt.edu.mx

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

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

**M.C. Aida Jimena Velarde Salcedo, M.C. Abraham Escobedo Moratilla,
M.C. Alberto Barrera Pacheco, Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa**

por haber resultado ganadores en la

*1ª Edición de la Convocatoria del
Programa de Emprendimiento del IPICT*

con el Proyecto:

"Desarrollo Tecnológico para la producción de péptidos bioactivos de amaranto y su comercialización"

San Luis Potosí, S.L.P., a 22 de noviembre de 2013.

El Comité del Programa de Emprendimiento

 **Dr. David Ríos Jara**
Director General

 **Dr. Vladimir A. Escobar Barrios**
Director de Vinculación

 **Dr. Juan Castro**
Consultor Internacional - CSIC

 **Dr. Marcial Bonilla Marín**
Secretario Académico