

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Caracterización de la respuesta anti-adipogénica
de péptidos de amaranto**

Tesis que presenta

Aída Jimena Velarde Salcedo

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Codirector de la Tesis:

Dra. Elvira González de Mejía

San Luis Potosí, S.L.P., 11 de Julio de 2011



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización de la respuesta anti-adipogénica de péptidos de amaranto**” presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Aída Jimena Velarde Salcedo** y aprobada el **11 de julio de 2011** 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.

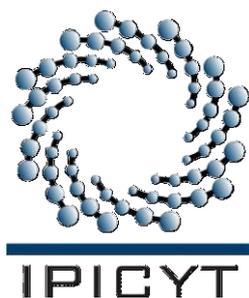
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Directora de la tesis

Dra. Elvira González de Mejía
Codirectora de la tesis

Dra. Martha Leticia Santos Martínez
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Ma del Carmen González Castillo
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Antonio de León Rodríguez
Miembro del Comité Tutorial

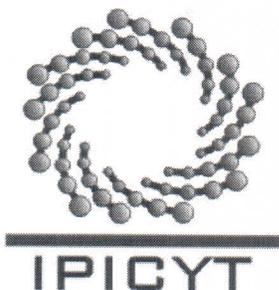


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 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 332272) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de tesis de maestría se realizó con el apoyo del Proyecto por Convocatoria-Fondos Sectoriales de Investigación en Salud y Seguridad Social (Clave No. 150873) y al Apoyo CONACYT-University of Illinois Small Research Grants Program.



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 082 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 10:25 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

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

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

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Aída Jimena Velarde Salcedo

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización de la respuesta anti-adipogénica de péptidos 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 12:15 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 11 días del mes de julio de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mi padre. Espero se sienta orgulloso, ya que sin él jamás hubiera pensado en hacer una maestría.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado.

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Elvira González de Mejía por todo el apoyo y consejos durante mi estancia en su laboratorio.

A Alberto Barrera Pacheco por el apoyo técnico y consejos.

A todos mis compañeros de Laboratorio de Proteómica por sus consejos y compañía.

A mi familia por la paciencia durante los momentos difíciles.

A Héctor Rosas Hernández por brindarme siempre su amistad incondicional y consejos académicos y personales.

A Enrique Leonhardt Álvarez por su compañía, su paciencia y temple para soportar todo este proceso.

Contenido

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x

	Página
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	4
2.1 Extracción de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto	4
2.2 Obtención de péptidos bioactivos	4
2.3 Mapeo de la masa de los péptidos por MALDI-TOF	5
2.4 Simulación de la digestión gastrointestinal	5
2.5 Ensayo de actividad de DPP IV	5
2.6 Cultivos celulares	6
2.7 Perfiles proteínicos 2-DE	6
3. Resultados y discusión	8
3.1 Digestión de glutelinas de amaranto y caracterización de péptidos por MALDI-TOF	8
3.2 Purificación de péptidos por cromatografía de filtración en gel y actividad inhibitoria de DPP IV	12
3.3 Efecto de los péptidos de amaranto sobre el crecimiento y diferenciación de la línea celular 3T3-L1	17
3.4 Análisis proteómico de células 3T3-L1 en presencia y ausencia de péptidos de amaranto	19
4. Referencias	22

Lista de tablas

	Página
Tabla 1. Distribución del tamaño de los fragmentos de las glutelinas de amaranto digeridas con tripsina	10

Lista de figuras

	Página
Figura 1. SDS-PAGE de la digestión de glutelinas de amaranto	9
Figura 2. Cromatograma resultante de la separación de diferentes digeridos trópticos de amaranto por filtración en gel	13
Figura 3. Ensayos de actividad de la DPP IV en presencia de péptidos de amaranto	14
Figura 4. Efecto de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> del amaranto sobre la actividad de la DPP IV	16
Figura 5. Efecto de los hidrolizados trópticos de amaranto sobre la línea celular 3T3-L1	18
Figura 6. 2D-SDS-PAGE de la línea celular 3T3-L1 en presencia y ausencia de los péptidos de amaranto	20

Resumen

Caracterización de la respuesta anti-adipogénica de péptidos de amaranto

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja, asociada con el desarrollo de enfermedades cardíacas, hipertensión, algunos tipos de cáncer y diabetes. Actualmente, la industria alimentaria explora aspectos relacionados a los componentes presentes en los alimentos funcionales o nutraceúticos que promuevan el bienestar y una vida saludable. Dentro de estos compuestos, los péptidos bioactivos encriptados en las proteínas de los alimentos son de gran importancia. El amaranto es una planta nativa de Centro y Suramérica y su importancia radica en la alta calidad nutritiva y nutracéutica de las proteínas de reserva o de almacenamiento de la semilla. Se ha reportado la presencia de péptidos antihipertensivos, antioxidantes y anticancerígenos; sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado el potencial antidiabético ni el efecto sobre la regulación del peso corporal de los biopéptidos encriptados en las proteínas de la semilla. El objetivo de este trabajo fue determinar la respuesta de los péptidos bioactivos de las proteínas de reserva de amaranto sobre la acumulación de grasa en cultivos de células de ratón y la capacidad inhibitoria sobre la actividad de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). La DPP IV es una enzima clave en el desarrollo de la diabetes tipo 2 y un novedoso blanco terapéutico. Se encontró que tanto una digestión con tripsina como la simulación completa de la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto liberan péptidos menores de 10 kDa que inhiben a la DPP IV hasta en un 60% y que estos péptidos además son capaces de disminuir la acumulación de grasa de adipocitos de ratón y disminuyen la diferenciación de sus células precursoras inmaduras. Este trabajo proporciona nuevas evidencias que proponen y sustentan fuertemente al amaranto como una fuente alternativa de péptidos bioactivos contra la obesidad y la diabetes tipo 2.

Palabras clave: Amaranto, biopéptidos encriptados, células 3T3-L1, diabetes tipo 2, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, electroforesis 2D, obesidad.

Abstract

Characterization of the antiadipogenic response of amaranth peptides

Obesity is a multifactorial, complex, chronic disease that is usually associated with high mortality rates and the risk to develop cardiac disease, hypertension, some types of cancer and diabetes. Food industry is now 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 Central and South-America which contains antihypertensive, antioxidant and anti-cancer peptides; 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 determine the effect of these peptides upon fat accumulation in mouse adipocytes cultures and their ability to inhibit the dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), a new key enzyme in the type 2 diabetes treatments. Both, the tryptic and gastrointestinal digestions of amaranth proteins were able to release peptides with a molecular mass lower than 10 kDa that reduced 60% of the DPP IV activity. Furthermore, these peptides decreased mouse adipocytes fat accumulation and reduced the differentiation of its immature precursor cells. This work presents new evidence that could place amaranth as an alternative source of bioactive peptides against obesity and type 2 diabetes.

Keywords: Amaranth, bioactive peptides, dipeptidyl peptidase IV inhibitors, 2D electrophoresis, obesity, type 2 diabetes, 3T3-L1.

1. Introducción

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja, multifactorial que se establece por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético y conduce a una excesiva acumulación de grasa corporal (Freedman et al. 2006). Esta enfermedad suele estar acompañada de altas tasas de mortalidad y el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas, hipertensión, algunos tipos de cáncer y diabetes (Aichike et al. 2011, Karam y McFarlane 2011, Valvaris et al. 2010). Debido al alarmante número de casos en todo el mundo, que incluyen adultos y niños; la obesidad junto con la diabetes representan uno de los problemas de salud pública más importantes del siglo XXI. En el 2008, la organización mundial de la salud (OMS) estimó que más de un décimo de la población mundial adulta era obesa y que además, aproximadamente el 44% de los casos de diabetes son atribuidos a esta enfermedad. Algunas de las herramientas que han mostrado ser efectivas para reducir la incidencia de la diabetes mellitus tipo 2 son el ejercicio, la dieta saludable y la pérdida de peso (Karam y McFarlane 2011). Se ha demostrado que una pérdida moderada de peso de entre el 5 y 10% es suficiente para mejorar los factores de riesgo clásicos de la obesidad, pero se requiere una pérdida entre el 10 y 20% del peso corporal para realmente tener un efecto benéfico. Esto se logra con procesos quirúrgicos como las cirugías bariátricas (Tzotzas et al. 2011).

La industria alimentaria moderna explora aspectos relacionados a los componentes presentes en los alimentos que promuevan el bienestar y una vida saludable del consumidor. De aquí que áreas de investigación emergentes como la nutrigenómica han aparecido. La nutrigenómica estudia la alteración de la expresión de genes, la respuesta metabólica, y por lo tanto proporciona evidencias de los efectos protectores de los compuestos activos de alimentos contra las enfermedades (Fergusson et al. 2006). 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, antihipertensivos, etc. (Erdmann et al. 2008) 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 (Möller et al. 2008). La leche y sus derivados son una de las fuentes más ricas en biopéptidos, sin embargo, los biopéptidos se encuentran en otras fuentes animales y vegetales como carne, huevos, algunos peces, trigo, maíz, soya, arroz, hongos y amaranto (Moller et al. 2008, Gibbs et al. 2004, Erdmann et al. 2008, Silva-Sánchez et al. 2008).

El amaranto es una planta nativa de Centro y Suramérica cultivada desde épocas precolombinas y en los años 80s fue declarado como un cultivo con

gran potencial biotecnológico (NAS 1984). En esta última década el amaranto ha vuelto a emerger no sólo por sus cualidades nutritivas, sino por sus cualidades nutracéuticas. Existen evidencias de que diversos compuestos en las semillas de amaranto como aceites, fitoesteroles, flavonoides y extractos del tipo proteínico que explican su uso popular como hipocolesterolémico, antioxidante e hipoglucemiante (Marcone et al. 2004, Tironi y Añón 2010, Kalinova y Dadakova 2009, Escudero et al. 2006, Barba de la Rosa et al. 2009) Recientemente en nuestro grupo de trabajo hemos caracterizado la presencia de péptidos con diferentes propiedades biológicas (Silva-Sánchez et al. 2008), entre las que destacan los péptidos con propiedades inhibitorias de la enzima convertidora de la angiotensina (Barba de la Rosa et al. 2010) y los péptidos con propiedades cáncer preventivas tipo lunasin (Maldonado-Cervantes et al. 2010), novedoso biopéptido reportado por primera vez en soya que tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de cáncer a través de la inhibición de la acetilación de histonas (deLumen 2005). Otros péptidos reportados en el estudio de Silva-Sánchez et al. (2008) son aquellos que inhiben la dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV). La DPP IV es una enzima multifuncional implicada en varios procesos celulares como inmunológicos, inflamatorios y endocrinos. Últimamente ha despertado gran interés farmacéutico en las áreas de desórdenes metabólicos y cáncer y se ha convertido en un nuevo y exitoso blanco terapéutico para el tratamiento de diabetes tipo 2 (Wiedeman et al. 2003, Yu et al. 2010). La DPP IV es responsable de degradar las principales hormonas encargadas de la liberación de insulina después de la ingesta de alimentos: las incretinas; por lo tanto los inhibidores de la DPP IV actúan como potenciadores de incretinas, debido a que ayudan a incrementar el tiempo de acción de estas hormonas (Conarello et al. 2003, Nauck y Vardarli 2010, Stephan et al. 2011). En el mercado existen varios inhibidores de DPP IV que han mostrado muy buenos resultados como agentes antidiabéticos (Kos et al. 2009, Seino et al. 2010, Huisamen et al. 2011). Sin embargo, existe el riesgo de presentar efectos secundarios, principalmente por la amplia gama de efectos fisiológicos de esta enzima, por lo que la búsqueda de alimentos nutracéuticos que proporcionen péptidos naturales siempre será una alternativa viable para este tipo de padecimientos.

Los efectos de la inhibición de la DPP IV sobre el peso corporal no han sido bien definidos y existe información muy contrastante (Conarello et al. 2003, Stephan et al. 2011, Huisamen et al. 2011). Esto puede deberse a que las incretinas GLP-1 y GIP suelen tener efectos opuestos en el tejido graso y los efectos vistos con los fármacos puedan deberse a diferentes tipos de inhibición o afinidad por la enzima. (Sancho et al. 2006, Rao y Kini 2011). Por otro lado, también se ha reportado que las proteínas de amaranto presentan efectos antilipídemicos y pérdida de peso en estudios en ratas (Kim et al. 2006, Berger et al. 2003, Czerwinskia et al. 2004). Esta información propone al amaranto como una fuente natural de péptidos con potencial para prevenir la diabetes

tipo 2 y en la disminución de la acumulación de grasa. Sin embargo, aún no existen reportes sobre la caracterización de la actividad inhibitoria de la DPP IV y/o procesos biotecnológicos que ayuden en forma eficiente a liberar estos péptidos para ser empleados como una fuente de biofármacos naturales para el tratamiento de la diabetes y posiblemente la obesidad.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad inhibitoria de los péptidos liberados por la digestión enzimática de las proteínas de reserva de amaranto sobre la enzima DPP IV *in vitro* y analizar el efecto de estos sobre la diferenciación de pre-adipocitos y la acumulación de grasa en adipocitos maduros. Adicionalmente, mediante un enfoque proteómico se analizaron los cambios en la expresión de proteínas durante la diferenciación celular en presencia o ausencia de péptidos de amaranto.

2. Materiales y métodos

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

El material biológico utilizado se obtuvo a partir de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* (L.) variedad Nutrisol. Las semillas se trituraron en un molino de café y se eliminaron los restos de tejido con un tamiz, malla 80. La harina fue desengrasada con hexano (1:10 peso:volumen) por 4 h a 4°C en agitación constante. Se eliminó el solvente por centrifugación a 13000 rpm por 30 min y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente.

Las proteínas de reserva se extrajeron de acuerdo a su solubilidad a diferentes concentraciones de sales, solventes y pH, utilizando una relación harina/solución 1:10 (p:v), siguiendo el protocolo descrito anteriormente con algunas modificaciones (Barba de la Rosa et al. 1992). Las albúminas se extrajeron en agua bajo agitación constante a 4°C por una h. Después de colocarlas en un sonicador de baño por 30 min se centrifugaron a 13000 rpm por 30 min. La pastilla resultante se resuspendió en una solución de NaCl 0.1M, KH₂PO₄ 0.01M, EDTA 1mM, pH 7.5 para obtener la fracción correspondiente a las globulinas 7S, se agitó, sonicó y centrifugó en las mismas condiciones que las albúminas. La pastilla se resuspendió en una solución de NaCl 0.8M, KH₂PO₄ 0.01M, EDTA 1mM, pH 7.5, se agitó, sonicó y centrifugó para obtener las globulinas 11S. Las prolaminas se extrajeron con etanol al 70% a partir de la última pastilla y las glutelinas con Tris 100mM pH 8. La concentración de proteína se estimó utilizando el reactivo Protein-Assay (BioRad, Hercules, CA), empleando albúmina de bovino como estándar. Las fracciones se conservaron a -20°C hasta su análisis.

2.2 Obtención de péptidos bioactivos

Para liberar y caracterizar el efecto de los péptidos encriptados dentro de las proteínas de reserva de amaranto, se probaron diferentes digestiones con la enzima tripsina de páncreas de cerdo (Sigma St. Louis MO, USA) utilizando diferentes relaciones de enzima:sustrato (p:p). La tripsina es una endoproteasa de serina que hidroliza los enlaces peptídicos en el grupo carboxilo de los residuos de lisina y arginina (Whitcomb y Lowe 2007). Brevemente, 5 mg de proteínas de amaranto fueron resuspendidos en Tris 100 mM, pH 8 en un agitador orbital por 14 h a 37°C. La reacción se detuvo congelando la mezcla. Para eliminar la tripsina de cada fracción digerida se sometió a ultracentrifugación usando filtros con un corte de peso molecular de 10 kDa. El filtrado se colectó y se cuantificó la concentración de proteína soluble.

Los péptidos correspondientes a las digestiones 1:5 y 1:2.5 se separaron por cromatografía de exclusión molecular. Una alícuota de 500 µl se pasó por una columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) acoplada al sistema de cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC por

sus siglas en inglés) ÄKTA (Amersham Biotech, Uppsala, Sweden) a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min colectando fracción cada ml usando como solución de elución Tris 10 mM, pH 8. Se colectaron los picos importantes y se concentró 10 veces su volumen al vacío con un Speed-Vac (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2.3 Mapeo de las masas de los péptidos de amaranto por MALDI-TOF

Los hidrolizados obtenidos de la digestión con tripsina fueron analizados por desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un detector de iones tipo tiempo de vuelo (MALDI-TOF por sus siglas en inglés) usando un Voyager-DE STR de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Se utilizaron los siguientes parámetros en el análisis: modo de operación lineal, polaridad positiva y un rango de escaneo con una m/z entre 100 y 10 000.

2.4 Simulación de la digestión gastrointestinal

Para simular la digestión del tracto gastrointestinal de las proteínas de amaranto se siguió el protocolo sugerido por Wang et al. (2008) con algunas modificaciones. Se resuspendió 1 g de harina desengrasada o glutelinas de amaranto en 20 ml de una solución de NaCl 0.03 M pH 2. Estas suspensiones se calentaron a 80°C por 5 min. Una vez frías, se agregó pepsina de mucosa gástrica de cerdo (Sigma) en una relación 1:20 (p:p) y la proteína se digirió a 37°C por 3 h en agitación y pH constante. Posteriormente se ajustó el pH a 7.5, se agregó una solución de pancreatina/tripsina de páncreas de cerdo (Sigma) a una relación 1:20 (p:p) y se incubó a 37°C por 3 h en agitación y pH constante. La hidrólisis se detuvo calentando la suspensión a 75°C por 20 min. Este hidrolizado se centrifugó a 13000 rpm por 30 min se determinó la concentración de proteína del sobrenadante y se guardó a -20°C hasta su análisis.

2.5 Ensayo de actividad de la DPP IV

Los ensayos de inhibición de la actividad de la DPP IV se realizaron usando el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA (Sigma) el cual al ser cortado por la enzima libera *p*-nitro anilida que da una coloración amarilla. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos usando la dipeptidil peptidasa de riñón de cerdo (Sigma) a una concentración de 100 ng/ml, 500 μ M de sustrato y concentraciones crecientes de los digeridos de amaranto, usando como buffer de reacción Tris 100 mM, pH 8. Las diferentes muestras se incubaron por 1 h a 37°C y se leyó la absorbencia a 415 nm en un lector de microplacas (BioRad). Todas las muestras se leyeron por triplicado usando como control positivo de inhibición diferentes concentraciones del inhibidor de proteasas Diprotin A (Ile-Pro-Ile, Sigma).

2.6 Cultivos celulares

Se trabajó con la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón (ATCC CL-173, Manassas, VA, USA). Las células se expandieron en DMEM con 4.5 g/L de glucosa, 158 mg/L de glutamina, 110 mg/L de piruvato, suplementado con suero de ternera al 10%, 1000 unidades de penicilina/ml y 1000 µg de estreptomicina/ml (Gibco, Grand Island, NY, USA). Se sembraron 3×10^4 , 5×10^3 , 3×10^5 células en placas de 24, 96 pozos y en frascos de 75 cm² respectivamente para los ensayos de acumulación de lípidos, viabilidad celular y extracción de proteína. Una vez alcanzada la confluencia, las células se sometieron a diferenciación (en presencia o ausencia de los digeridos de amaranto) en DMEM suplementado con antibiótico, 10% de suero fetal bovino, insulina de bovino 1 µg/ml, 3-isobutil-1-metilxantina 500 µM y dexametasona 1 µM (Sigma) (día 0). Al segundo día de iniciada la diferenciación, se les cambió el medio a las células por DMEM suplementado con antibiótico, 10% de suero fetal bovino e insulina de bovino 1 µg/ml. A partir del cuarto día, se mantuvieron las células con medio simple (DMEM, suero fetal bovino al 10% y antibiótico), renovando el medio cada dos días hasta que las células tomaran el fenotipo de adipocitos maduros, mostrando una evidente acumulación de grasa (aproximadamente en el día 12). Al final del tratamiento se colectaron las células para los ensayos de acumulación de lípidos con la tinción de rojo oleoso reportada por Martínez-Villaluenga et al. (2010), y para la extracción de proteína. Los experimentos se realizaron al menos tres veces por triplicado. Todos los ensayos se corrieron con su respectivo control de viabilidad celular, el cual fue determinado usando el CellTiter 96[®]Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7 Perfiles proteínicos 2-DE

Las proteínas de las células 3T3-L1 diferenciadas y sin diferenciar en presencia y ausencia de los digeridos de amaranto usando una solución de lisis con urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 4%, DTT 100 mM y PMSF 1 mM. Las células se sonicaron en baño por 20 min y se centrifugaron a 7930 rpm por 20 min. Se colectó el sobrenadante y las proteínas solubles se precipitaron con 3 volúmenes de acetona fría por 2 h a -20°C y se centrifugó a 13000 rpm por 30 min. La pastilla se resuspendió en solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, buffer IPG al 2% y azul de bromofenol al 1%) y se determinó la concentración de proteína soluble empleando el reactivo Protein-Assay (BioRad).

Tiras de isoelectroenfoque de 13 cm pH 3-10 (GE Healthcare) se rehidrataron en la solución de rehidratación con 240 µg de proteína por 12 h. Las proteínas se separaron por su punto isoeléctrico en el aparato Ettan IPGphor II (GE Healthcare) bajo el siguiente protocolo: gradiente 500 V-2 h; gradiente 500 V-

10 Vh; gradiente 4000 V-5600 Vh y "step and hold" 8000 V-15 200 Vh. Una vez terminado el isoelectroenfoco, las tiras se equilibraron por 15 min en una solución urea 6 M, Tris-HCl 75 mM pH 8.8, glicerol al 29.3%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.002% y DTT 64.8 mM. Posteriormente las proteínas enfocadas se separaron en la segunda dimensión en geles de poliacrilamida en gradiente del 10-15% en el sistema de electroforesis Ruby SE 600 a 15 y 30 mA por 6 h. Los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal. Cada muestra se corrió por triplicado y se analizaron y normalizaron los puntos diferenciales en cada condición usando el software de análisis de imágenes MELANIE 7 (GeneBio, Geneva, Switzerland).

3. Resultados y discusión

3.1. Digestión de glutelinas de amaranto y caracterización de péptidos por MALDI-TOF

En la figura 1A se muestra el patrón electroforético de las diferentes proteínas de reserva de la semilla de amaranto, el patrón obtenido fue característico de cada fracción y fue similar al reportado anteriormente (Barba de la Rosa et al. 1992). Debido a que la fracción glutelinas es una de las principales fracciones de proteínas de reserva en amaranto y además es donde previamente se había reportado la presencia de péptidos con diferente actividad biológica (Silva-Sánchez et al. 2008), nos hemos enfocado en caracterizar los biopéptidos encriptados en esta fracción. En la figura 1B se muestra la digestión con tripsina de la fracción glutelinas, observándose que, conforme se aumenta la concentración de enzima, las bandas de mayor peso molecular desaparecen mientras que aumentan las de menor tamaño hasta quedarse solamente con fragmentos menores a 10 kDa, estos péptidos ya no son detectables por la tinción de Coomassie. En la figura 1C se muestra la digestión con tripsina de la fracción glutelinas en una relación 1:5 (enzima:sustrato) a lo largo del tiempo, donde se observa que desde los primeros 10 min de digestión las bandas de mayor peso molecular desaparecen y a lo largo de las 14 h prevalece un barrido debido a la degradación de la proteína. La caracterización de estos péptidos fue llevada a cabo por el análisis de MALDI-TOF (tabla 1), donde se obtuvieron registros de masas moleculares de diferentes intensidades según el grado de digestión. En la digestión 1:10 predominan fragmentos de 750 hasta 8 000 Da; mientras que en la digestión 50:1, que puede considerarse como una digestión completa, se observan péptidos menores de 3 000 Da. Las cantidades elevadas de enzima necesarias para cortar las glutelinas probablemente indiquen cierta resistencia a la hidrólisis por tripsina, lo cual ya se ha reportado en otras proteínas de amaranto (Condés et al. 2009), aunque en relaciones enzima/sustrato mucho menores. Cabe mencionar que un ambiente reductor para desnaturalizar la proteína no cambia significativamente el producto final de las digestiones (datos no mostrados).

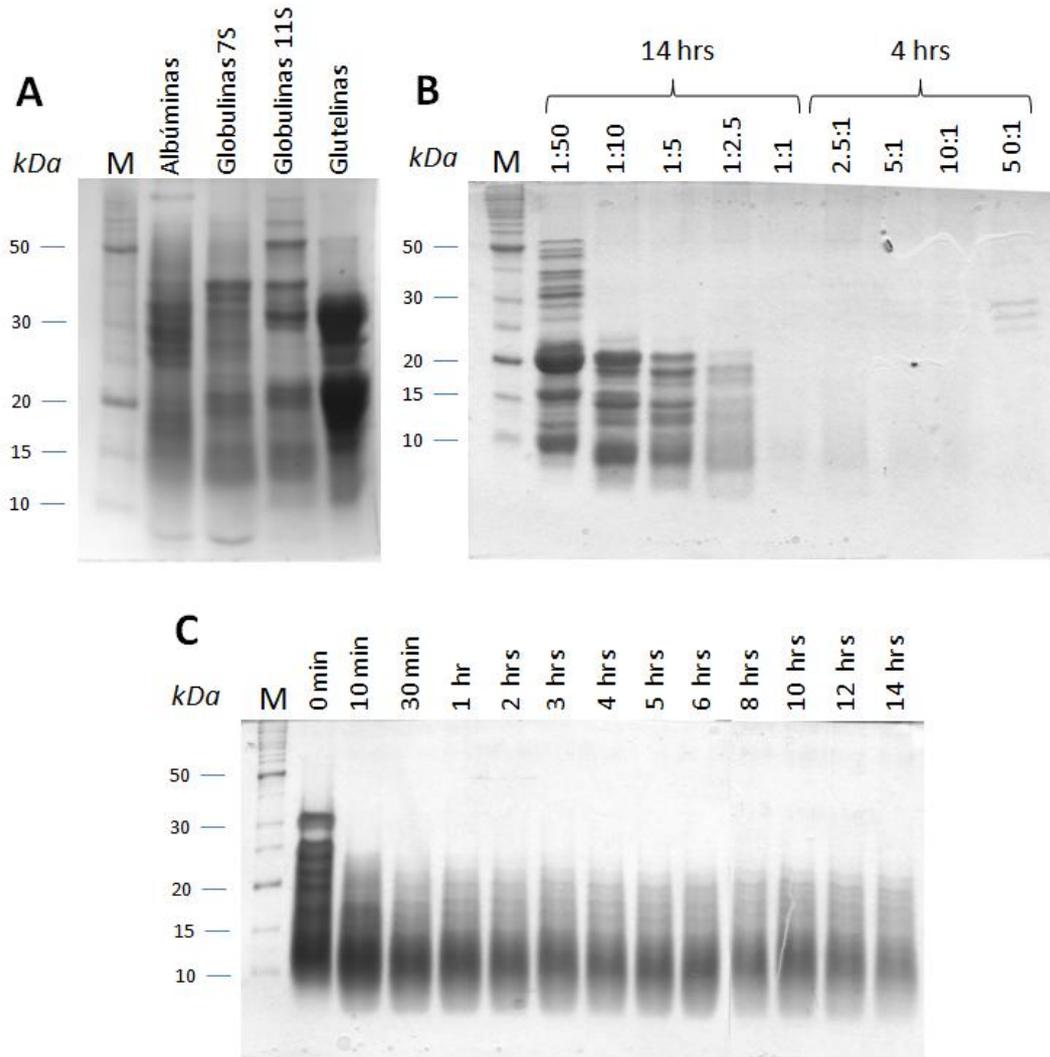


Figura 1. SDS-PAGE de la digestión de glutelinas de amaranto. (A) gel representativo de las diferentes proteínas de reserva de la semilla de amaranto. (B) patrón electroforético de las diferentes digestiones tríplicas de las glutelinas de amaranto; relación enzima:sustrato (p:p). (C) patrón electroforético de la digestión tríplica de las glutelinas de amaranto en una relación 1:5 enzima:sustrato (p:p) a lo largo del tiempo. Geles de poliacrilamida al 12% teñidos con Coomassie coloidal

Tabla 1. Distribución del tamaño de los fragmentos de las glutelinas de amaranto digeridas con tripsina

1:10		50:1	
Masa molecular (Da)	Intensidad relativa (%)	Masa molecular (Da)	Intensidad relativa (%)
509,42	XX	104,56	XX
511,47	XX	122,58	XXXX
516,48	XX	133,54	X
580,17	XX	147,55	XX
584,31	XX	159,55	XX
594,1	XX	164,52	XX
600,97	XX	172,51	XXX
661,89	XX	175,54	X
665,07	XX	190,51	XXX
676,09	XX	212,46	XX
703,11	X	240,64	X
752,3	XX	262,55	XX
760,32	XXX	294,48	XX
763,65	XX	299,63	XX
801,34	XXXX	303,54	X
832,92	X	317,48	XX
882,15	XX	335,5	XX
891,2	XX	359,54	X
900,3	XXXX	379,47	XXX
907,5	XX	413,5	X
915,14	X	475,42	X
932,18	XX	529,55	XX
963,28	XX	583,54	X
972,3	XX	650,48	XX
977,88	XXX	659,63	XXX
998,25	XXX	677,55	XX
1003	XX	716,54	X
1013,32	XX	802,57	XX
1023,04	XX	810,59	XX
1036,23	X	824,59	X
1077,66	XX	1020,57	X
1117,62	X	1153,63	X
1151,02	XX	1348,63	X
1171,4	XX	1613,73	X
1180,28	XX	1631,79	XX
1247,57	X	1677,98	XX
1263,12	X	1699,75	XX
1417,3	XX	1758,97	XX
1423,29	XX	1916	X
1465	XX	2067,46	X
1473,04	X	2144,63	X
1526,58	X	2164,68	XX
1552,19	XX	2194,75	XX
1602,24	XX	2274,83	X
1634,17	X	2324,84	X
1670,97	XX	2821,11	X
1674,67	XX		
1692,33	XXX		
1706,48	XX		
1823,66	X		
1857,69	X		
1963,35	XX		
1995,22	X		
2002,5	X		
2023,29	XX		
2097,13	X		
2161,65	XX		
2200,7	XX		
2200,77	XX		

X:<10%; XX: 10-39%;XXX: 40-70% ; XXXX:>70%

Continuación Tabla 1.

1:10		50:1	
<i>Masa Molecular (Da)</i>	<i>Intensidad relativa (%)</i>	<i>Masa Molecular (Da)</i>	<i>Intensidad relativa (%)</i>
2250,32	X		
2261,64	XX		
2347,53	X		
2504,83	X		
2524,77	X		
2619,75	X		
2734,01	X		
2770,3	X		
2852,94	X		
689327	XXX		
787357	XX		

X:<10%; XX: 10-39%;XXX: 40-70% ;XXXX:>70%

3.2. Purificación de péptidos por cromatografía de filtración en gel y actividad inhibitoria de DPP IV

Para purificar los péptidos responsables de la actividad biológica se llevó a cabo la cromatografía de filtración en gel empleando el sistema FPLC. Se optó por las digestiones 1:5 y 1:2.5, debido a que presentan un rango de fragmentación más amplio (figura 1C). El cromatograma muestra que los fragmentos liberados por la tripsina se distribuyen en cinco picos mayoritarios a 7.5, 13.5, 17.8, 20 y 26.8 ml (figura 2), los cuales se mantienen constantes y las amplitudes varían según el grado de digestión. Es importante mencionar que en la información previa ya se sabía que los péptidos con una posible actividad biológica tienen longitudes de 2 a 6 aminoácidos. El volumen de elución que presentó nuestro control positivo de inhibición de la DPP IV, el diprotín A (Ile-Pro-Ile) fue de aproximadamente 16.8 ml nos llevó a pensar que probablemente a estos volúmenes podríamos observar algún efecto, por lo que se corrieron varias columnas con digeridos de amaranto y se preparó un pool de los picos principales. Los picos observados a los 17.8 y 20 ml se colectaron en una sola fracción.

Una vez liberados los péptidos bioactivos encriptados en las proteínas de amaranto se prosiguió a la caracterización biológica, que incluía los ensayos *in vitro* de la DPP IV. La figura 3A muestra que las glutelinas sin digerir no presentan un efecto sobre la actividad de la enzima y al aumentar el grado de digestión, la actividad de la DPP IV va disminuyendo a una manera dosis-dependiente; debido posiblemente a que los péptidos inhibidores de menor tamaño aumentan. En la figura 3B, se observa que al eliminar los fragmentos mayores a 10 kDa por ultracentrifugación la tendencia a inhibir la DPP IV es prácticamente la misma sin importar el grado de hidrólisis. Lo cual confirma lo observado en la figura 3A y además proporciona evidencia de que no es necesario tener péptidos de dos y tres aminoácidos para inhibir a la DPP IV. De manera similar las fracciones obtenidas por FPLC (figura 3C) fueron capaces de inhibir a la DPP IV, principalmente las fracciones 2 y 3. Al analizar el patrón electroforético de las fracciones se observó que sólo la fracción 1 presentó bandas detectables por la tinción de Coomassie (mayores a 10 kDa) que coinciden con una baja actividad inhibitoria de la DPP IV. Con respecto a la fracción 4, no se observó ningún tipo de inhibición de la enzima, probablemente porque se trataba de aminoácidos libres, basándose en los volúmenes de elución comparados con el volumen de elución del tripéptido Diprotin A.

También se determinó la actividad de la DPP IV en presencia de hidrolizados de las demás fracciones de las proteínas de reserva de la semilla del amaranto. En la figura 3D se puede apreciar que todas las fracciones fueron capaces de inhibir a la enzima al menos en un 20% a las concentraciones utilizadas y pareciera que siguen el mismo patrón a razón de la dosis.

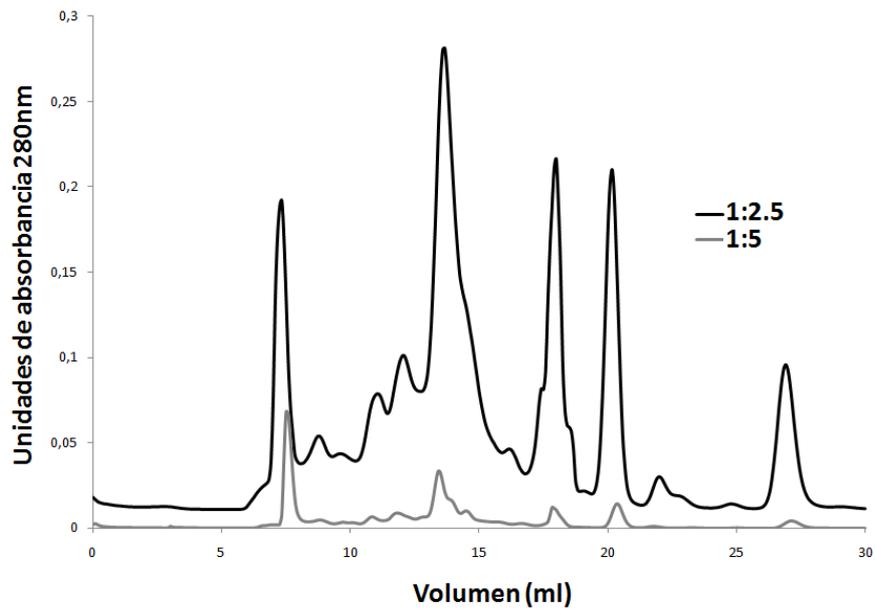


Figura 2. Cromatograma resultante de la separación de diferentes digeridos trípticos de amaranto por filtración en gel. Columna Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare) acoplada al sistema FPLC ÅKTA (Amersham). Velocidad de flujo 0.5 ml/min. Solución de elución Tris 10 mM pH 8. λ :280nm

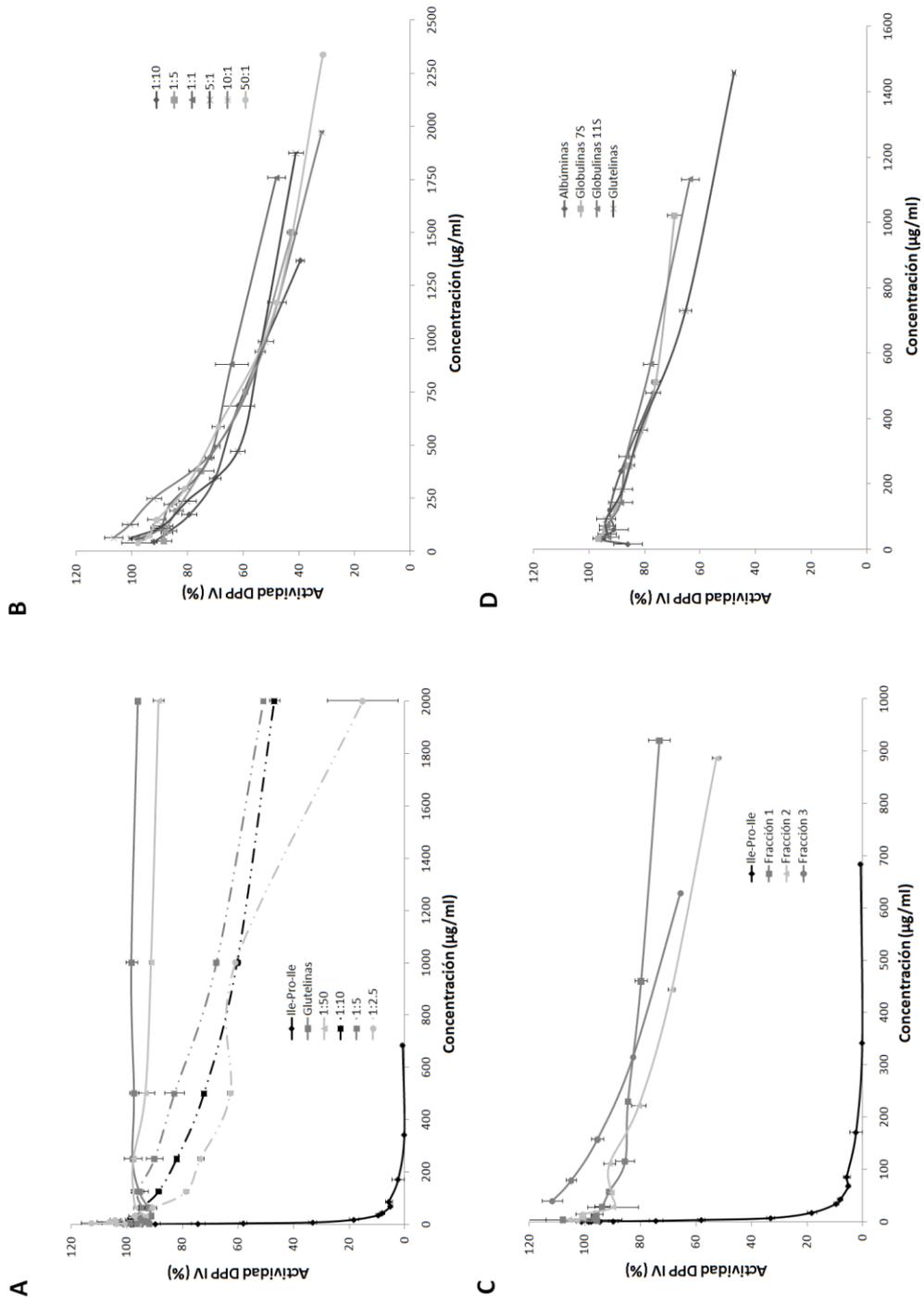


Figura 3. Ensayos de actividad de la DPP IV en presencia de péptidos de amaranto. (A) efecto de las diferentes digestiones con tripsina. (B) efecto de la eliminación de la tripsina por ultracentrifugación. (C) Efecto de las fracciones colectadas por FPLC: volumen de elución fracción 1 (7.5 ml), fracción 2 (13.5 ml), fracción 3 (17.8-20 ml), fracción 4 (26.8 ml) (Ver figura 2). (D) Efecto de las diferentes proteínas de reserva de la semilla de amaranto digeridas con tripsina (1:2.5 enzima:substrato p:p). Concentración DPP IV: 100 ng/ml. Concentración de sustrato: 500 µM. Tiempo de reacción: 1 h a 37°C. λ: 415nm.

Esta información en conjunto nos indica que la tripsina es capaz de liberar fragmentos con actividad inhibitoria de la DPP IV, enzima involucrada en la diabetes, confirmando lo reportado por Silva-Sánchez et al. (2008); por lo que el siguiente paso fue estimar si esto pudiera ocurrir con el simple consumo del amaranto. Para esto se utilizó un modelo de digestión *in vitro* donde se utilizaron las principales enzimas responsables de la degradación de proteínas en el tracto gastrointestinal: la pepsina del estómago y la pancreatina y tripsina liberadas por el páncreas en el intestino delgado. En este caso se trabajó con una muestra directa de harina desengrasada de amaranto y un extracto proteínico correspondiente a las glutelinas. En la figura 4 se observa que ambas muestras inhiben a la DPP IV hasta en un 60%, aunque la harina necesitó de una concentración más elevada para alcanzar estos niveles. Esto pudiera decirnos que en la harina existen otras sustancias como azúcares, almidones y otros compuestos de naturaleza no péptida que pudieran estar diluyendo o enmascarando los efectos de las proteínas. En cuanto al mecanismo de acción, el trabajo de Silva-Sánchez et al. (2008) proporciona algunas de las secuencias responsables de la inhibición de la DPP IV, entre las que se encuentra el tripéptido Diprotin A utilizado en este estudio; un inhibidor no covalente que al unirse transitoriamente al sitio catalítico de la enzima, bloquea la degradación de cadenas polipeptídicas de mayor tamaño, como las incretinas (Wiedeman 2007). Es muy probable que gran parte de los péptidos de amaranto liberados por la digestión enzimática trabajen de esta manera. Sin embargo, también es posible que se encuentren péptidos cuyo mecanismo de acción sea diferente.

En conjunto, estos análisis demuestran el potencial antidiabético del amaranto a través de la inhibición de la DPP IV, utilizando no sólo una enzima, sino utilizando un modelo de digestión *in vitro*.

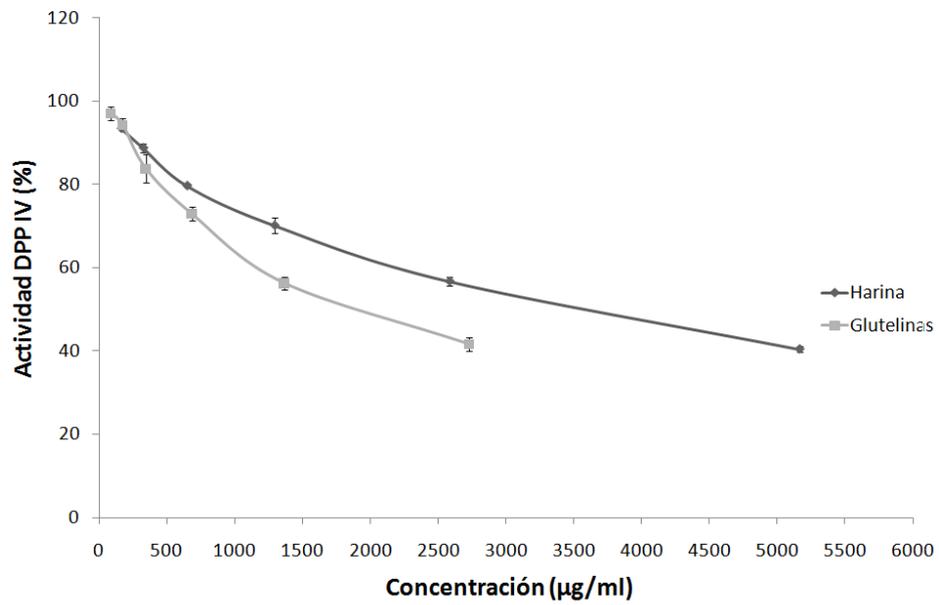


Figura 4. Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* del amaranto sobre la actividad de la DPP IV. Condiciones digestión in vitro: Pepsina 1:20 p:p pH 2 por 3 h; tripsina y pancreatina 1:20 p:p pH 7.5 por 3 h. Concentración DPP IV: 100 ng/ml. Concentración de sustrato: 500 µM. Tiempo de reacción: 1 h a 37°C. λ: 415nm

3.3 Efecto de los péptidos de amaranto sobre el crecimiento y diferenciación de la línea celular 3T3-L1

Con respecto al efecto de los hidrolizados de amaranto sobre adipocitos, se utilizó la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos de ratón, que al exponerse en medio adipogénico es capaz de diferenciarse a adipocitos y presentar un fenotipo clásico de acumulación de gotas de grasa o triglicéridos (Sook Sul et al. 1998, Cowherd et al. 1999, Poulos et al. 2010). En la figuras 5A y 5B se presentan fotografías al microscópico de las células después de haber sido sometidas al proceso de diferenciación en ausencia y presencia de los péptidos de amaranto por 12 días. Se observa una diferencia muy marcada entre las células control (que acumularon una gran cantidad de grasa) y las células tratadas con amaranto (que no todas las células parecieran haber alcanzado el fenotipo de adipocitos. Esto se aprecia mejor al hacer el análisis semicuantitativo con la tinción de rojo oleoso (figura 5C), donde se muestra una disminución en la acumulación de lípidos a concentraciones tan bajas como 1 µg/ml. Parece ser que la acumulación es más marcada en las células ya diferenciadas que fueron expuestas sólo 48 h con los hidrolizados. Esto puede deberse a que el efecto observado sea una consecuencia de cambios en la expresión o actividad de la enzima ácido graso sintasa (FAS por sus siglas en inglés), una de las enzimas clave de los adipocitos, que forma parte del paso final de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos y que además es susceptible a cambios hormonales y en la dieta (Clarke 1993). La figura 5D muestra los cambios que producen los hidrolizados de amaranto sobre la viabilidad celular. Puede concluirse que en las concentraciones en nuestro estudio, los péptidos de amaranto no produjeron la muerte de las células y por tanto los cambios observados en la acumulación de lípidos se deben a cambios en el metabolismo de las células más que a un efecto de toxicidad.

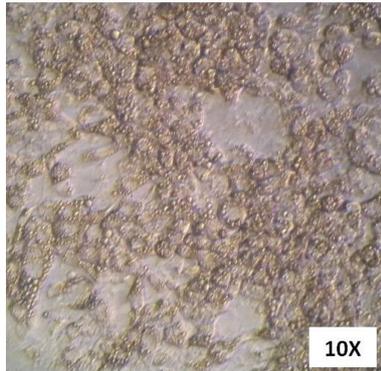
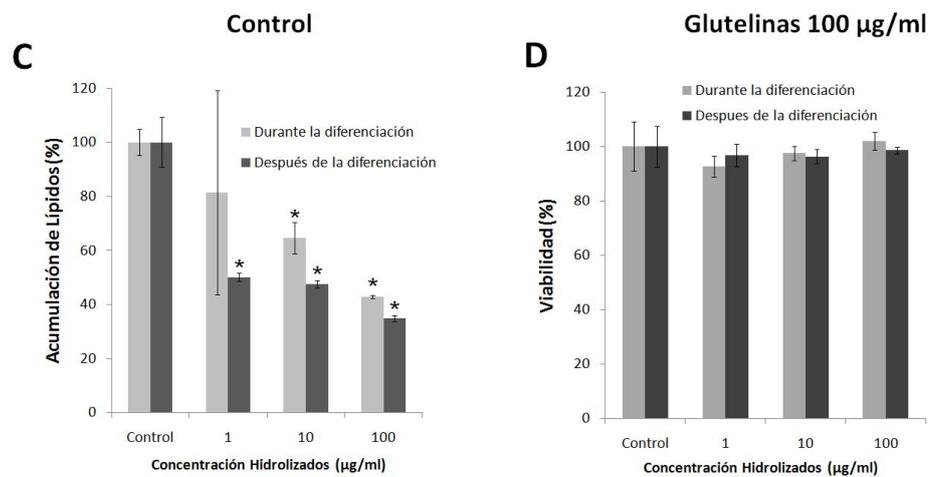
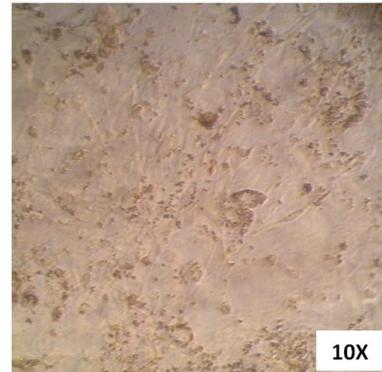
A**B**

Figura 5. Efecto de los hidrolizados trópticos de amaranto sobre la línea celular 3T3-L1. (A) preadipocitos sometidos a diferenciación teñidos con rojo oleoso. (B) preadipocitos sometidos a diferenciación en presencia de los digeridos trópticos de las glutelinas de amaranto teñidos con rojo oleoso. (C) ensayo semicuantitativo de acumulación de lípidos por la tinción de rojo oleoso en preadipocitos sometidos a diferenciación en presencia y ausencia de los digeridos de amaranto durante y después de la diferenciación λ 510 nm. (D) ensayo de viabilidad celular de preadipocitos sometidos a diferenciación en presencia y ausencia de los digeridos de amaranto durante y después de la diferenciación λ 490 nm. * $p < 0.001$ con respecto a su control.

3.4 Análisis proteómico de células 3T3-L1 en presencia y ausencia de péptidos de amaranto

Para detallar los efectos de los hidrolizados sobre los preadipocitos y adipocitos de ratón a nivel de proteoma, se extrajeron las proteínas de las células en presencia y ausencia de los péptidos de amaranto para su separación en geles de dos dimensiones, primer por su punto isoeléctrico y después por su masa molecular. Al analizar las imágenes con el software MELANIE 7 se identificaron más de 200 puntos que mostraron diferencias entre ellas en el estadio de preadipocitos y adipocitos en presencia y ausencia de los péptidos de amaranto (figura 6). Al comparar los controles se encontró que durante el proceso de diferenciación se reprime la expresión de 32 proteínas, existe un aumento en la expresión de 14 proteínas y una disminución de otras 7. Cuando se analizaron los geles exclusivamente de los preadipocitos se observó que 11 proteínas ya no estuvieron presentes, aumentó la expresión de 2 y disminuyó la expresión de 7 en presencia de las glutelinas. Con respecto a los adipocitos, el cambio más notable fue durante un tratamiento crónico durante la diferenciación que uno más agudo en las células ya diferenciadas; donde el tratamiento crónico hizo que ya no estuvieran 5 proteínas, aparecieran 21, aumentara la expresión de 10 y disminuyera la expresión de 2, mientras que el tratamiento agudo sólo hizo que aparecieran 4 proteínas, aumentara la expresión de 3 y desaparecieran 2. Todavía queda pendiente analizar estos puntos por espectrometría de masas en tandem para identificar a qué proteínas corresponden. Además es necesario comparar los cambios en las proteínas de células ya diferenciadas en presencia de los péptidos de amaranto y determinar los cambios en algunos marcadores de diferenciación por RT-PCR.

En conclusión podemos comentar que los efectos observados en la acumulación de grasa pudieran deberse directa o indirectamente a los péptidos inhibitorios de la DPPIV. Mucha de la información disponible atribuye estos efectos a la interacción de las incretinas con el sistema nervioso central, generalmente a nivel del hipotálamo (Kos et al. 2009, Torekov et al. 2011, Stephan et al. 2011) y a nivel fisiológico (Conarello et al. 2003). Sin embargo, en este trabajo no hubo una administración exógena de incretinas a nuestro sistema biológico. Ya se ha reportado que esta línea celular expresa la DPP IV a manera de una proteína de membrana, aunque se asoció una función sobre la adhesión celular y no un papel metabólico (Bauvois 1988). Es necesario profundizar en nuestros estudios antes de proponer un nuevo papel de la DPP IV en el tejido adiposo.

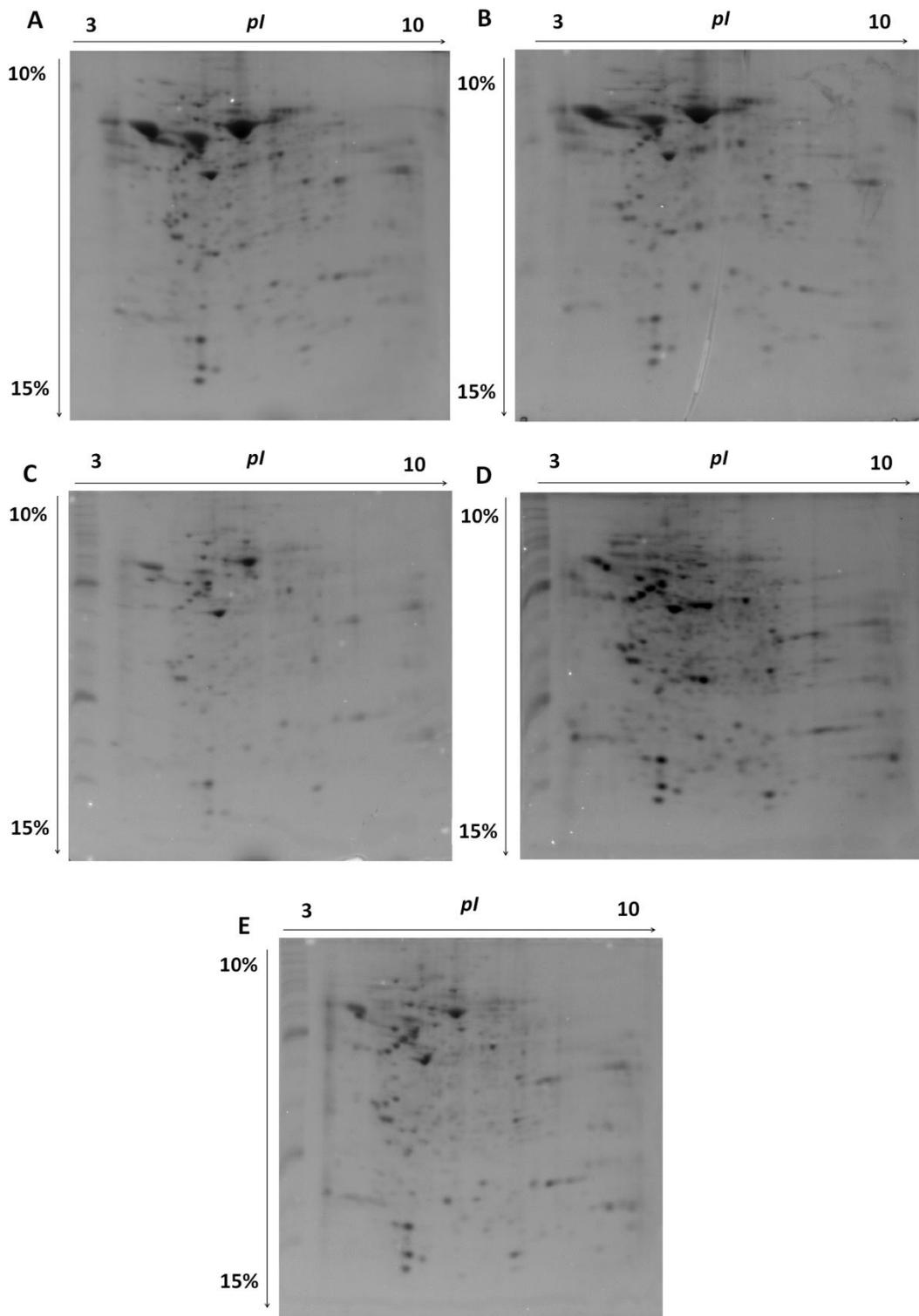


Figura 6. 2D-SDS-PAGE de la línea celular 3T3-L1 en presencia y ausencia de los péptidos de amaranto. (A) preadipocitos en condiciones control. (B) preadipocitos en presencia de los digeridos trípticos de las glutelinas de amaranto a una concentración 100 µg/ml por 48 h. (C) preadipocitos sometidos a la diferenciación por 12 días en condiciones control. (D) preadipocitos sometidos a la diferenciación por 12 días en presencia de los digeridos trípticos de las glutelinas de amaranto a una concentración 100 µg/ml durante todo el proceso de diferenciación. (E) preadipocitos sometidos a la diferenciación por 12 días en presencia de los digeridos trípticos de las glutelinas de amaranto a una concentración 100 µg/ml después del proceso de diferenciación.

Este trabajo proporciona la primera evidencia *in vitro* de la posible actividad antidiabética de los digeridos tripticos de las proteínas de reserva de la semilla de amaranto que; a diferencia de la información contrastante en la literatura, presenta un efecto inhibitorio en la acumulación de grasa por los adipocitos y posiblemente en la formación de estos al cambiar la expresión de ciertos marcadores de diferenciación.

4. Referencias

- Aichike FI, To NP, Wang H, Kwan C. Obesity, metabolic syndrome, adipocytes and vascular function: A holistic viewpoint. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:1-10
- Barba de la Rosa AP, Barba-Montoya A, Martínez-Cuevas P, Hernández-Ledesma B, De León-Rodríguez A, González C. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide* 2010; 23:106-111
- Barba de la Rosa AP, Fomsgaard IS, Laursen B, Mortensen AG, Olvera-Martínez JL, Silva-Sánchez C, Mendoza-Herrera A, De León-Rodríguez A, González-Castañeda J. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *J Cereal Sci* 2009; 49:117-121
- Barba de la Rosa AP, Gueguen J, Paredes-López O, Viroben G. Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J Agric Food Chem* 1992; 40:931-936
- Bauvois B. A collagen-binding glycoprotein on the surface of mouse fibroblasts is identified as dipeptidyl peptidase IV. *Biochem J* 1988; 252:723-731
- Berger A, Gremaud G, Baumgartner M, Rein D, Monnard I, Kratky E, Geiger W, Burri J, Dionisi F, Allan M, Lambelet P. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters. *Int J Vitam Nutru Res* 2003; 73:39-47
- Clarke SD. Regulation of fatty acid synthase gene expression: an approach for reducing fat accumulation. *J Anim Sci* 1993; 71:1957-1965
- Condés MC, Scilingo AA, Añón MC. Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT-Food Science and Technology* 2009; 42:963-970
- Corarello SL, Li Z, Ronan J, Roy RS, Zhu L, Jiang G, Liu F, Woods J, Zycband E, Möller DE, Thornberry NA, Zhang. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *PNAS* 2003; 100:6825-6830
- Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE. Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Cell Dev Biol* 1999; 10:3-10
- Czerwinskia J, Bartnikowskab E, Leontowicza H, Lange E, Leontowics M, Katrich E, Trakhtenberg S, Gorinstein S. Oat (*Avena sativa* L.) and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) meals positively affect plasma lipid profile in rats fed cholesterol-containing diets. *J Nutr Biochem* 2004; 15:622-629.
- deLumen BO. Lunasin: a cancer preventive soy peptide. *Nutr Rev* 2005; 63:16-21
- Erdmann K, Cheung BWY, Schröder H. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem* 2008; 19:643-654
- Escudero NL, Zirulnik F, Gomez NN, Mucciarelli SI, Giménez MS. Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid metabolism. *Exp Biol Med* 2006; 231:50-59
- Fergusson LR. Nutrigenomics: integratin genomic approaches into nutrition research. *Mol Dagn Ther* 2006; 10:101-108
- Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Ogden CL, Dietz WH. Racial and ethnic differences in secular trends for childhood BMI, weight and height. *Obesity (Silver spring)* 2006; 14:301-308
- Gibbs BF, 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
- Huisamen B, Genis A, Marais E, Lochner A. Pre-treatment with a DPP-4 Inhibitor is Infarct Sparing in Hearts from Obese, Pre-diabetic rats. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 25:13-20
- Kalinova J, Dadakova E. Rutin and Total quercetin content in amaranth (*Amaranthus spp.*). *Plant Foods Hum Nutr* 2009; 64:68-74
- Karam JG, McFarlane SI. Update on the Prevention of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2011; 11:56-63
- Kim HK, Kim MJ, Shin DH. Improvement of lipid profile by amaranth (*Amaranthus esculantus*) supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Nutr Metab* 2006; 50:277-281

Kos K, Baker AR, Jernas M, Harte AL, Clapham JC, O'Hare JP, Carlsson L, Kumar S, McTernan PG. DPP-IV inhibition enhances the antilipolytic action of NPY in human adipose tissue. *Diab Obes Meta* 2009; 11:285-292

Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejía E, deLumen BO, Barba de la Rosa AP. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides* 2010; 31:1635-1642

Marcone MF, Kakuda Y, Yada RY. Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods Hum Nutr* 2004; 58:207-211

Martínez-Villaluenga C, Rupasinghe SG, Schuler MA, González de Mejía E. Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. *FEBS J* 2010;277:1481-1493

Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr* 2008; 47:171-182

Nauck MA, 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 Inv* 2010; 1:24-36

Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med* 2010; 235:1185-1193

Rao RS, Kini S. GIP and Bariatric Surgery. *Obes Surg* 2011; 21:244-252

Sancho V, Trigo MV, Martín-Duce A, González N, Acitores A, Arnés L, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peácarillo ML. Effect of GLP-1 on D-glucose transport, lipolysis and lipogenesis in adipocytes of obese subjects. *Int J Mol Med* 2006; 17:1133-1137

Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Inv* 2010; 1:8-23

Silva-Sánchez C, Barba de la Rosa AP, León-Galván MF, deLumen BO, De León-Rodríguez A, González de Mejía E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds. *J Agric Food Chem* 2008; 56:1233-1240

Sook Sul H, Smas CM, Wang D, Chen L. Regulation of Fat Synthesis and Adipose Differentiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998; 60:317-345

Stephan M, Radicke A, Leutloff S, Schmiedl A, Pabst R, von Hörsten S, Dettmer S, Lotz J, Nave H. Dipeptidyl peptidase IV (DPP4) deficiency attenuates diet-induced obesity in rats: Possible implications for the hypothalamic neuropeptidergic system. *Beh Brain Res* 2011; 216:7123-718

Tironi VA, Añón MC. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food research international* 2006;43:315-322

Torekov SS, Madsbad S, Holst JJ. Obesity- an indication for GLP-1 treatment? Obesity pathophysiology and GLP-1 treatment potential. *Obes Rev* 2011; doi:10.1111/j.1467-1479X

Tzotzas T, Evangelou P, Kiortsis DN. Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors. *Obes Rev* 2011; 12:e282-e289

Valavanis IK, Mougiakakou SD, Grimald K, Nikita KS. A multifactorial analysis of obesity as CVD risk factor: Use of neural network based methods in nutrigenetics context. *BMC Bioinformatics* 2010; 11:453

Wang W, Bringe NA, Berhow MA, Gonzalez de Mejia E. β -Conglycinins among Sources of Bioactives in Hydrolysates of Different Soybean Varieties That Inhibit Leukemia Cells in Vitro. *J. Agrig. Food Chem* 2008; 56:4012-4020

Whitcomb DC, Lowe ME. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig Dis Sci* 2007; 52:1-17

Wiedeman PE, Trevilayn JM. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Curr Opin Invest Drugs* 2003; 4:412-420

Yu DMT, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB, McCaughan GW, Gorrel MD. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010; 277:1126-1144