

Actividad biológica inhibitoria de los péptidos de las globulinas 11s de nuez (*Carya illinoensis*) sobre la enzima dipeptidil peptidasa IV

León Galván M.F.^{a,b,*}, León Jaramillo K.E.^b, del Rincón Castro M.C.^{a,b}, Gutiérrez Chávez A.J.^{a,c}, Gutiérrez-Vargas S.^{d,e}

^aDepartamento de Alimentos, ^bPosgrado en Biociencias, ^cDepartamento de Medicina Veterinaria, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato-Silao k.m 9.0. El Copal, Irapuato, Guanajuato, México. C.P. 36500.

^dDepartamento de Energías, Universidad Politécnica de Guanajuato, Av. Universidad Sur 1001, Comunidad Juan Alonso, Cortazar, Guanajuato, 38483, México. ^eEnergymet Co. Blvd. Epsilon 1029, Fracciones de San Juan Bautista, León Guanajuato, 37545, México. Correo electrónico para contacto: *fabiola@ugto.mx

RESUMEN:

La diabetes es una enfermedad crónica que afecta a millones de personas en todo el mundo, ante esta situación surge la necesidad de buscar estrategias que coadyuven en su control y prevención, en ese sentido en el presente trabajo se evaluó la capacidad que poseen los péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática de globulinas 11S de nuez para inhibir la enzima Dipeptidil-Peptidasa IV (DPP-IV). Se encontró que 150 µg/mL de los hidrolizados ejercen una inhibición de 49% sobre la DPP-IV. Los resultados son interesantes dado que es la primera vez que a la nuez se le asocia como coadyuvante para tratar la diabetes mellitus tipo 2.

ABSTRACT:

Diabetes is a chronic disease that affects millions of people all over the world. Given this situation, there is a need to look for strategies that contribute its control and prevention. In this sense, the capacity of bioactive peptides was evaluated in this work, obtained by enzymatic hydrolysis of walnut 11S globulins to inhibit the enzyme Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP-IV). It was found that 150 µg / mL of the hydrolysates exert a 49% inhibition on the DPP-IV. The results are interesting since it is the first time that the nut is associated as an adjuvant to treat diabetes mellitus type 2.

Palabras clave: Diabetes mellitus, Proteínas de reserva, DPPIV, Inhibición enzimática.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

La diabetes es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial y una de las principales causas de muerte en México. Uno de los principales mecanismos involucrados en esta enfermedad es la acción de la enzima Dipeptidil Peptidasa IV (DPP-IV) ya que tiene un papel fundamental en la regulación de la secreción de insulina. La dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) es una serina exopeptidasa con un peso de 110 kD considerada ubicua, esta enzima es una glicoproteína transmembranal de tipo II, que se encuentra expresada en la superficie de muchos tipos celulares y debido a tal versatilidad en la actualidad se desconocen la mayoría de sus funciones. La DPP-IV es una enzima susceptible a la inhibición por la presencia de algunos metales pesados como el plomo, zinc, cadmio y mercurio además de algunos inhibidores de las serin proteasas como el diisopropil fluorofosfato (Yoshimoto *et al.*, 1982; Shibuya-Saruta *et al.*, 1996). Entre los principales inhibidores sintéticos de la DPPIV por acción competente destacan diprotil A y B, las aminoacil pirrolidinas/tiazolidinas, derivados de ácido borónico, isoésteres de fluoolefinas de diacil hidroxilaminas, derivados de isoquinonas y ftalamidas; y de tipo enzimático destacan el diacil hidroxilamina y los ciclopéptidos, estos últimos presentando acción irreversible (Lambeir *et al.*, 2008). Los inhibidores de la DPP-IV han demostrado resultados promisorios, no obstante, la mayoría de estos fármacos suelen presentar efectos secundarios, por lo que resulta necesario el desarrollo de nuevas moléculas inhibitoras de esta enzima que minimicen dichos efectos. De tal forma que los péptidos de origen alimentario provenientes de fuentes vegetales como la nuez pueden ser utilizados como inhibidores naturales de la DPP-IV en la prevención y/o tratamiento de la diabetes mellitus. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los péptidos bioactivos de las globulinas 11S de nuez sometida a tratamiento térmico sobre la enzima DPP-IV.

MATERIALES Y MÉTODOS

La nuez (*Carya illinoensis*) fue proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) del Bajío. Las semillas fueron sometidas a tres tratamientos térmico: 70°C, 95°C y 120°C por 12 horas. Una vez terminado el tratamiento térmico, la nuez se molió y desengrasó por el método Soxhlet. Posteriormente la extracción y cuantificación de proteínas de reserva se realizó de acuerdo a lo reportado Mares et al., 2017.

El análisis *in silico* para predecir la posible actividad biológica de péptidos de globulinas 11S de nuez, se realizó tomando como referencia la secuencia de proteína asociada a las proteínas de reserva globulinas 11S de nuez reportada en la base de datos del NCBI; posteriormente la secuencia se analizó en la plataforma peptide Cutter (http://web.expasy.org/peptide_cutter/), *in silico* se digirió con las enzimas tripsina, quimiotripsina y pepsina para determinar cuál enzima liberaba la actividad biológica predominante.

La determinación de la actividad de la enzima DPP-IV se llevó a cabo de acuerdo al protocolo adquirido de Sigma-Aldrich (protocolo SSGPNA01). Se empleó el sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA y la enzima dipeptidil peptidasa IV humana (Sigma-Aldrich). Para este ensayo se utilizó diprotin A (Sigma-Aldrich) como control positivo de la inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteínas de Reserva en nuez

De acuerdo a los valores presentados en la tabla 6 se observa que las glutelinas son la fracción de proteínas de reserva que se encuentra en mayor abundancia en *C. illinoensis* (56.98%); la segunda fracción con un mayor porcentaje en la nuez son las globulinas 11S (31.89%), ambas fracciones presentan diferencias significativas entre sí y con el resto de las fracciones. Las fracciones con menor presencia en *C. illinoensis* son las prolaminas (2.20%) y las globulinas 7s (2.85%), no obstante, no existe diferencia significativa de concentración entre estas fracciones. Finalmente, las albúminas que son estadísticamente diferentes en concentración al resto de las fracciones representan el 6.06% de las proteínas de reserva presentes en la nuez (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación por el método de Bradford de proteínas de reserva de la fracción globulinas 11S de nuez no sometida a tratamiento térmico.

Fracciones proteicas	Proteína (mg/g Harina de Nuez)*	Porcentaje (%)
Albúminas	2.045±0.746 ^a	6.06
Globulinas 7s	0.962±0.014 ^b	2.85
Globulinas 11s	10.756±1.025 ^c	31.89
Prolaminas	0.742±0.027 ^b	2.20
Glutelinas Alcalinas	19.214±1.001 ^d	56.98

* Media ± D.E.

Diferente literal indican diferencia significativa (Tukey p>0,05)

Resistencia térmica de las globulinas 11S de nuez

El análisis *in silico* de globulinas 11S de nuez mostró que el mayor potencial de actividad biológica de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática es para inhibir la enzima DPP-IV, seguida de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Cuando la harina de nuez se sometió a los diferentes tratamientos térmicos y posteriormente se hizo la extracción de proteína se encontró que a 70 y 95°C no hay efecto ni en perfil de las globulinas 11S (Figura 2) ni en su concentración (9.7 y 9.05 mg/g de harina de nuez, respectivamente), a 120°C, aunque el perfil se mantiene (Figura 2, carril 7), la concentración se ve afectada (7.87 mg/g de harina de nuez).

Se encontró que la condición de tratamiento térmico de 95°C favoreció la hidrólisis enzimática de las globulinas 11S (Figura 2, carril 5), liberando péptidos menores de 15 kDa.

Predicción de la función biológica de los péptidos encriptados de globulinas 11S de nuez

Las secuencias de los péptidos encriptados generadas por la digestión *in silico* en la plataforma peptide cutter se ingresaron en la plataforma bioinformática BIOPEP para predecir su función biológica la mayoría de los péptidos encriptados tienen actividad inhibitoria de la enzima DPP-IV al ser digeridos con las tres enzimas: el 52.87% de los péptidos generados por la acción de la tripsina presentan esta actividad; algo similar sucede con los péptidos generados mediante la digestión con quimiotripsina, con un 52.17% de péptidos con actividad de inhibición de la DPP-IV; la pepsina es la enzima que genera un menor número de péptidos con esta actividad sin embargo es muy cercana (50.59%). La segunda actividad más importante es la antihipertensiva mediada por péptidos inhibidores de la ECA. Estos resultados que contrastan con lo reportado por Mares (2012), trabajo en el que se generó una predicción de péptidos bioactivos de las proteínas de reserva de la nuez, siendo la actividad antihipertensiva la principal actividad predicha para los péptidos de la Globulina 11S Legumina, en dicho trabajo no se realizó digestión *in silico*, con lo que se puede aseverar que la acción enzimática es una importante herramienta para la obtención de péptidos bioactivos con importantes actividades biológicas.

Actividad inhibitoria de la DPP-IV

Los ensayos de actividad inhibitoria de la DPP-IV indicaron que 150 µg/mL de hidrolizados de glutelinas 11S a 70°C con tripsina tienen una actividad del 49%, y que la actividad es similar a la obtenida con quimiotripsina a 95°C (47%).

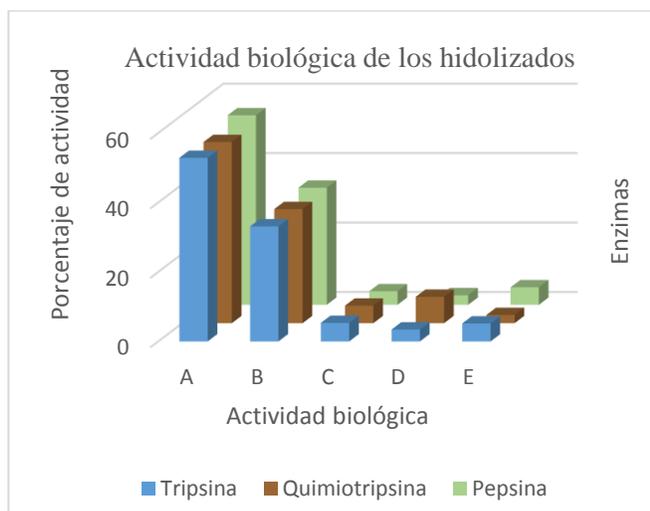


Figura 1. Predicción de péptidos de la Globulina 11S Legumina con actividad biológica. A) Inhibidores de la DPP-IV; B) Inhibidores de la ECA; C) Estimulante; D) Antioxidante; E) Otros.

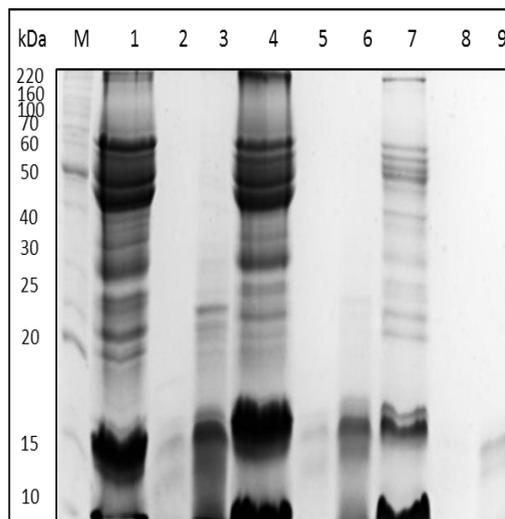


Figura 2. Patrón electroforético de globulinas 11S obtenidas a partir de nuez sometida a tratamiento térmico y digeridos de globulinas 11S. M) Marcador de peso molecular, 1) 70°C, 2) 70°C/tripsina, 3) 70°C/quimiotripsina, 4) 95°C, 5) 95°C/tripsina, 6) 95°C/quimiotripsina, 7) 120°C, 8) 120°C/tripsina, 9) 120°C/quimiotripsina.

CONCLUSIONES

El análisis de las proteínas de reserva de nuez indicó que las globulinas 11S representan el 31%, siendo la segunda fracción más abundante después de las glutelinas.

Las globulinas 11S de nuez resisten tratamiento térmico hasta 95°C.

Los peptidos obtenidos de las globulinas 11S de nuez sometidas a tratamiento térmico (70 y 90°C) y a hidrólisis enzimática con tripsina y quimiotripsina tiene actividad inhibidora de la enzima DPP-IV, por tanto se proponen como una alternativa coadyuvante para prevenir y tratar la diabetes mellitus tipo 2.

BIBLIOGRAFÍA

Lambeir, A.-M. D., Scharpé, S., & De Meeste, I. (2008). Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside: An Update on Structural Properties, Functions, and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 209-294.

Mares Mares E., Gutiérrez Vargas S., Pérez Moreno L., Ordoñez Acevedo L.G., Barboza corona J. E., León Galván M.F. (2017). Characterization and identification of cryptic biopeptides in *Carya illinoensis* (Wangenh K. Koch) storage proteins. *BioMed Research International: Microbiology* doi:10.1155/2017/1549156. 2017.

Yoshimoto, T., Kita, T., Ichinose, M., & Tsuru, D. (1982). Dipeptidyl aminopeptidase IV from porcine. *The Journal of Biochemistry*, 275-282.

Shibuya-Saruta, H., Kasahara, Y., & Hashimoto, Y. (1996). Human serum dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and its unique properties. *Journal of Clinical Laboratory analysis*, 435-440.