Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Evaluación del efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas de *Erythrina edulis* en cultivos de células SH-SY5Y

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Nathaly Karol RODRIGUEZ ARANA

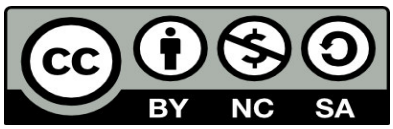
ASESORES

Karim Lizeth JIMÉNEZ ALIAGA

Blanca HERNÁNDEZ LEDESMA (Coasesor)

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodríguez N. Evaluación del efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas de *Erythrina edulis* en cultivos de células SH-SY5Y [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Nathaly Karol Rodriguez Arana
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47718382
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7790-7661
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	40957382
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8234-8358
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Blanca Hernández Ledesma.
Tipo de documento de identidad	Cedula de identidad
Número de documento de identidad	ES/ 01930819S
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7192-6044
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	17880045
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Gladys Angélica Moscoso Mujica
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	23982336

Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Acela Inés Arnao Salas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09142178
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40957382
Datos de investigación	
Línea de investigación	Moléculas con actividad biológica
Grupo de investigación	Biotecnología Microbiana y Salud - BIOMIAS
Agencia de financiamiento	Perú. Proyecto Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) – Banco Mundial. Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682 – PE. Contrato Nº 042- 2018-FONDECYT-BMIADT-AV. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (RR N°05753-R-21) proyecto A21040081
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Biología Molecular País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021-2022
URL de disciplinas OCDE	Biotecnología relacionada con la salud https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.04.01 Biotecnología agrícola, Biotecnología alimentaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.04.01 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

Siendo las **10:00 hrs. del 18 de julio de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes e integrado por los siguientes miembros: Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (Asesora), Dra. Gladys Angélica Moscoso Mujica y Mg. Acela Inés Arnao salas; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"Evaluación del efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas de Erythrina edulis en cultivos de células SH-SY5Y"**, presentado por la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Nathaly Karol Rodriguez Arana**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el jurado evaluador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

19 (Diecinueve), EXCELENTE

Luego, la presidenta del jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Nathaly Karol Rodriguez Arana,** el Grado Académico de Magister en **Biotecnología**.

Siendo la 11:30 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 11:40 hrs. del 18 de julio de 2022.

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes
Presidenta

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga
Miembro - Asesora

Dra. Gladys Angélica Moscoso Mujica
Miembro

Mg. Acela Inés Arnao salas
Miembro

Observaciones:

.....

.....

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

LA DIRECTORA DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00034-FFB-UPG-2022

Que, mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada: **"Evaluación del efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas de *Erythrina edulis* en cultivos de células SH-SY5Y"** presentado por **Nathaly Karol Rodríguez Arana,** con fecha de recepción 03/06/2022, con fecha de aplicación al programa de similitud el 08/06/2022 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **7%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 08 de junio de 2022

UNMSM
Firmado digitalmente por RAMOS CEVALLOS Norma Julia FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.06.2022 23:42:47 -05:00

DRA. NORMA JULIA RAMOS CEVALLOS
DIRECTORA

NJRC/ecj

DEDICATORIA

A mi madre Maritza, por acompañarme día a día, por sus sacrificios en todos estos años, por enseñarme que debo ser firme en mis metas, mis logros son suyos.

A mis hermanos Mariana y Christopher, que siempre los llevo conmigo y espero ser su modelo a seguir.

A mi familia, por su motivación constante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme y bendecir a cada miembro de mi familia y darnos la fortaleza necesaria en los momentos de debilidad.

A la Dra. Karim Jiménez Aliaga, por la confianza depositada en mí, por motivarme a seguir investigando y por su valioso conocimiento brindado.

A la Dra. Blanca Hernández Ledesma, por su valiosos consejos y colaboración en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Amparo Zavaleta Pesante, por incentivarme en el camino de la investigación y permitirme formar parte del grupo de investigación.

Al equipo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular, quienes compartieron sus conocimientos y experiencias.

A todos mis amigos y compañeros que me mostraron su entusiasmo, motivación, apoyo con sus buenos deseos y alegrías compartidas

A los docentes miembros del Jurado Examinador y Calificador, por sus valiosas sugerencias en la redacción final de la tesis.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular, en el grupo de Investigación Biotecnología Microbiana y Salud de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, fue financiado por el Proyecto CONCYTEC – BANCO MUNDIAL "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia (Contrato Nº042 – 2018- FONDECYT-BM-IADT-AV) y parcialmente por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado-UNMSM (RR N° 03556-R-19 proyecto A19040181).

INDICE

RESUMEN 11
ABSTRACT 12
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 13
OBJETIVOS 14
CAPITULO II. MARCO TEÓRICO 15
2.1. Antecedentes de la investigación 15
2.2. Aspectos teóricos 17
2.3. Síndrome metabólico 17
2.3.1 Estrés oxidativo en sistemas biológicos 20
2.3.2. Estrés oxidativo y su relación con el síndrome metabólico 23
2.4. Leguminosas como fuente de proteínas, péptidos bioactivos y aminoácidos 24
2.4.1. Péptidos bioactivos provenientes de leguminosas 26
2.4.2. Estrategias de obtención de péptidos bioactivos 26
2.4.3. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos 28
2.4.4. Multifuncionalidad de péptidos bioactivos derivados de leguminosas con potencial preventivo del síndrome metabólico 29
2.5. Evaluación del efecto protector de compuestos en líneas celulares 34
2.6. *Erythrina edulis* 36
2.6.1. Composición aminoacídica 37
2.6.2 Péptidos antioxidantes derivados de *Erythrina edulis* 39
CAPITULO III. METODOLOGIA 40
3.1. Tipo de investigación 40
3.2. Diseño metodológico 40
3.3. Determinación de la actividad biológica *in vitro* de los péptidos de pajuro sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas con el síndrome metabólico 40
3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante 40
A) Ensayo de la capacidad de absorción de radical oxígeno (ORAC) 40
B) Método de captación de radical ABTS 41
3.3.2. Evaluación de la Actividad antidiabética 41
A) Inhibición Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV) 41
B) Inhibición α-glucosidasa 41
C) Inhibición enzimática de α-amilasa 42
3.4.4. Evaluación de la actividad hipolipemiante 42
Inhibición de lipasa pancreática 42
3.3.5. Evaluación de la actividad antihipertensiva 43

Actividad inhibitoria ECA 43
3.4. Evaluación del comportamiento de los péptidos de pajuro durante el proceso de digestión gastrointestinal *in sílico*. 43
A) Simulación de la digestión gastrointestinal *in sílico* 43
B) Determinación de la bioactividad de los productos de la digestión gastrointestinal de los péptidos de pajuro *in sílico* 44
C) Evaluación de la toxicidad de los péptidos *in sílico* 45
3.5. Evaluación del efecto de los péptidos de pajuro frente al estrés oxidativo en cultivo de células SH-SY5Y 45
Evaluación del efecto de los péptidos multifuncionales sobre la viabilidad celular 45
3.6. Generación de un modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ en la línea celular SH-SY5Y 46
3.7. Determinación del efecto protector de los péptidos de pajuro frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ 47
A) Efecto de los péptidos sobre la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) 47
B) Efecto de los péptidos de pajuro sobre la peroxidación lipídica mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 48
3.8. Análisis estadístico 48
CAPITULO IV. RESULTADOS 49
CAPITULO V. DISCUSIÓN 62
CAPITULO VI. CONCLUSIONES 68
CAPITULO VII. RECOMENDACIONES 69
CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 70
CAPITULO VIII. ANEXOS 81

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH: Radical generador de radical peróxido (2,2`-azobis (2-amidinopropano) dihydrochloridrato).

ABTS: Radical estable de color azul-violeta (Acido 2,2′-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).

DCF: Diclorofluoresceína fluorescente

DFCH: Diclorofluoresceína desacetilada.

DCFH-DA: Diacetato de Diclorofluoresceína

DM2: Diabetes mellitus tipo 2.

DPPIV: Dipeptidil peptidasa-4**.**

ECA: Enzima convertidora de angiotensina.

EO: Estrés oxidativo.

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno**.**

HTA: Hipertensión arterial

IC_{50}: Concentración mínima inhibitoria 50%.

LDH: Lactato deshidrogenasa

MDA: Malondialdehído

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

ORAC: Capacidad de absorción de radical oxígeno.

RL: Radical libre

SM: Síndrome metabólico

TBA: Acido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TEAC: Capacidad antioxidante equivalente al Trólox.

NOMECLATURA DE AMINOACIDOS

En esta investigacion se ha utilizado la nomeclatura de simbolos de aminoacidos descrito por la Comision de Nomeclatura de Bioquimica (JCBN) de la IUPAC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry).

Aminoácidos	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Cisteína	Cys	C
Asparagina	Asn	N
Glutamina	Gln	Q
Tirosina	Tyr	Y
Glicina	Gly	G
Alanina	Ala	A
Valina	Val	V
Leucina	Leu	L
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Fenilalanina	Phe	F
Triptófano	Trp	W
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Lisina	Lys	K
Arginina	Arg	R
Histidina	His	H

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para el SM 18
Tabla 2. Clasificación y abreviatura de los radicales libres 20
Tabla 3. Clasificación de proteasas comerciales en el ámbito alimentario 27
Tabla 4. Péptidos aislados de leguminosas con potencial terapéutico sobre el SM 33
Tabla 5. Tipos de cultivos celulares 34
Tabla 6.Composicion aminoacídica de la harina y concentrado proteico de semillas de *Erythrina edulis*. 38
Tabla 7. Composición de péptidos de pajuro obtenidos mediante secuenciamiento de novo 39
Tabla 8. Características de los péptidos sintéticos derivados de *Erythrina edulis* 49
Tabla 9. Evaluación de la multifuncionalidad de péptidos sintéticos derivados de semillas de *Erythrina edulis* 51
Tabla 10. Análisis del comportamiento de los péptidos bioactivos derivados de semillas de *Erythrina edulis* durante el proceso de digestión gastrointestinal *in sílico* 53
Tabla 11. Predicción de la toxicidad de los péptidos derivados de semillas de E*rythrin*a e*dulis in sílic*o 54
Tabla 12. Efecto de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* sobre la viabilidad de células SH-SY5Y 55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de alteración del tejido adiposo blanco durante el desarrollo del SM.……...19

Figura 2. Toxicidad del hierro en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. 21

Figura 3. Toxicidad del cobre en presencia de radicales libres. 22

Figura 4. Propiedades de las legumbres en la prevención del SM. 25

Figura 5. Digestión de proteínas y absorción gastrointestinal. 28

Figura 6. Rol fisiológico de la enzima DPPIV. 30

Figura 7. Métodos de evaluación de antioxidantes en cultivos celulares 36

Figura 8. *Erythrina edulis* (Pajuro)..... 37

Figura 9. Representación esquemática del complejo enzima-sustrato de los sitios de unión de una proteasa 44

Figura 10. Generación de radicales libres inducido por diferentes concentraciones de $FeSO_4$ en células SH-SY5Y. 56

Figura 11. Captación de radicales libres de péptidos derivados de *Erythrina edulis* a diferentes tiempos de exposición frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200µM] en células SH-SY5Y. 58

Figura 12. Captación de radicales libres de péptidos derivados de *Erythrina edulis* a diferentes concentraciones frente al estrés oxidativo inducido con FeSO4 [200µM] en células SH-SY5Y. 59

Figura 13. Efecto de los péptidos derivados de *Erythrina edulis* sobre la actividad lactato deshidrogenasa frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200µM] en células SH-SY5Y. 60

Figura 14. Efecto de péptidos derivados de *Erythrina edulis* sobre los niveles de TBARS durante el estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200µM] en células SH-SY5Y 61

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un problema de salud pública a nivel mundial, que podría repercutir en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) como la hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo (EO) se incrementa durante el curso fisiopatológico de estas enfermedades, por tanto, compuestos multifuncionales antioxidantes que además interaccionen con otras dianas farmacológicas implicadas con el SM, serían una alternativa interesante para el abordaje integral. Con el objetivo de evaluar el efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas *Erythrina edulis* (pajuro) en cultivos de células SH-SY5Y con potencial terapéutico sobre el SM; se evaluó la actividad de los péptidos de pajuro sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas con la DM2, HTA y obesidad. A partir de 14 péptidos, derivados de semillas de *Erythrina edulis*, se han seleccionado 6 (YSPY, SQLPGW, MFTGPY, DGLGYY, CCGDYY y AALWE) por su potencial multifuncionalidad sobre el SM. Dichos péptidos, tras la digestión gastrointestinal simulada *in sílico*, liberaron secuencias aminoacídicas que mantenían su potencial actividad. En relación con la toxicidad no presentaron efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y a las concentraciones de 25, 50 y 100 µM durante 24 h de tratamiento. Además, a la concentración de 100 µM, en la misma línea celular, demostraron su capacidad de atravesar la membrana celular y proteger frente al EO inducido por $FeSO_4$ a 200 µM, en más del 60%. También fueron capaces de revertir el incremento de la actividad lactato deshidrogenasa y los niveles de lipoperoxidación lipídica generada por el tóxico. Con base a los resultados obtenidos se concluye que los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* YPSY, SQLPGW y MFTGPY, presentan buen perfil multifuncional, potencial biodisponibilidad y capacidad de protección frente al EO inducido por $FeSO_4$, por tanto, podrían servir como ingredientes de alimentos funcionales destinados a la prevención del SM.

Palabras clave: *Erythrina edulis*, péptidos antioxidantes, péptidos multifuncionales, síndrome metabólico, células SH- 5YSY.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a worldwide public health problem that could have an impact on the development of cardiovascular diseases (CVD) such as hypertension (HT), type 2 diabetes mellitus (T2DM) and neurodegenerative diseases. Oxidative stress (OS) increases during the pathophysiological course of these diseases; therefore, multifunctional antioxidant compounds that also interact with other pharmacological targets involved in MS would be an interesting alternative for a comprehensive approach. In order to evaluate the protective effect of antioxidant peptides derived from *Erythrina edulis* (Pajuro) seeds in SH-SY5Y cell cultures with therapeutic potential on MS, the activity of Pajuro peptides on different pharmacological targets related to DM2, HT and obesity was evaluated. From 14 peptides, derived from Erythrina edulis seeds, 6 (YSPY, SQLPGW, MFTGPY, DGLGYYY, CCGDYYY and AALWE) were selected for their potential multifunctionality on MS. These peptides, after simulated *in sílico* gastrointestinal digestion, released amino acid sequences that maintained their potential activity and had no effect on the viability of SH-SY5Y cells at concentrations of 25, 50 and 100 µM during 24 h of treatment. Furthermore, at the 100 µM concentration, in the same cell line, they demonstrated their ability to cross the cell membrane and protect against OS induced by FeSO4 at 200 µM by more than 60%. They were also able to reverse the increase in lactate dehydrogenase activity and the levels of lipid lipoperoxidation generated by the toxicant. Based on the results obtained, it is concluded that the peptides derived from *Erythrina edulis* YPSY, SQLPGW and MFTGPY, present a good multifunctional profile, potential bioavailability and protective capacity against OS induced by FeSO4, therefore, they could serve as ingredients of functional foods for the prevention of MS.

Key words: *Erythrina edulis*, antioxidant peptides, multifunctional peptides, metabolic syndrome, SH- 5YSY cells.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El abuso de alimentos hipercalóricos, combinado con un estilo de vida sedentario son los responsables del incremento del síndrome metabólico (SM), que afecta alrededor del 25% de la población a nivel mundial. A corto plazo los pronósticos son catastróficos, suponiendo graves problemas de salud pública, por los elevados costes asociados a este desorden[1].

El SM bajo los conceptos de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), se asocia a un riesgo de 1.5 a 3 veces más de padecer ECV principalmente hipertensión arterial, también incrementa en 5 veces el riesgo de desarrollar DM2. Se destaca implicancia del EO durante el proceso fisiopatológico del SM que se produce por el desbalance de los mecanismos antioxidantes y las moléculas prooxidantes, que genera daño a moléculas biológicas a través de catalizadores, como el hierro, que favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN)[2,3]. Por tanto, para el abordaje integral del SM se hace necesaria la búsqueda de compuestos antioxidantes multifuncionales que ejerzan su mecanismo de acción en las diferentes dianas terapéuticas relacionadas con la HTA, la DM2, obesidad e hiperlipidemia.

En los últimos años, se han identificado péptidos bioactivos provenientes de proteínas vegetales, principalmente a partir de semillas de leguminosas, con potencial multifuncional por describir múltiples actividades biológicas como antioxidante, antihipertensiva, antidiabética, entre otras[4–8]; que podrían servir como ingredientes de alimentos funcionales para prevenir el SM.

El Perú posee una biodiversidad de especies de leguminosas, entre ellas *Erythrina edulis* "pajuro", cuyas semillas presentan buen perfil nutricional, por el alto contenido proteico, fibra y bajo contenido de grasas. Desde el 2013, nuestro grupo de investigación está enfocado en la búsqueda y caracterización de péptidos bioactivos a partir de las proteínas solubles de semillas de pajuro. Inicialmente, dicha proteína fue aislada, concentrada e hidrolizada con diferentes proteasas, obteniendo fracciones peptídicas con buena actividad antioxidante desarrollada mediante métodos *In vitro*[9]. A partir de esta fracción se han identificado 14 péptidos con buen perfil antioxidante con potencial multifuncionalidad[10]. En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de los péptidos bioactivos antioxidantes derivados de *Erythrina edulis* sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas al SM, los péptidos más activos fueron

sometidos al proceso de digestión gástrica e intestinal, además se corroboró el efecto protector de los péptidos más activos en un modelo celular de estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$. Los péptidos con buen perfil antioxidante que resistieron la digestión gastrointestinal y ejercieron su actividad biológica en el modelo de estrés oxidativo, podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos funcionales y/o nutraceúticos con potencial terapéutico sobre el SM.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto protector de péptidos antioxidantes derivados de semillas *Erythrina edulis* en cultivos de células SH-SY5Y.

Objetivos específicos

1. Determinar la multifuncionalidad de 14 péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas con el síndrome metabólico.
2. Determinar el comportamiento de los péptidos multifuncionales más activos, durante el proceso de digestión gastrointestinal *In sílico* simulando condiciones fisiológicas.
3. Evaluar el efecto de los péptidos multifuncionales elegidos sobre la viabilidad de células SH-SY5Y.
4. Caracterizar el efecto protector de los péptidos multifuncionales más activos, en un modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ en la línea celular SH-SY5Y.

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

En los últimos años, se han descrito y caracterizado péptidos bioactivos derivados de proteínas vegetales, especialmente a partir de semillas de leguminosas, reportándose diferentes actividades biológicas como, antioxidante, antihipertensiva, antidiabética, hipocolesterolémico, hipoglucemiante, entre otras. A continuación, se describen trabajos relacionados con la potencial multifuncionalidad de estos péptidos.

Xue y col., identificaron diferentes péptidos bioactivos, a partir de la fracción albúmina de semillas de garbanzo, destacando la secuencia RQSHFANAQP por la actividad antioxidante, determinada mediante el ensayo de captación del radical ABTS y DCFH-DA (IC_{50} = 2.31 µmol/ml) y antiproliferativa en células de cáncer de mama MDA-MB-231[11].

A partir de semillas de guisantes (*Pisum sativum* L.), tras la hidrólisis enzimática de las proteínas solubles con termolisina y alcalasa; se caracterizaron el péptido IR con actividad antioxidante e inhibidora de ECA y los péptidos KF y EF, con actividad inhibitoria de ECA, respectivamente[12].

Los estudios en frijol común permitieron la identificación de péptidos como KTYGL, KKSSG, CPGNK y GGGLHK, todos los péptidos presentaron actividad antioxidante en el rango de 115,83 y 249,39 mmol de Equivalentes de Trólox (ET)/g, mientras que el mejor perfil antidiabético fue observado con el péptido KTYGL con un valor IC_{50} de 0,03 mg/ml de inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), enzima responsable de degradar las incretinas, hormonas intestinales secretadas tras la ingesta de comida que actúan estimulando la secreción de insulina[13].

Oseguera-Toledo y col., determinaron actividades biológicas relacionadas a DM2 y EO en hidrolizados proteicos de frijol *Phaseolus vulgaris* L. en las fracciones peptídicas <1 kDa, identificaron los péptidos LLSL, QQEG y NEGEAH con propiedades antidiabéticas y antioxidantes [14]. En otro estudio realizado en la misma especie de leguminosa, se identificaron secuencias peptídicas como: INEGSLLLPH, FVVAEQAGNEEGFE, SGGGGGGVAGAATASR, GSGGGGGGGFGGPRR, INEGSLLLPH, GGYQGGGYGGNSGGGYGNRG, GGSGGGGGSSSGRRP y GDTVTVEFDTFLSR con propiedades multifuncionales, con actividad inhibitoria de la lipasa pancreática y de α-amilasa con valores de IC_{50} en el rango de 0,11 a 15,24 mg/mL y de 0,15 a 2,12 mg/mL; respectivamente[15] .

A partir de semillas de soya, se aisló la lunasina un péptido de 43 aminoácidos que tiene propiedades quimiopreventivas, antiinflamatorias y podría ayudar a la regulación de la biosíntesis del colesterol. Estudios de biodisponibilidad en animales y humanos han demostrado que un porcentaje del péptido ingerido permanece intacto durante su paso por el tránsito gastrointestinal, alcanzando los órganos diana en una forma intacta y activa[16]. Asimismo, Fernández y col., reportaron que el péptido de soya RKQLQGVN, tras la digestión gastrointestinal simulada en condiciones fisiológicas, ejerció propiedades biológicas y presentó actividad protectora anticancerígena en la línea celular HT-29[17].

En Perú, Solano y col., extrajeron las fracciones proteicas de albúmina, globulina, glutelina y prolamina, en cada caso obtuvieron el hidrolizado mediante digestión enzimática con pepsina, pancreatina y alcalasa. Los hidrolizados de albúminas y globulinas presentaron buen perfil antioxidante, mediante el método ORAC, con valores de 4.96 ± 0.04 y 5.18 ± 0.02 µmol ET/mg de proteína, respectivamente. Asimismo, los hidrolizados presentaron actividad quelante de metales para Cu^{+2} mayor del 50% y para Fe^{+2} mayor del 70% a una concentración de 360 µg/mL y 180 µg/mL, respectivamente[18] .

Intiquilla y col., obtuvieron hidrolizados proteicos de semillas de *Erythrina edulis* con las enzimas neutrasa, flavourzima y alcalasa a diferentes tiempos. Los autores reportaron mayor actividad antioxidante en el hidrolizado con alcalasa, tras el fraccionamiento de dicho hidrolizado, concluyeron que la fracción peptídica <3kDa presentó mejor perfil antioxidante con valores de hasta 6.31 µmol ET/mg de proteína mediante el ensayo de ORAC[9]. Asimismo, en el 2019, los mismos autores, a partir de la fracción peptídica <3kDa caracterizaron 30 péptidos, 14 de ellos presentaron buen perfil antioxidante con valores de hasta 3.83 ± 0.19 µmol ET/µmol péptido[10].

En base a los antecedentes presentados, se resalta el interés por la búsqueda de nuevas fuentes proteicas origen vegetal, principalmente de semillas de leguminosas, por su alto contenido de proteínas de alta calidad que permiten la obtención de péptidos multifuncionales. El pajuro es una leguminosa de alta calidad proteica y por el buen perfil antioxidante, los péptidos identificados, podría ser útil en la prevención de enfermedades relacionadas con el SM.

2.2. Aspectos teóricos

2.3. Síndrome metabólico

Es una enfermedad multifactorial, donde se asocian diferentes desórdenes metabólicos, como la obesidad abdominal, hiperglucemia, insulinorresistencia, tensión arterial ligeramente elevada y dislipidemias[19]. En la Tabla 1, se presenta todos los criterios de diagnóstico, desde los propuestos por la OMS en 1998 y las modificaciones por el grupo europeo, el panel de tratamiento de adultos del programa nacional de educación sobre el colesterol III (ATP III) y la Federación internacional de diabetes (IDF), ésta última define el SM como un conjunto de factores de riesgo que incluyen: medida de cintura > 94 cm (varones) o > 80 cm (mujeres) combinado con uno o más de los siguientes factores, resistencia a la insulina (glucosa en ayunas >100 mg/dL), triglicéridos (>150 mg/dL), colesterol HDL <40 mg/dL (varones) o <50 mg/dL (mujeres), bajo nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL), e hipertensión arterial (HTA) (>130/85 mmHg)[20].

Actualmente el 25% de la población mundial padece SM; sin embargo, en el Perú, existen pocos estudios de su prevalencia de SM. En el 2007, indicaron que el 20,7% de la población de Lima metropolitana padecía esta enfermedad[21]. Dentro de los criterios de evaluación para el SM, se ha establecido la importancia de la grasa abdominal en la génesis del SM con un perímetro de cintura mayor a determinados umbrales[1]. Por tanto, para el abordaje integral del SM se hace necesaria la búsqueda de compuestos multifuncionales que ejerzan su mecanismo de acción en las diferentes dianas terapéuticas relacionadas con la HTA, la DM2, obesidad e hiperlipidemia.

Las dietas hipercalóricas y el sedentarismo, promueven el desarrollo del SM, que genera cambios metabólicos a nivel del tejido adiposo blanco de tipo visceral[22,23], en estas condiciones se favorece la resistencia a la insulina y la inflamación[24,25], por activación de vías de señalización que desencadenan la adipogénesis, el desarrollo de nuevos adipocitos (hiperplasia) y el incremento de volumen de los adipocitos existentes (hipertrofia)[24,26]. Además, se favorece la angiogénesis y adipogénesis (diferenciación a partir de células madre) para facilitar el correcto funcionamiento y vascularización de los nuevos adipocitos[23,26].

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para el SM

Parámetros clínicos	OMS (1998)	EGIR (1999)	NCEP- ATP III (2001)	IDF (2006)
Obesidad abdominal	Relación cintura-cadera: Hombres: IC-C > 0.9 Mujeres IC-C > 0.85 IMC> 30 kg/m^2	Hombres: CC: ≥ 94 cm Mujeres: CC ≥ 80 cm	Hombres: CC: ≥ 102 cm Mujeres: CC ≥ 88 cm	CC: étnico/racial específico.
Resistencia a la insulina	ITG, GAA, DM2 o sensibilidad a la insulina[a].	Insulina en el plasma > 75%	-	-.
Glucosa	ITG, GAA, DM2	Glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dl	Glucosa en ayunas ≥ 110 mg/dl	Glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dl o en tratamiento para DM
Presión Arterial	PA ≥ 140/90 mmHg	PA ≥ 140/90 mmHg o hipertensión en tratamiento	PA ≥ 130/85 mmHg	PA ≥ 130/85 mmHg o hipertensión en tratamiento
Dislipidemia	Triglicéridos ≥ 150 mg/dl	Triglicéridos ≥ 178 mg/dl	Triglicéridos ≥ 150 mg/dl o en tratamiento	Triglicéridos ≥ 150 mg/dl
	Hombres: HDL-C: <35 mg/dl Mujeres: HDL-C <39 mg/dl	HDL-C: <39 mg/dl	Hombres: HDL-C: <40 mg/dl Mujeres: HDLC-C: <50mg/dl	Hombres: HDL-C: <40 mg/dl Mujeres: HDL-C: <50 mg/dl

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina; NCEP/ATP III: Panel Nacional de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación sobre el Colesterol; IDF: Federación Internacional de Diabetes; ALAD:), Asociación Latinoamericana de Diabetes; IMC: Índice de masa corporal; ITG: Intolerancias a la glucosa alterada; GAA: glucosa en ayunas alterada; CC: circunferencia de la cintura; IC/C: relación de cintura/cadera; PA: presión arterial; DM2: diabetes mellitus tipo 2; HDL-C: lipoproteínas de alta densidad. Adaptado de Bautista 2018[25].

Además, se ha descrito que en la hipertrofia del tejido adiposo se produce hipoxia, estrés oxidativo, inflamación, que si se mantienen por períodos prolongados desencadenan procesos apoptóticos[23,26–28]. También, la superabundancia de grasa visceral se asocia a la insulinorresistencia, causada por el incremento de receptores de glucocorticoides y secreción de citoquininas proinflamatorias que reducen la estimulación de la adipocitoquininas (encargado de la regulación del metabolismo de lípidos, carbohidratos, sensibilidad a la insulina y la homeóstasis energética), que al alterarse induce a la expresión de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y la interleuquina 6 (IL-6), ocasionando inflamación sistémica y resistencia a la insulina[24,25].

Al generarse apoptosis, hay un aumento de estrés oxidativo que estimulan las vías inflamatorias, aumentando la producción de macrófagos, que generan insulinorresistencia, como consecuencia favorecen el desarrollo de DM2[23]. Asimismo, el tejido adiposo secreta angiotensinógeno, que ocasiona el incremento de la presión arterial, lipólisis desmesurada con liberación de ácidos grasos a la circulación sanguínea, generando lipotoxicidad[26,28–32]. En la Figura 1, se observa las alteraciones metabólicas producidas durante el desarrollo del SM.

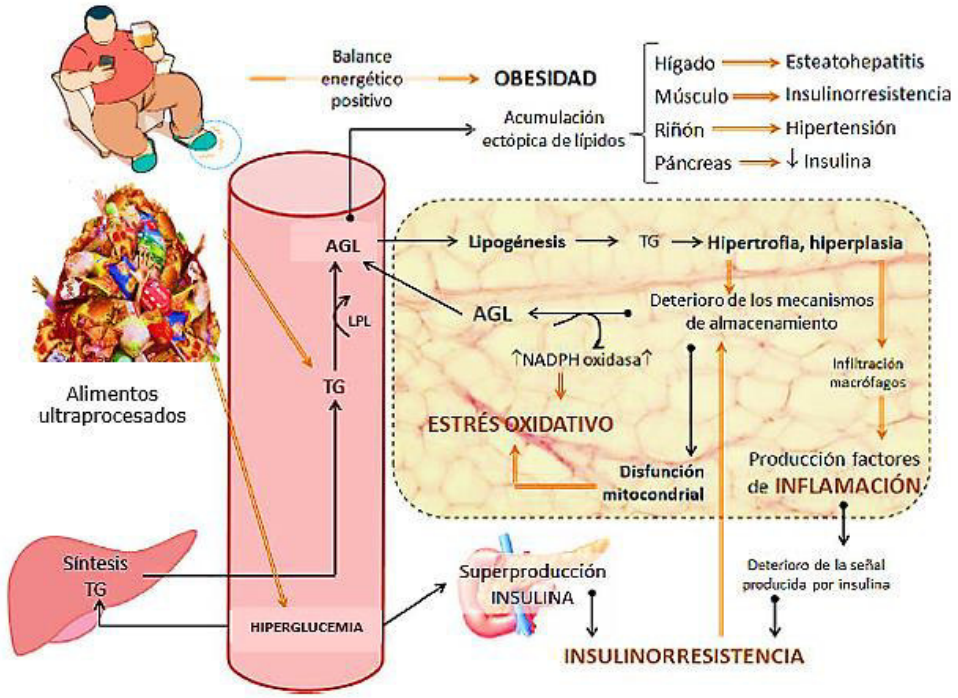


Figura 1. Mecanismos de alteración del tejido adiposo blanco durante el desarrollo del SM. AGL: Ácidos grasos libres; LPL: lipoproteínas; NAPDH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; TG: triglicéridos. Adaptado de Moreno 2018[20].

2.3.1 Estrés oxidativo en sistemas biológicos

Los procesos oxidativos son parte esencial de las reacciones metabólicas del organismo para la producción de energía en la célula, pero cuando se presenta un desbalance de las moléculas prooxidantes y pérdida de la capacidad antioxidante para neutralizar los productos intermediarios, se desencadena citotoxicidad[23,33]. Durante los procesos metabólicos se liberan sustancias altamente reactivas a partir del oxígeno y nitrógeno denominadas EROs y ERN, respectivamente.

En las EROs, encontramos radicales peroxilo, hidroxilos, oxígeno singulete y anión superóxido, en el caso de las ERN son derivadas del óxido nítrico, anión peroxinitrito (Tabla 2)[23,34]. Las EROs presentan características químicas como, reactividad, especificidad, selectividad y difusividad, que, según el compuesto formado con otras moléculas, tiene mayor o menor toxicidad para iniciar procesos de EO[35]. El radical OH* tras la captación de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos insaturados, generan radicales peroxilo y a partir de ello, alcoxilos[36,37]. Existen otros radicales como el óxido nítrico, que se establece a partir de la arginina y actúa como relajante muscular ocasionando disminución en la tensión arterial. Sin embargo, este radical en exceso es tóxico y reacciona con biomoléculas que puede combinarse con superóxidos para formar aniones peroxinitrito, induciendo a la oxidación lipídica y nitrando residuos de tirosina[36,37].

Tabla 2. Clasificación y abreviatura de los radicales libres

Clasificación	Radical libre	Abreviatura
Especies reactivas de oxigeno	Ion superóxido	O_2^{*-}
	Radical hidroxilo	OH*
	Peróxido de hidrogeno	H_2O_2
	Radicales alcoxi y peroxi	ROO* y RO*
Especies reactivas de nitrógeno	Óxido nítrico	NO*
	Dióxido nítrico	NO_2*
	Oxígeno singulete	O_2^1

Tomado de García 2019[36]

En sistemas biológicos, el radical superóxido es el principal precursor de EROs, considerado también como radical primario, que al interactuar con otras moléculas genera otros radicales secundarios[36,38]. Entre ellos, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es el más importante y en exceso causa toxicidad en células y tejidos. Esta molécula se forma tras la eliminación de superóxido en la cadena transportadora de electrones, mediante la enzima superóxido dismutasa. El H_2O_2 producido se propaga rápidamente a través de la membrana plasmática[37,39], participando en reacciones como Haber-Weiss para la generación de radicales hidroxilos[36,37]. La formación del radical hidroxilo puede ser catalizada por metales en transición como $Fe^{+2/+3}$ y $Cu^{+/+2}$, en concentraciones altas y en su forma reducida, son más reactivas que en su forma oxidada[40,41]. Los iones Fe^{+2} y Cu^{+1}, generan ruptura del H_2O_2, cuyo producto final es el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton (Figura 2) [41–43]. En procesos de EO con H_2O_2 o $FeSO_4$ en línea celulares, se comprobó el aumento de peroxidación en células reproductoras de equino, con un incremento considerable de EROs[39,41,44].

$$Fe^{+3} + O_2\bullet- \text{ « } Fe^{+2} + O_2$$

$$Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \bullet OH + OH^- \quad \text{[Reacción de Fenton]}$$

Reacción resultante es Haber – Weiss:

$$O_2\bullet- + H_2O_2 \leftrightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

Finalmente se obtuvo las siguientes reacciones:

$$\bullet OH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + H+ + O_2^{\bullet-}$$

$$\bullet OH + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + OH^-$$

$$LOOH + Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3} + LO^- + {}^{\bullet}OH$$

Figura 2. Toxicidad del hierro en las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. Tomado de Ramírez 2013[40].

Con respecto al cobre, al estar en concentraciones altas, reduce en gran medida la cantidad de antioxidantes endógenos como el glutatión reducido. Asimismo, el ion cúprico (Cu^{+2}) en existencia del superóxido se reduce a ion cuproso (Cu^{+1}), siendo perjudicial ya que estimula el desarrollo de hidroxilos, similar a la reacción de Fenton[45].

$$Cu^{+2} + O_2^{\bullet -} \rightarrow Cu^{+1} + O_2$$

$$Cu^{+1} + H_2O_2 \rightarrow Cu^{+2} + OH^{\bullet} + OH^{-}$$

Figura 3. Toxicidad del cobre en presencia de radicales libres.
Tomado de García 2019[36].

En base a lo descrito, los radicales libres son especies químicas que poseen electrones desapareados en el último orbital, por la inestabilidad que presentan en su configuración espacial intentan recuperar su electrón a través de otros átomos[38], por ello interaccionan con biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, desencadenando diferentes cascadas de citotoxicidad y/o apoptosis. El organismo posee diferentes mecanismos de defensa antioxidante para neutralizar dichos radicales libres y mantener la homeostasis entre oxidantes y antioxidantes. Cuando predominan los primeros se pierde el equilibrio y se produce EO, lo cual está asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como el SM, DM2, HTA, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, entre otras[36–38].

Biomarcadores de estrés oxidativo

Para evaluar el daño generado por la EROs, se mide los subproductos, que se generan durante el proceso oxidativo, que se conocen como biomarcadores de EO[37,39,46], a continuación, mencionaremos a los principales.

Oxidación de proteínas: Las proteínas interaccionan con los radicales libres mediante reacciones oxidación de aminoácidos dando como resultado derivados carbonilos como aldehídos y cetonas que puede favorecer la formación de entrecruzamiento de proteínas[36–38]., como consecuencia, las proteínas alteran su configuración especial, estructura, carga, entre otras, generando modificaciones que conllevan a la pérdida de función biológica [36].

Oxidación del ADN: El daño es debido al radical hidroxilo que ataca a las purinas y pirimidinas generando una serie de productos de oxidación. La acumulación de estos radicales ocasiona intercambio de cromátides hermanas, entrecruzamiento de proteína-ADN, oxidación (apertura y liberación) de bases nitrogenadas y ruptura de cadenas[36,46].

Oxidación a carbohidratos: Las alteraciones están dadas cuando se producen la oxidación de proteínas que tienen modificaciones postraduccionales como la glicosilación la oxidación de estos carbohidratos también genera pérdida de función de la proteína afectada[46].

Oxidación a lípidos: La oxidación de lípidos de la bicapa fosfolipídica de las membranas celulares altera su permeabilidad, fluidez e integridad, los ácidos grasos insaturados son susceptibles al ataque de radicales hidroxilos e hidroperóxidos causando procesos de lipoperoxidación autocatalítica[36,37,41]. Este proceso puede ocasionar la transformación de lípidos en hidrocarbonos volátiles, alcoholes o aldehídos que podrían difundirse hacia otras macromoléculas ocasionando otros procesos oxidativos graves[36].

Estrés oxidativo causado por agentes exógenos

La producción de EROs se desencadena por la exposición a determinados agentes exógenos como, el ozono[36,47], el humo del cigarro[48], radiación ionizante, entre otros[49]. Por otra parte, se ha descrito que los alimentos ultraprocesados (alimentos cocidos ricos en grasa y carbohidratos) contienen agentes oxidantes, mutágenos y cancerígenos que favorecen el EO[36][50], el consumo de este tipo de alimentos acompañados de un estilo de vida sedentario, incrementaría el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles como el SM.

2.3.2. Estrés oxidativo y su relación con el síndrome metabólico

El estilo de vida sedentario y el sobrepeso están estrechamente relacionados con el EO, y se da principalmente a nivel del tejido adiposo[51], se caracteriza por el incremento de NADPH oxidasa, el almacenamiento exagerado de glucosa y la disminución de la actividad en enzimas antioxidantes endógenas[25,51]. El NADPH generado favorece el incremento selectivo de tejido adiposo blanco (TAB), donde secretan moléculas bioactiva como las adipocinas que tienen un papel primordial en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen: la ingesta de alimentos, la

regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa, factor de necrosis tumoral alfa (TNF–a), interleucina 6 (IL–6), resistina, leptina y adiponectina; también participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación como el angiotensinógeno y el inhibidor del activador de plasminógeno que están asociadas al desarrollo de comorbilidades, obesidad y factores de riesgo del SM[23,51].

El EO y el estado de inflamación subclínico generado por el incremento de citoquininas proinflamatorias y la liberación de ácidos grasos no esterificados favorecen el desarrollo de las alteraciones metabólicas que se dan en el SM. Por otro lado, la acumulación de triglicéridos y la contribución constante de energía a los adipocitos estimula la termogénesis como alternativa para direccionar el desborde energético que recibe la célula[23,27,52]; favoreciendo la producción de EROs y la disfunción mitocondrial[23,52–54]. En algunos casos, se ha reportado la inhibición de la adipogénesis durante la hipertrofia proceso que genera hipoxia; favoreciendo la liberación de EROs al torrente sanguíneo diseminando el efecto citotóxico a otros tejidos y órganos[23,34,53].

La acumulación de EROs interfiere las cascadas de señalización produce la insulina a nivel las MAP cinasas (regula la síntesis de proteínas para la mediación de los efectos de la insulina), y la PI3K, (principal mecanismo por la cual la insulina ejerce sus funciones), interfiriendo con la captación de glucosa [23]. *Li y col* [55]. describen que el EO promueve la fosforilación de residuos de serina y treonina de algunos intermediarios, inhibiendo la asociación de proteínas dentro de la vía MAP cinasa, lo que provoca un incremento de las citoquinas proinflamatorias, produciendo resistencia a la insulina[55]. Por tanto, las células β-pancreáticas liberan mayor cantidad de insulina, lo que desencadena hiperinsulinemia que, acompañado al consumo desmedido de azúcares, ocasiona deterioro irreversible de las células β-pancreáticas y como consecuencia hiperglucemia, uno de los signos del SM, y a largo plazo de la DM2[23]. En base a lo descrito, se buscan compuestos bioactivos multifuncionales que ayuden a prevenir o tratar el SM. En los últimos años se han caracterizados péptidos bioactivos provenientes de leguminosas con potencial terapéutico en el SM.

2.4. Leguminosas como fuente de proteínas, péptidos bioactivos y aminoácidos

Las legumbres poseen alta fuente de proteínas y son accesibles a la población por su bajo coste a comparación de las proteínas animales que generan mayor impacto ambiental, por su consumo excesivo generando problemas de salud[56]. A pesar de su

calidad nutricional, las leguminosas contienen anti nutrientes que podrían afectar el metabolismo, siendo estas las lecitinas, alcaloides, taninos, fitatos, entre otros, que normalmente son eliminados tras procesos de remojo o tratamiento térmicos. Otra de las particularidades de la leguminosa es su baja digestibilidad, debido a su contenido de carbohidratos complejos, para ello, la obtención de concentrados proteicos (CP), y/o fracciones proteicas evita esta particularidad. Por lo general, los CP se obtienen a partir de la harina desengrasada de las semillas, las proteínas se solubilizan en soluciones alcalinas y se precipitan llevando al punto isoeléctrico de las proteínas de interés. Permitiendo mejorar la aceptabilidad, valor nutricional y las propiedades funcionales. Además, el rendimiento del concentrado proteico va a depender de los procesos de extracción, factores como: pH, temperatura, tiempo de extracción, efectos de las soluciones salinas entre otros, que repercuten en el rendimiento y calidad del CP.

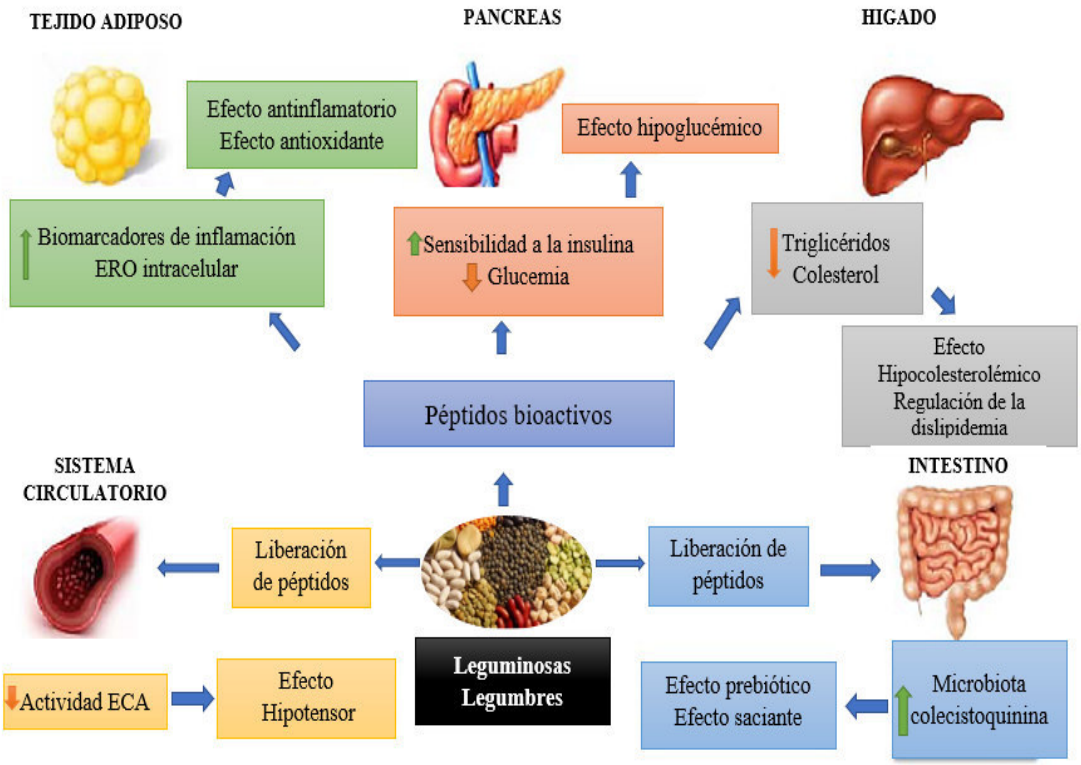


Figura 4. Mecanismos de acción de las actividades biológicas de legumbres implicado en la prevención del SM
Adaptado de Bautista 2018[25].

2.4.1. Péptidos bioactivos provenientes de leguminosas

Los péptidos son secuencias cortas de 2 a 20 residuos aminoacídicos, que se encuentran inactivas en el interior de una determinada proteína precursora, y ejercen alguna actividad biológica tras su liberación mediante hidrólisis (química y/o enzimática)[57], tales como actividad antioxidante, antihipertensiva, antidiabética, hipoglucemiante, entre otros. Estas propiedades dependen de la fuente proteica, condiciones de obtención, calidad proteica, peso molecular y/o composición aminoacídica. Las proteínas contenidas en las semillas de leguminosas, se pueden concentrar y para liberar los péptidos bioactivos se puede utilizar diferentes metodologías[58]. En los hidrolizados proteicos se van evaluando las diferentes actividades biológicas y a través de diferentes métodos cromatográficos se van purificando hasta caracterizar la estructura química, relación estructura-actividad, el efecto en modelos experimentales, la biodisponibilidad y el mecanismo de acción para determinar la bioactividad de los péptidos liberados[57].

2.4.2. Estrategias de obtención de péptidos bioactivos

A partir de la proteína precursora, los péptidos se pueden liberar mediante metodologías como la fermentación, enzimas microbianas y mediante simulación de digestión gastrointestinal[59].

Hidrólisis enzimática

Es un proceso donde la proteína se expone a enzimas proteolíticas que pueden ser comerciales o naturales, bajo parámetros controlados como, concentración sustrato y enzima, temperatura, pH, tiempo, entre otros[60]. Las características de las proteasas disponibles son catalogadas según su origen animal, vegetal, microbiano o fúngico, cada una de las cuales tendrá diferente afinidad y especificidad por sustratos concretos[61]. Las proteasas, de forma general, se clasifican en endoproteasas las cuales hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena proteica; mientras que las exoproteasas, se encargan de liberar aminoácidos de los extremos terminales[62]. Según los residuos catalíticos se clasifican en serinproteasas, cisteinproteasas, aspartatoproteasas según intervengan ciertos aminoácidos como la serina, cisteína o ácido aspártico en el proceso catalítico (Tabla 3). Las proteasas más utilizadas son la alcalasa, neutrasa, tripsina, pepsina y quimiotripsina[60,62].

Tabla 3. Clasificación de proteasas comerciales usadas en el ámbito alimentario

TIPO / ORIGEN		NOMBRE COMERCIAL	FUENTE	SITIO DE ACCIÓN CATALITICA
Serin proteasas	Animal	Tripsina Quimiotripsina Elastasa	Porcino, bovino	Lys, Arg Trp, Tyr, Phe, Leu Ala
	Bacteriana	Alcalasa *B.subtillis*	Bacillus Licheniformis	Ala
Cistein proteasa	Plantas	Papaina Bromelina Ficina	Papaya Piña Látex de Ficus	Phe, Val, Leu,
Aspartato proteasa	Animal	Pepsina Quimiosina	Porcino bovino	Phe, Tyr, Leu, Trp
	Fúngica	Aspergilopeptidasa A Neutrasa	Aspergillus s*aitol* Rhizopus sp.	Glu, Asp, Leu Similar a la pepsina
Metalo proteasa	Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas	Carbonilo AA
	Bacteriana	Neutrasa Termolisina	Bacillus amyloliquefaci e	Phe, Leu, Val

Adaptado de Guadix y col., 2000[62]

Hidrólisis por fermentación microbiana

La fermentación contiene bacterias ácido lácticas que producen enzimas proteolíticas para aprovechar las proteínas como fuente de carbono; en dicho proceso liberan péptidos bioactivos y/o aminoácidos como subproductos[63,64]. En fermentados de trigo con *Lactobacillus plantaron* se ha reportado propiedades antioxidantes[64]. Asimismo, a partir de leche fermentada con cepas de *Lactobacillus helveticus* se han caracterizado péptidos con actividad inhibitoria de ECA[65]

Obtención de péptidos bioactivos mediante digestión gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas

Durante la digestión gastrointestinal ocurren reacciones que permiten hidrolizar macromoléculas de alto peso molecular, de los alimentos, para liberar productos fáciles de absorber. Las proteínas inician su proceso de hidrólisis, a nivel del estómago por acción de proteasas a pH ácido, liberando polipéptidos y algunos aminoácidos libres[66,67]. El quimo formado es desplazado al intestino, donde a nivel del duodeno se neutraliza el pH ácido hasta alcanzar un pH alcalino por acción de los jugos digestivos pancreáticos y sales biliares[68,69], que favorece la actividad catalítica de las enzimas quimiotripsina, elastasa y tripsina generando aminoácidos libres, dipéptidos,

tripéptidos y oligopéptidos que podrían ser absorbidos para alcanzar la circulación sanguínea y órganos dianas donde ejercerán sus efectos biológicos[57,66].

2.4.3. Biodisponibilidad de péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son susceptibles a la actividad catalítica de las proteasas presentes en el tracto gastrointestinal, cuando alcanzan el lumen intestinal, también encuentran proteasas pancreáticas que hidrolizan los polipéptidos a dipéptidos y aminoácidos libres (Figura 5)[56,59,66]. Por ello, es importante evaluar la estabilidad y la resistencia de los péptidos bioactivos durante el proceso de digestión gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas [57,66]. En estos ensayos se incluyen enzimas, como la pepsina a pH acido para la fase gástrica y extractos pancreáticos a pH básico para la fase intestinal.

La resistencia de los péptidos bioactivos dependerá de la composición aminoacídica[57,66,70], en la mayoría de los casos tras la hidrólisis de la secuencia peptídica hay reducción de la actividad biológica a nivel gastrointestinal [71,85]. Sin embargo, en algunos casos se ha observado un incremento de la actividad biológica inicial. Por ejemplo, el heptapéptido KVLPVPQ tras la acción de enzimas pancreáticas, aumentó la actividad inhibitoria de ECA por liberación del residuo Q terminal[57,59,71]. Por tanto, es importante predecir el comportamiento de los péptidos en modelos de digestión gastrointestinal simulando condiciones fisiológicas para evaluar su estabilidad, resistencia a la hidrólisis enzimática y potencial biodisponibilidad[66].

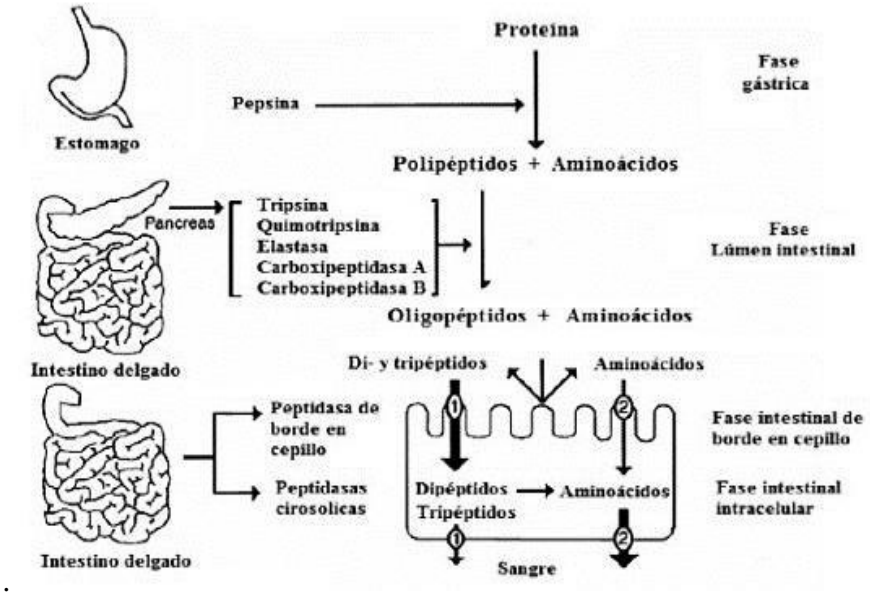


Figura 5. Digestión de proteínas y absorción gastrointestinal.
Tomado de Segura y col., 2010[57].

Predicción de actividades biológicas de péptidos mediante métodos *in sílico*

Este tipo de estudios permite predecir, simular, modelar y visualizar procesos biológicos, a través de un entorno virtual mediante programas informáticos[72]. Para el estudio *in sílico* de péptidos bioactivos se puede utilizar péptidos generados a partir de una proteína de interés de secuencia conocida para optimizar procesos de hidrólisis e identificar los posibles péptidos generados, así como sus actividades biológicas por la información almacenada en bases de datos especializadas[38,79]. Se puede predecir las propiedades fisicoquímicas mediante servidores informáticos como Sequence Manipulation Suite[36,73], se puede determinar el punto isoeléctrico, carga neta, proporción aminoacídica, relaciones de hidrofobicidad e hidrofilicidad utilizando un parámetro GRAVY. También se pueden realizar análisis de dinámica molecular para predecir la relación estructura- actividad biológica en los programas informáticos MOE 2015.1 o PyMol [36].

Es posible someter a péptidos de interés a proceso de digestión gastrointestinal *in sílico* controlando parámetros químicos, enzimáticos o mixtos, mediante el programa PeptideCutter, desarrollado por el instituto suizo de bioinformática (SIB)[72] y las bases de datos del Centro Nacional de Informática Biotecnológica (NCBI)-BIOPEP-UWM[72]. Asimismo, el software Universal Protein Resource (UniProt) nos permite libre accesibilidad a secuencias e información funcional de proteínas y el PeptideRanker posee información de péptidos potencialmente activos por la predicción de su bioactividad.

También podemos evaluar la toxicidad de péptidos de interés mediante el software ToxinPred utilizando información almacenada en la base de datos de UniProt, SIB y el recurso informático de proteínas (PIR)[36,72]. Estos ensayos permiten la realización de experimentos precios de bajo costo, sencillos y rápidos frente a otros métodos tradicionales. Sin embargo, los resultados obtenidos son preliminares y es necesario complementarse con ensayos *in vitro* e *in vivo*.

2.4.4. Multifuncionalidad de péptidos bioactivos derivados de leguminosas con potencial preventivo del síndrome metabólico

Los péptidos multifuncionales son aquellos que pueden ejercer más de una actividad biológica siendo beneficioso para los órganos o funciones dianas. A comparación de los péptidos monofuncionales, que ejercen una sola función, los péptidos

multifuncionales poseen mejores efectos en la salud y suelen ser de menor coste, representando un área emergente con diversas aplicaciones. Estudios han reportado los beneficios múltiples del consumo regular de legumbres sobre diferentes parámetros del SM. *Martínez y col*. realizaron una revisión sistemática de 41 publicaciones, destacando la regulación negativa que ejercen sobre los genes glucolíticos, lipogénicos, y los asociados con la síntesis de acetil-CoA[74]. Los responsables de los efectos observados podrían ser los péptidos multifuncionales procedentes de las proteínas de dichas semillas que podrían ser útiles en la prevención del SM. Jakubczyk y col. reportaron el efecto de péptidos procedentes de proteínas de *Phaseolus vulgaris* sobre diferentes enzimas involucradas en el SM, identificando 8 nuevas secuencias con potencial terapéutico[75]. A continuación, se presentan diversos trabajos relacionados con el efecto biológico de péptidos vegetales y su potencial preventivo sobre el SM (Tabla 4).

2.4.4.1 Actividad antidiabética

La hiperglucemia es la característica principal de la DM2, que se da por la resistencia la insulina, que dificulta el ingreso de la glucosa a las células. La inhibición de la DPPIV, ralentizará la degradación de las incretinas (GLP-1) y el péptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP)[66,76], encargadas de estimular la segregación de la insulina en las células β-pancreáticas[66,77].Asimismo, se conoce que

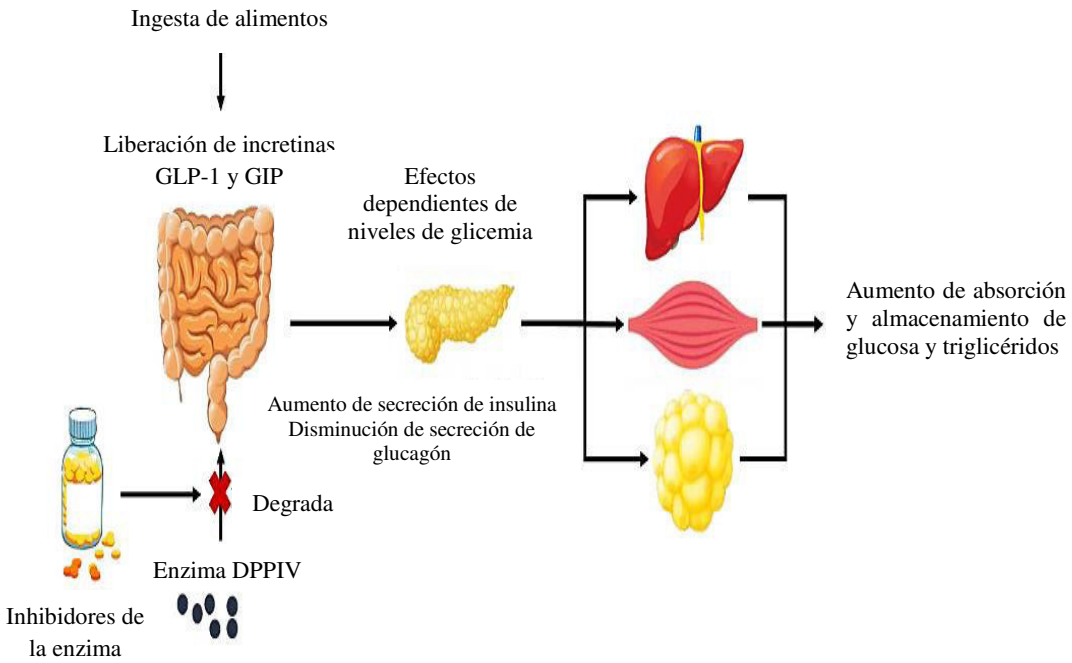


Figura 6. Rol fisiológico de la enzima DPPIV
Tomado de Aguirre 2021[79]

la inhibición de la enzima α-amilasa salivar y pancreática impiden la ruptura de enlaces de almidones complejos a oligosacáridos, impidiendo su absorción[66,78,79].

La inhibición de la enzima α-glucosidasa dificulta la degradación de oligosacáridos a compuestos más pequeños (glucosa) en el intestino delgado. Por ende, el bloqueo de estas enzimas disminuiría el traslado y absorción de glucosas al torrente sanguíneo[78]. Los péptidos vegetales se han caracterizado por presentar esta actividad inhibitoria, tales como variedades de frijol (negro, rojo, pinto), soya presentan actividad inhibitoria de DPPIV[80,81]. Para los inhibidores de α-amilasa y α-glucosidasa se asocian secuencias 3 a 6 residuos aminoacídicos, que puedan estar ubicado es su N-terminal serina, treonina, tirosina arginina o lisina; mientras que el extremo C-terminal se asocia a residuos como arginina o metionina[82].

Los péptidos de frijol negro tales como AKSPLF y EGLELLLLLAG demostró tener buena actividad antidiabética, el autor infiere que los aminoácidos como leucina, fenilalanina, glicina y prolina favorecerían su actividad[61,82].

2.4.4.2 Actividad hipolipemiante

Los péptidos hipolipemiantes inhiben la lipasa pancreática impidiendo la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos, dificultando su absorción. En la actualidad solo el Orlistat ha sido aprobado por la FDA, este compuesto es recomendado para reducir la absorción de grasas en la dieta. Sin embargo, desencadena múltiples efectos secundarios como alergia, urticaria, otros[61]. Por lo que las fuentes proteicas naturales podrían ser una buena alternativa para la búsqueda de este tipo de inhibidores. Se resalta el potencial de los péptidos del frijol procedente de México por presentar buen perfil hipolipemiante[16,83].

2.4.4.3 Actividad antihipertensiva

El sistema renina-angiotensina-aldosterona por la acción de la renina convierte el angiotensinógeno en angiotensina . La ECA, una dipeptidil carboxipeptidasa, hidroliza la histidil-leucina del decapéptido angiotensina I y lo convierte en un octapéptido de angiotensina II, que es un potente vasoconstrictor y actúa directamente en los vasos sanguíneos, nervios simpáticos y glándulas suprarrenales, elevando a la presión arterial[25,66]. Los péptidos IECA por lo general tienen secuencias cortas de aminoácidos y contienen residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal pero también residuos de arginina, fenilalanina y prolina[70,84]. Asimismo, algunos péptidos actúan

directamente inhibiendo la renina disminuyendo la concentración de angiotensina II y aumentando los niveles de bradiquinina eventos que favoreciendo la reducción de la presión arterial[66].

2.4.4.4 Actividad antioxidante

Los péptidos antioxidantes pueden contener entre 3 a 15 aminoácidos y dependerá de su estructura, posición y conformación[36,66]. Se destaca la presencia de los aminoácidos aromáticos histidina, triptófano y tirosina, los cuales mejoran la captación de radicales porque tienen la capacidad de donar protones para estabilizarlos dando lugar a su configuración electrónica completa[36]. La histidina tiene la propiedad de donar hidrógenos a través de su grupo imidazol, se ha descrito que los tripéptidos con tirosina y triptófano en su posición C-terminal presentan mejor actividad antioxidante[36,61]. También se ha descrito la importancia de los aminoácidos lisina, metionina sobre la actividad antioxidante[66].

A partir de hidrolizados proteicos de semillas de leguminosas se han caracterizado diferentes péptidos antioxidantes, uno de los más estudiados es la lunasina de soya, que tiene la capacidad de disminuir marcadores de estrés inflamatorio y oxidativo inducido por lipopolisacárido (LPS)[85,86]. También se han descrito péptidos antioxidantes en otras leguminosas como garbanzo, frijol, pajuro, etc., algunos de ellos presentan potencial multifuncional, con propiedades inhibidoras de la ECA y DPPIV, anticancerígena, hipocolesterolémico, entre otras, que podrían servir como alternativa para la prevención de los factores de riesgo asociados al SM. Sin embargo, es necesario caracterizar sus efectos en diferentes modelos experimentales, una alternativa es el uso de modelos de estrés oxidativo en líneas celulares estables, para evaluar el efecto protector de péptidos y caracterizar el potencial terapéutico sobre el SM.

Tabla 4. Péptidos aislados de leguminosas con potencial terapéutico sobre el SM

LEGUMINOSA	PROTEÍNA PRECURSORA	ENZIMAS HIDROLÍTICAS	PÉPTIDOS RESPONSABLES	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIA
Frejol común *(Phaseolus vulgaris)*	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	GLTSK, LSGNK, GEGSGA, MPACGSS y MTEEY	Anticancerígena Antioxidante	Luna-Vital y col., 2014
		Alcalasa y papaína	PVNNPQIH	Inhibidor ECA	Rui y col., 2013
		Pepsina y pancreatina	YAGGS y YAAGS	Inhibidor ECA	Mojica y col., 2014
Garbanzo *(Cicer arietinum)*	Hidrolizado de albúmina	Alcalasa	RQSHFANAQP	Antioxidante y Antiproliferativo	Xue y col., 2015
	Aislado proteico	Pepsina y pancreatina	ALEPDHR, SAEHGSLH	Antioxidante	Torres-Fuentes y col., 2015
		Pepsina y pancreatina	YZDCM	Antimicrobianos	Yili y col., 2012
		Alcalasa	IR, KF y EF	Inhibidor ECA	Li y Aluko, 2010
		Termolisina	LTFPG, IFENLQN y FEGTVFENG	Inhibidor ECA	Pownall y col., 2010
Lenteja *(Lens culinaris)*	Globulinas	Pepsina y pancreatina	KLRT, TLHGMV, VNRLM	Inhibidor ECA	Jakubczyk y Baraniak, 2013
	Aislado proteico	Savinase	LLSGTQNQPSFLSGF, NSLTLPILRYL y TLEPNSVFLPVLLH	Antioxidante e inhibidor ECA	Lammi y col., 2019
Soja *(Glycine max)*	Aislado proteico	Pepsina y papaína	β-conglicinina	Antihipertensivo	Margatan y col., 2013
		Pepsina y pancreatina	Inhibidor de Bowman Birk y Lunasina	Anticancerígeno Hipocolesterolémico Antioxidante	Park y col., 2007 Inoue y col., 2011

Tomado de Díaz de la Cruz 2020[72]

2.5. Evaluación del efecto protector de compuestos en líneas celulares

El EO juega un papel importante en la patogénesis del SM porque afecta la función de las células βpancreáticas y altera el transporte de glucosa en el tejido muscular y adiposo. Por ende, los compuestos antioxidantes serían útiles para prevenir la progresión de la enfermedad. Convencionalmente, se usan los ensayos químicos (ABTS, FRAP, DPPH, ORAC, HORAC), sin embargo, los modelos de estrés oxidativo en líneas celulares y los modelos *In vivo* vienen cobrando mayor preponderancia [36,66].

Los ensayos químicos son los más utilizados y se consideran como preliminares para analizar el potencial antioxidante de múltiples compuestos a la vez. En el caso de los modelos animales, los ensayos de EO son más representativos, sin embargo, se limita el número de compuestos por estudio, requieren períodos prolongados, costes altos e implicaciones éticas[36,37]. Los ensayos en líneas celulares representan una etapa intermedia, que permite caracterizar el efecto protector, de compuestos activos en modelos de estrés oxidativos específicos[87].

Cultivo celular

Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, conservando sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas[36]. Permiten estudiar procesos relacionados con la interacción célula- célula, célula- matriz, función especializada de las células[88]. En la Tabla 5, se describen los diferentes tipos de cultivos celulares

Tabla 5. Tipos de cultivos celulares

Tipos	Origen	
Cultivos primarios Aisladas estrechamente de tejidos y órganos, por segregación enzimática o mecánica, poseen una vida limitada.	**Monocapa**	Las células crecen adheridas al sustrato hasta su proliferación. Es un método muy utilizado ya que poseen estabilidad genética.
	Suspensión	Lograr crecer sin adherirse al sustrato, son independientes, siendo algunas de ellas, células tumorales o hematopoyéticas.

Líneas celulares Tienen alta capacidad de multiplicarse, pero cuando llegan a confluencia, y tienen contacto entre ellas se inhibe su crecimiento, por lo que es dable los subcultivos transvasándose a un nuevo recipiente.	**Continua**	Poseen la capacidad de ser subcultivada indefinidamente. Pueden surgir de forma espontánea o inducida.
	Finita	Poseen una vida limitada y crecen lentamente a medida que se realizan pases, es decir, se incrementa la capacidad de crecimiento. Pero al llegar a un número limitado de subcultivos pierde su capacidad de proliferar y mueren.

Adaptado de Acevedo-Fernández y col 2013[140]

Modelos celulares para el estudio de compuestos antioxidantes

La utilización de cultivos celulares para establecer modelos de EO ha sido ampliamente desarrollada para la evaluación de compuestos antioxidantes, en estos ensayos se induce la generación de EO con inductores tóxicos[36]. A continuación, se detallan algunos de los modelos más utilizados.

Línea celular de hepatoma humano (HepG2) Es una línea celular procedente de hígado humano diferenciada y ampliamente utilizada para estudios bioquímicos y nutricionales. La biotransformación de algunos xenobióticos origina EO por generación de compuestos oxidativos[36,89].

Línea celular de adenocarcinoma de colon humano (HT29) Expresa características intestinales diferenciadas y maduras[36], por ello es muy empleada para estudios de biodisponibilidad y digestibilidad de compuestos. Las células crecen en forma de monocapa con formación del borde de cepillo típico, lo cual permite predecir la ruta de transporte hacia un órgano diana[89,90].

Línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2) Exhibe funciones biológicas y estructurales de microvellosidades del intestino humano[36]. Las células logran diferenciarse cuando alcanzan confluencia celular (fase estacionaria), etapa donde se realizan estudios de inducción de toxicidad, biodisponibilidad, entre otros[36,89].

Línea celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) Esta línea deriva de un neuroblastoma humano y proviene de una sublínea clonada de SK-N-SH[89]. Las células SH-SY5Y son altamente sensibles al EO y la toxicidad de diferentes compuestos lo cual permite la evaluación de efectos citotóxicos, metabólicos como marcadores neuronales y otros[89,91] incluyendo el efecto protector de compuestos antioxidantes. En la figura 7, se observa el procedimiento para la evaluación del efecto protector en una línea celular[92].

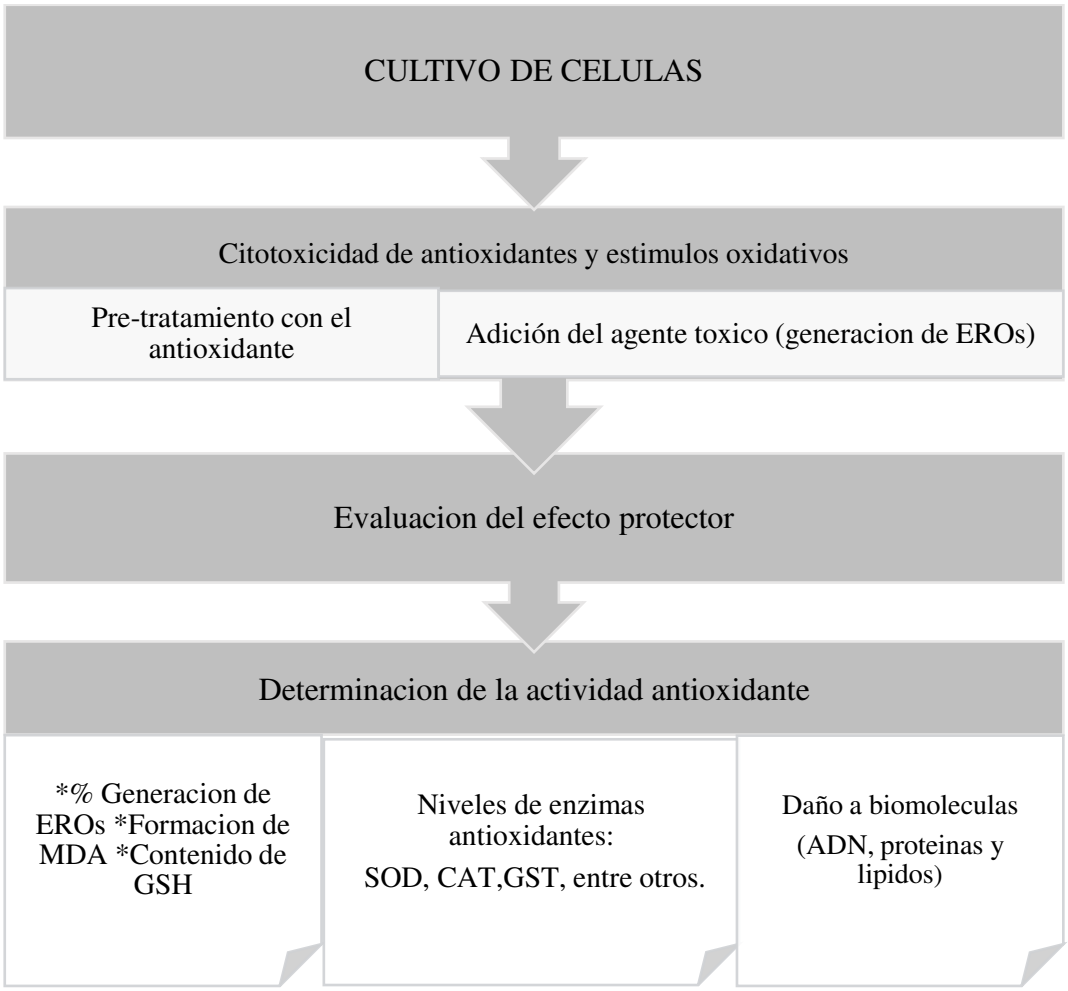


Figura 7. Métodos de evaluación de antioxidantes en cultivos celulares
Tomado y adaptado de García 2019[36]

2.6. *Erythrina edulis*

Es una leguminosa que pertenece a la familia fabácea, es el único comestible de 112 especies descritas para el género[93]. Se distribuye en áreas tropicales de América, comprendiendo países como Perú, Venezuela, Bolivia, Ecuador y Colombia. Los nombres comunes, varían de acuerdo con el lugar de procedencia, tales como, pajuro, chachafruto, baluy, antiporoto, pashuro, pisonay, frijol o guaro[94].

El pajuro es un árbol frondoso de altura variable, tiene un rango entre 10 a 15 m, con un tallo de diámetro de 37 cm, tiene la capacidad de erosionar el suelo y suele crecer en lugares áridos, soportando largos periodos de sequía[95]. Además, es una planta con capacidad fijadora de nitrógeno por la presencia de la bacteria *Rhizobium* presente en sus raíces. Las hojas son en glabra, con foliolos enteros con estipulas de forma elípticas, las flores son pequeñas de 3 a 6 mm de largo, siendo generalmente rojas o naranjas como se puede observar en la figura 8A[95,96]. Los frutos son legumbres de color verde de consistencia subleñoso entre 10 a 40 cm de largo y las semillas tienen un tamaño de 2 a 6 cm de largo de forma ovoide y el color de la cascara es marrón figura 8B[95,96].



Figura 8. *Erythrina edulis* (Pajuro)
A). Árbol; B) Vainas y semillas

2.6.1. Composición aminoacídica

Cada 100 g de semillas de pajuro pueden contener hasta 25% de proteínas, también se ha caracterizado la composición aminoacídica en la harina (Tabla 6), sin embargo, los valores reportados se encuentran por debajo de los requerimientos propuestos por la FAO[97]. La obtención de los concentrados proteicos permite incrementar el contenido de aminoácidos esenciales, unos de los métodos más empleados es la precipitación isoeléctrica de las proteínas solubles a pH 10-11, a partir de las semillas pajuro se ha reportado CP conteniendo 75% proteínas, superando en más de tres veces el contenido

de proteínas de harina sin procesar, además se destaca el contenido de Leu, Asp, Glu, Arg, Ala, Gly, Tyr, Phe, Thr. El perfil aminoacídico revela el contenido de proteínas que podrían contener péptidos multifuncionales para la prevención de patologías asociadas al SM[9].

Tabla 6.Composicion aminoacídica de la harina y concentrado proteico de semillas de *Erythrina edulis.*

Aminoácidos		Contenido de pajuro (g/100g proteínas)		
		Harina	Concentrado proteico	FAO
ESENCIALES	Lys	2.6 ± 0.10	2.7 ± 0.20	5.2
	Trp	n.d	n.d	0.7
	Phe	1.7 ± 0.03	2.0 ± 0.10	4.6[a]
	Tyr	0.2 ± 0.03	1.6 ± 0.04	--
	Met	0.1 ± 0.00	0.4 ± 0.03	2.6[b]
	Cys	0.8 ± 0.10	0.8 ± 0.10	--
	Thr	1.0 ± 0.04	1.4 ± 0.10	2.7
	Leu	2.5 ± 0.10	3.7 ± 0.30	6.3
	Ile	1.1 ± 0.10	1.4 ± 0.10	3.1
	Val	1.9 ± 0.03	1.8 ± 0.10	4.2
NO ESENCIALES	Asp[c]	6.5 ± 0.10	5.3 ± 0.01	--
	Glu[d]	7.2 ± 0.20	13.6 ± 0.50	--
	Ser	2.3 ± 0.10	6.8 ± 0.20	--
	His	2.2 ± 0.03	1.1 ± 0.10	--
	Arg	0.8 ± 0.02	2.0 ± 0.20	--
	Ala	2.2 ± 0.01	1.7 ± 0.03	--
	Prol	3.1 ± 0.20	2.3 ± 0.10	--
	Gly	2.1 ± 0.10	2.0 ± 0.00	--

n.d: no definido; [a] Phe+ Tyr; [b]Met + Cys; [c]Asp + Asn; [d]Glu + Gln. Los datos son la media de dos determinaciones

Tomado de Intiquilla y col. 2019[9].

2.6.2 Péptidos antioxidantes derivados de *Erythrina edulis*

El 2016 nuestro grupo de investigación evidenció el buen perfil antioxidante de la fracción peptídica <3 kDa obtenida a partir del hidrolizado con alcalasa de las proteínas solubles de pajuro[9]. A partir de esta fracción se han purificado, identificado y caracterizado 14 péptidos con potencial multifuncional[10]. Hasta el momento, se ha confirmado la actividad antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-I) y la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) de algunos de estos péptidos, sugiriendo un efecto prometedor frente al SM (Tabla 7)[10].

Tabla 7. Composición de péptidos de pajuro obtenidos mediante secuenciamiento de novo

Fracción	Péptidos de pajuro reportados	Secuencia bioactiva (BIOPEP)	Proteína precursora	Actividad biológica
F4	WAL	-	-	-
	PTGH	-	-	-
	DLGL	DLGLGLPGAH	Rotífero marino	Antioxidante
	VVAH	-	-	-
	HAVL	AVL	varias proteínas alimentarias	Inhibidor de ECA
	GNLGGL	-	-	-
	SPQLQ	-	-	-
	AALWE	LWE	péptido sintético	Antioxidante
	GAVASPL	-	-	-
	EVDGNS	-	-	-
	MWPW	MWP	péptido sintético	Inhibidor de DPPIV
	ETPAGAV	-	-	-
	DFFMS	-	-	-
	EEENGS	EEE	péptido sintético	Estimulación de sustancias vasoactivas
	YLLTR	YLL YLLF	péptido sintético β-lactoglobulina	Antioxidante, Inhibidor de ECA, Opioide
	SKDAPY	-	-	-
	DGLGYY	DGL LGY GYY	péptido sintético	Inhibidor de ECA, Opioide, Inmunoestimulante
F6	ELGMGDS	-	-	-
	MFTGPY	TGP	péptido sintético	Inhibidor de ECA
	HVHEPC	HVH	péptido sintético	Antioxidante
	CCGDYY	DYY	péptido sintético	Antioxidante
	GESWCR	-	-	-
	RLEGFGS	-	-	-
	YDLHGY	LHG	péptido sintético	Antioxidante
	GSYHDSK	-	-	-
	AVAVPSING	VAV AVP	caseína	Inhibidor de ECA
	APGTVK	APG	varias proteínas alimentarias	Inhibidor de ECA, DPPIV y antioxidante
	SQLPGW	LPG	varias proteínas alimentarias	Inhibidor de ECA, DPPIV y antioxidante
	NMGQADS	-	-	-
	MFLTHK	-	-	-

Tomado de Intiquilla y col., 2019[10]

CAPITULO III. METODOLOGIA

3.1. Tipo de investigación

Este trabajo fue de diseño experimental porque se evaluaron diferentes concentraciones de péptidos bioactivos derivados de pajuro para determinar su multifuncionalidad y efecto protector; prospectivo porque los experimentos se realizaron después de la formulación del proyecto; transversal porque los efectos evaluados fueron puntuales y analítico debido a que se investigó las causas de las variaciones.

3.2. Diseño metodológico

Unidad de análisis

Catorce secuencias peptídicas derivadas de semillas de pajuro *Erythrina edulis* que mostraron buen perfil antioxidante[10]. Para este trabajo los péptidos fueron obtenidos mediante síntesis química por el método Fmoc de síntesis en fase sólida en el Instituto de Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIAL-CSIC) Madrid - España.

3.3. Determinación de la actividad biológica *in vitro* de los péptidos de pajuro sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas con el síndrome metabólico

Las siguientes actividades biológicas se realizaron individualmente a los 14 péptidos de pajuro.

3.3.1. Evaluación de la actividad antioxidante

A) Ensayo de la capacidad de absorción de radical oxígeno (ORAC)

Se utilizó la metodología de *Hernández-Ledesma y col.,*[98] con algunas modificaciones. El método se fundamenta en la pérdida de la fluorescencia de la sonda fluoresceína (FL) que es causada por la generación de radicales peróxidos (ROO^{-}) del azocompuesto 2,2`-azobis (2-amidinopropano) dihydrochloridrato (AAPH). El antioxidante evita el descenso de la fluorescencia mediante la transferencia de átomos de hidrógeno al radical libre. La reacción se llevó a cabo a 37°C en tampón fosfato de sodio [75 mM] a pH 7,4 en un volumen final de reacción de 200 µL en placas de 96 pocillos de fondo plano. El patrón antioxidante fue el Trólox que se preparó a diferentes diluciones en un rango de [0.2–1.6 µmol]. El radical utilizado fue APPH [96 mM] además se utilizó FL [45 nM]. Se añadió 150 µL de FL y 25 µL de muestra o patrón, a la microplaca y fue pre-incubada por 30 min a 37°C. Luego se agregó 25 µL

de AAPH. La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación 520 ηm y emisión 485 ηm, en un lector de microplacas TECAN Infinite (M200). Los resultados fueron expresados como µmol ET/ µmol de péptido, el cual fue determinado mediante la división de las pendientes de la ecuación de la recta de la muestra / estándar en función al cálculo del AUC neta (área bajo la curva) y concentración del antioxidante.

B) Método de captación de radical ABTS

Se utilizó el radical ácido 2,2-azinobis-(3- etilbenzotioazolín- 6-sulfónico) (ABTS) siguiendo la metodología descrita por *Re y col.*,[99] con algunas modificaciones. Se preparó una solución de persulfato de potasio 2.45 mM y ABTS 7 mM, la mezcla se incubó durante 16 h en oscuridad a temperatura ambiente, luego se diluyó en una solución de etanol al 20% hasta obtener una absorbancia de 0.700 a 734 ηm. Se utilizó Trólox como antioxidante de referencia en un rango de concentraciones de [2-25 µM]. Para el ensayo se tomó 20 µL de estándar o muestra y se completó con la solución de ABTS para un volumen de 1 ml y se incubó en oscuridad por 7 min, la absorbancia se determinó a 734 ηm en un espectrofotómetro Ependorf. Los resultados se expresaron en ET (µmol de equivalente Trólox/ µmol péptido).

3.3.2. Evaluación de la Actividad antidiabética

A) Inhibición Dipeptidil Peptidasa IV (DPPIV)

Se utilizó el kit comercial DPPIV *Inhibitor Screnning KIT MAK203* (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA))[100], siguiendo las especificaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Para un volumen final de reacción de 100 µl en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8.0, se añadió 5 µL de la enzima DPPIV, 10 µL péptidos (a diferentes concentraciones) o Sitagliptina a 6 µM, la mezcla se pre-incubó a 37°C durante 10 min, luego se adicionó 5 µL de sustrato (H-Gly-Pro conjugado a amino metilcumarina (AMC)), se incubó a 37°C durante 30 min, la fluorescencia se determinó cada 2 min a una longitud de onda de excitación/emisión de 360 y 460 ηm respectivamente, en el lector de placas TECAN Infinite (M200). Los resultados se expresaron como valor de IC_{50}, concentración de compuesto necesaria para inhibir la actividad de DPP-IV al 50%.

B) Inhibición α-glucosidasa

Se siguió la metodología descrita por *Johnson y col., & Liu y col.,*[101,102], con algunas modificaciones. La mezcla de reacción se desarrolló en tampón fosfato 0.1 M (pH 6.9), en un volumen de reacción final de 200 µL, conteniendo enzima α-glucosidasa de

Saccharomyces cerevisiae 2 U/mL (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)), el sustrato 4-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside [5mM] y el inhibidor Acarbosa [1 mM], la mezcla se pre-incubó durante 20 min a 37°C, después del tiempo transcurrido se añadió el sustrato a una concentración final de 250 µM. La reacción enzimática fue monitoreada cada 2 min durante 30 min en un lector de microplaca TECAN Infinite (M200) a 405 ηm. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición en relación con la actividad enzimática.

C) Inhibición enzimática de α-amilasa

La actividad inhibitoria α-amilasa fue evaluada siguiendo la metodología reportada por *Subramanian y col. & Bello y col.,*[103,104], con algunas modificaciones. La mezcla de reacción (200 µL) se desarrolló en tampón fosfato 0.1 M (pH 6.9), que contenía α-amilasa de páncreas porcino Tipo VI-B 80 U/mL (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)), almidón [5mg/ml] y los péptidos o estándar [0.5 mM], se incubó a 37°C durante 30 min. Trascurrido el tiempo, se añadió 100 µL DNS (1% de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 30 % Tartrato sodio y potasio en NaOH 0.4M), se agitó e incubó a 100°C durante 10 min. Posterior a ello, las absorbancias fueron leídas a una longitud de 540 ηm en un lector de microplaca TECAN Infinite (M200). Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición en relación a la actividad enzimática.

3.4.4. Evaluación de la actividad hipolipemiante

Inhibición de lipasa pancreática

Se evaluó la actividad inhibitoria siguiendo la metodología descrita por *Dolenc y col., & Gupta y col.,* [105,106] con algunas modificaciones. Previo al ensayo se utilizó tampón fosfato de sodio a [50 mM] (pH 8.0) para obtener dos soluciones de 25 mL; el tampón de reacción I (Deoxicolato de sodio 5 mM) y tampón de reacción II (Deoxicolato de sodio [5mM]**,** cloruro de calcio [0.2 mM]). La mezcla de reacción final se llevó a cabo en el tampón de reacción II (200 µL), conteniendo la enzima de lipasa pancreática porcino Tipo II (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) (que previamente se suspendió al 10% (p/v) en tampón de reacción I y centrifugó a 1000 rpm por 3 min), el sustrato 4-Nitrophenyl palmitato [10 mM] (diluido en tampón de reacción I) y el inhibidor Orlistat o péptidos a una concentración de [0.5 µM] y [100 µM], respectivamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 60 min y la absorbancia de midió a 405 ηm cada 2 min en un lector de placas TECAN Infinite (M200). Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición en relación con la actividad enzimática.

3.3.5. Evaluación de la actividad antihipertensiva

Actividad inhibitoria ECA

La actividad inhibitoria ECA se evaluó siguiendo la metodología de *Hayakari y col.,*[107] con algunas modificaciones. La mezcla de reacción final (200 µL) se desarrolló en tampón borato [150 mM] (pH 8.3), que contenía, la enzima convertidora de angiotensina ECA 1 mU (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)), el inhibidor (Captopril o muestra a diferentes concentraciones) y el sustrato HHL (Hipuril Histidil Leucina) a [1.25 mM]. La mezcla se incubó a 37°C durante 60 min. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 10 min, luego se agregó 100 µL de solución de TT (Tricloro–5-Triazina/dioxano) al 3%, se centrifugó a 1000 g durante 10 min. La absorbancia a 382 ηm se midió en un lector de placas TECAN Infinite (M200). Los resultados se expresaron como valor de IC_{50}, concentración necesaria para inhibir la actividad de ECA al 50%.

3.4. Evaluación del comportamiento de los péptidos de pajuro durante el proceso de digestión gastrointestinal *in sílico*.

Posterior a evaluar las actividades biológicas y con los estudios previamente reportados, se escogieron a 6 péptidos multifuncionales de pajuro para realizar la evaluación de la digestibilidad *in sílico* siguiendo la siguiente metodología.

A) Simulación de la digestión gastrointestinal *in sílico*

Predice el desenvolvimiento de los péptidos de pajuro tras la hidrólisis con enzimas digestivas e intestinales y permite identificar la conservación o fragmentación del péptido, logrando pronosticar actividades biológicas por medio de la base de datos BIOPEP, que luego puedan ser corroborados con ensayos *in vitro* o *in vivo*.

Las secuencias de los péptidos de pajuro fueron sometidas a digestión *in sílico* en el servidor Expasy que es el portal de recursos bioinformáticos del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el software utilizado es PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter/). El software permite la predicción de los sitios de escisión de proteasas en una secuencia de proteínas mayor a 3 aminoácidos[108]. Las reglas de escisión para las enzimas que emplea el software se predicen a través de los datos de especificidad de *Keil* [109].

Para la fase gástrica se escogió a la enzima representativa Pepsina (pH:1.3) (EC 3.4.23.1), que tiene preferencia por cortes de aminoácidos Phe, Tyr y Leu, en sitios de posición P1 y P3 de una secuencia peptídica. Para la fase intestinal se utilizaron la

Tripsina (EC 3.4.21.4) que tiene preferencia por la Arg y Lys en la posición P1 a pH altos que el programa tiene contemplado y Quimotripsina de alta especificidad (EC 3.4.21.1) que escinde preferentemente en Trp, Met, Tyr y Phe en la posición P1, este corte puede inhibirse en presencia de Pro[110].

Los cortes de escisión de una proteasa están basados en la caracterización del sustrato natural respectivo. Es por ello, que el software adopta la nomenclatura de subsitios de un esquema general de escisiones, bajo este modelo los residuos aminoacídicos de un sustrato sufren cortes denominados P1, P2, P3, P4, etc. Asimismo, los residuos en la dirección C-terminal son denominados P1´, P2´, P3´ y así sucesivamente según el tamaño de la secuencia peptídica, Figura 9 [111].

Los resultados son obtenidos en secuencias de aminoácidos tras el corte con la enzima seleccionada, expresado en Dalton, de acuerdo a su peso molecular.

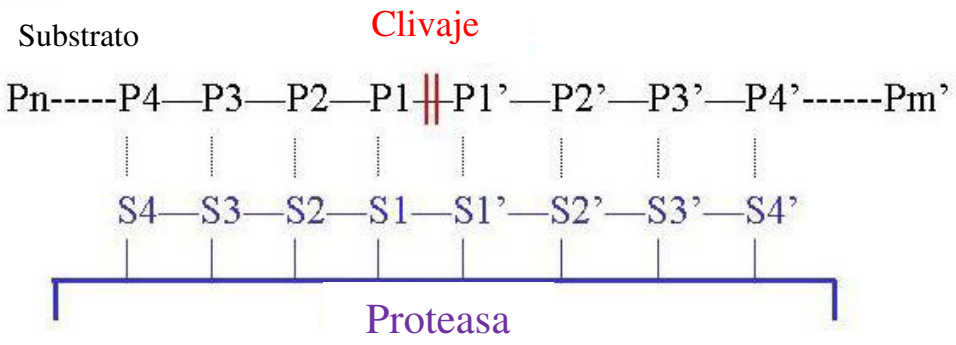


Figura 9. Representación esquemática del complejo enzima-sustrato de los sitios de unión de una proteasa[111].

B) Determinación de la bioactividad de los productos de la digestión gastrointestinal de los péptidos de pajuro *in sílico*

La actividad biológica de los péptidos de pajuro, se evaluó tras la obtención del producto de hidrólisis con Pepsina (EC 3.4.23.1), Tripsina (EC 3.4.21.4) y Quimiotripsina de alta especificidad (EC 3.4.21.1). Se utilizó el servidor BIOPEP-UWM (www.uwm.edu.pl/biochemia), que está asociada a bases de datos de diferentes países como EROP-Moscow, PepBank, Satpdb, entre otras, que le brindan al servidor mayor exactitud. Además, utiliza conceptos de fragmentómica, que permite la búsqueda de péptidos con motivos continuos atribuidos a una determinada función, por esas características este servidor es ampliamente utilizado en la ciencia de la alimentación y nutrición como fuente de información sobre los péptidos bioactivos implicados en la prevención de enfermedades crónicas[112].

C) Evaluación de la toxicidad de los péptidos *in sílico*

Se utilizó el software ToxinPred (http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/) para la predicción de toxicidad peptídica, está basado en una recolección de data de 1085 aproximadamente de péptidos tóxicos reportados a nivel mundial y utiliza la herramienta machine-learning technique_Support Vector Machine (SVM) para la diferenciación de la toxicidad[113].

3.5. Evaluación del efecto de los péptidos de pajuro frente al estrés oxidativo en cultivo de células SH-SY5Y

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Cat. CRL-2266, ATCC). Para el crecimiento de la línea celular SH-SY5Y se cultivó en medio RPMI-1640, suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10% con glutamina, piruvato de sodio a 1 mM y 50 µg/ml de gentamicina. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera humidificada al 95% de aire a humedad constante y 5% de CO_2.

Evaluación del efecto de los péptidos multifuncionales sobre la viabilidad celular

La viabilidad de las células SH-SY5Y se evaluó en presencia de los péptidos de pajuro para determinar el rango de concentración que no genere citotoxicidad, se utilizó el ensayo de viabilidad celular mediante el método de reducción del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazolio (MTT), el método se fundamenta en la reducción metabólica de este compuesto, por el succinato deshidrogenasa liberando un producto insoluble coloreado (sales de formazán). Para esta evaluación se sembró 20 000 células/pocillo en medio completo conteniendo FBS 1% en placa de 96 pocillos, las células se incubaron durante 16 h a37°C en una atmósfera humidificada al 95% de aire a humedad constante y 5% de CO_2. Transcurrido el tiempo, las células se trataron con los péptidos de pajuro en un rango de [25 µM – 100 µM] durante 24 h a 37°C, en las mismas condiciones de cultivo. Posterior a ello, se desechó el sobrenadante y se añadió la solución de MTT [2 mg/mL] e incubo a 37°C durante 2 h. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se adicionó 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán, la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de placas Infinite M200 Pro (Tecan Group AG). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células viables, con respecto al control, considerando como 100% a las células no tratadas.

3.6. Generación de un modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ en la línea celular SH-SY5Y

Para la generación de este modelo se utilizó el método de oxidación del di acetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) descrito por *LeBel y col*,.[114] con algunas modificaciones. El reactivo DCFH-DA es capaz de atravesar la membrana celular que al ser desacetilada por esterasas mitocondriales se transforma en 2-7-diclorofluoresceína oxidada (DCFH) (compuesto no fluorescente), que al estar en contacto con los radicales libres se transforma en 2-7-diclorofluoresceína (DCF) compuesto fluorescente, que es cuantificable y permitió evaluar los niveles de estrés generado en las células SH-SY5Y por el agente oxidante.

Para la generación del modelo de estrés oxidativo en la línea celular se sembraron 20 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio completo con FBS al 1% y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2, transcurrido el tiempo se retiró el medio de cultivo y lavó con tampón PBS, luego se añadió a cada pocillo 100 µL de la solución A (DCFH 10 mM y glucosa 1 M) e incubó durante 30 min a 37°C. Posterior a ello, se descartó el sobrenadante y añadió el $FeSO_4$ en un rango de 100 µM-200 µM, como agente tóxico en medio completo con FBS al 1%, para un volumen de reacción de 100 µL, se incubó durante 60 min. Se cuantificó la fluorescencia en un lector de placas TECAN Infinite (M200), a una longitud de λexc = 485 ŋM y λem= 530 ŋM. Se eligió la concentración de $FeSO_4$ que induzca aproximadamente 50% de incremento de la liberación de radicales libres en relación con las células control. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

A) <u>Actividad antioxidante de los péptidos de pajuro a diferentes tiempos de exposición frente a la toxicidad inducida por FeSO4 en células SH-SY5Y.</u>

Las células se sembraron a una densidad de 20 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio completo con FBS al 1% y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO_2, transcurrido el tiempo indicado, se desechó el sobrenadante y añadió 90 µL del medio completo con FBS al 1%, y los 6 péptidos multifuncionales de pajuro, seleccionados anteriormente, a una concentración de 100 µM, se incubaron a diferentes tiempos 3, 6, 12 y 24 h a 37°C y CO_2 al 5%. Después del tiempo indicado para cada ensayo, se continuó con el método DCFH-DA descrito anteriormente, una vez eliminada la solución A, se añadió 90 µL de PBS y 10 µL de $FeSO_4$ a una

concentración de 200 µM para un volumen de reacción final de 100 µL, se incubó durante 60 min y la fluorescencia se determinó en un lector de placas TECAN Infinite (M200), a una longitud λexc = 485 ŋM y λem=530 ŋM. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

B) Actividad antioxidante de los péptidos de pajuro a diferentes concentraciones frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$

Las células se sembraron a una densidad de 20 000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en medio completo con FBS al 1% y se incubaron por 16 h a 37°C y 5% de CO_2, se eliminó el medio y las células se lavaron con tampón PBS. A cada pocillo se añadió 90 µL de medio de cultivo completo con FBS al 1% y 10 µL de los péptidos de pajuro a la concentración necesaria para alcanzar la concentración final de 25, 50 y 100 µM, además se utilizó al Trólox como estándar de referencia a una concentración de 100 ŋM, las células se incubaron durante 3 h a 37°C/5% de CO_2. Luego, se desechó el sobrenadante, se continuo con el método DCFH-DA, una vez eliminada la solución A en los parámetros descritos anteriormente. Se añadió el agente citotóxico $FeSO_4$ [200 µM] y cuantifico la fluorescencia después de 60 min en un lector de placas TECAN Infinite (M200), a una longitud de λexc= 485 ŋM y λem= 530 ŋM. Los resultados se expresaron en unidades relativas de fluorescencia (URF).

3.7. Determinación del efecto protector de los péptidos de pajuro frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$

A) Efecto de los péptidos sobre la actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Se evaluó la actividad LDH citosólica que, tras el daño celular, se libera al medio extracelular, esta enzima cataliza la conversión de lactato a piruvato en presencia del cofactor NADH.

Las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 75 000 células/placa en medio completo con FBS al 10% y se incubaron durante 72 h hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%. Posterior a ello, se desechó el sobrenadante y los péptidos se añadieron a una concentración final de 100 µM, en el medio de PBS de cultivo conteniendo glucosa a 10 mM, las placas se incubaron durante 30 min a 37°C/ 5% de CO_2, luego se desechó el sobrenadante, se lavó con PBS y añadió medio completo con FBS al 1% y $FeSO_4$ 200 µM y se incubaron por 3 h a 37°C/5% de CO_2. Tras el tiempo transcurrido se continuó con el protocolo de LDH, se

tomó 100 µL del sobrenadante de cada tratamiento y se añadió la mezcla de reacción (Piruvato sódico 0,18 mM y NADH 0,60 mM, en tampón fosfato 50 mM, pH 7.4). Seguidamente se evaluó la disminución de la fluorescencia durante 2 min a λexc=360 ηM y λem= 460ηM en un lector de microplaca Infinite M200PRO (TECAN). Los resultados se expresaron como actividad LDH (% en comparación con el control, considerado como 100%).

El pellet celular se reservó a -80°C para la determinación de índice de peroxidación lipídica.

B) Efecto de los péptidos de pajuro sobre la peroxidación lipídica mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El sistema nervioso central (SNC) es susceptible al ataque de los radicales libres debido al déficit de mecanismos antioxidantes y la alta composición en ácidos grasos poliinsaturados. Motivo por el cual en el modelo celular en estudio se determinó el índice de peroxidación lipídica mediante el contenido de TBARS siguiendo el método descrito por *Jimenez-Aliaga y col*.,[115].

El pellet celular del tratamiento anterior se suspendió en 250 µL de tampón fosfato 50 mM pH 7.4. La suspensión celular se homogenizó y sonicó durante 10 s. A 30 µl del homogenizado, se añadió 250 µL de ácido fosfórico al 1% y 75 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.6%. La mezcla se incubó a 100°C en baño María durante 45 min. Luego, se enfrió en hielo y centrifugó a 3000 g durante 5 min a 4ºC. Se tomaron 150 µL del sobrenadante de cada muestra y se cuantificó la fluorescencia a λexc =485 y λem= 530 ηm en un lector de placas Infinite M200PRO (TECAN). Paralelamente se realizó la curva de calibración utilizando Malondialdehído (MDA) como estándar. Los resultados fueron expresados en µmol de MDA/mg de proteínas.

3.8. Análisis estadístico

Los ensayos realizados se efectuaron por triplicado y expresaron como la media ± error estándar, se efectuó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SigmaPlot 14.5.

CAPITULO IV. RESULTADOS

4.1. Secuencias peptídicas derivadas de pajuro

En la Tabla 8 se presenta la secuencia de los 14 péptidos derivados de *Erythrina edulis* que presentaron mejor perfil antioxidante y potencial multifuncionalidad reportadas por *Intiquilla y col.*[10], que se utilizaron para este trabajo, los cuales fueron obtenidos mediante síntesis química. Se presenta la secuencia de aminoácidos, peso molecular y el grado de pureza, que en todos los casos fue superior al 98%.

Tabla 8. Características de los péptidos sintéticos derivados de *Erythrina edulis*

Péptido	Secuencia	Peso molecular (Dalton)	Pureza %
P1	DGLGYY	687	98.07
P2	AALWE	589	99.89
P3	MFTGPY	715	99.25
P4	YDLHGY	767	99.01
P5	GESWCR	737	98.99
P6	CCGDYY	723	98.05
P7	NGENDWR	890	99.05
P8	TWVV	504	98.89
P9	GSYHDSK	793	99.50
P10	YYLTR	715	99.00
P11	SQLPGW	687	99.74
P12	GPPW	456	99.00
P13	YPSY	529	98.92
P14	SKDAPY	680	99.20

4.2. Determinación de la multifuncionalidad de 14 péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* sobre diferentes dianas farmacológicas relacionadas con el síndrome metabólico

Se evaluó el potencial de 14 péptidos antioxidantes derivados de *Erythrina edulis* como antihipertensivos (inhibición enzimática de ECA), antidiabéticos (inhibición enzimática de α-amilasa, de α-glucosidasa y/o dipeptidil peptidasa IV), e hipolipemiantes (inhibición

de lipasa pancreática) *in vitro* para estos ensayos los péptidos fueron evaluados a una concentración de 100 μM menos para el ensayo de lipasa pancreática que se evaluó a 200 μM.

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos, destacamos la potencial multifuncionalidad de 6 de estos compuestos debido a que presentaron las siguientes actividades: péptido YPSY, actividad antioxidante (ORAC: 3.26 ± 0.21 y ABTS: 1.13 ± 0.06 μmol TE/μmol péptido), inhibición de la enzima DPPIV (IC_{50} = 32.60 ± 1.60 μM), inhibición de la enzima ECA (IC_{50} =115,60 ± 0.26 μM).

El péptido AALWE, actividad antioxidante (ORAC:1.05 ± 0.20 y ABTS: 0.80 ± 0.50 μmol TE/μmol péptido), inhibición de DPPIV (IC_{50} = 130.60 ± 2.34 μM); péptido SQLPGW, actividad antioxidante (ORAC: 2.95 ± 0.24 y ABTS: 0.53 ± 0.01 μmol TE/μmol péptido), inhibición de ECA (IC_{50} =50.50 ± 0.95 μM).

El péptido DGLGYY, actividad antioxidante (ORAC: 3.83 ± 0.19 y ABTS: 0.63 ± 0.04 μmol TE/μmol péptido), inhibición de ECA (IC_{50} =82.60 ± 0.58 μM).

El péptido MFTGPY presentó actividad antioxidante (ORAC: 2.44 ± 0.02 μmol TE/μmol péptido y ABTS: 0.94 ± 0.01 μmol TE/μmol péptido), inhibición de α-glucosidasa (15.79 ± 0.55 %); inhibición de DPPIV (IC_{50} = 214.30 ± 2.83 μM) y el péptido CCGDYY, actividad antioxidante (ORAC: 3.61 ± 0.00 y ABTS: 1.18 ± 0.03 μmol TE/μmol péptido), inhibición de α-amilasa (25.12 ± 0.54 %); inhibición de α-glucosidasa (32.10 ± 0.01 %).

Se destaca a los péptidos derivados de pajuro DGLGYY, YDLHGV, CCGDYY y YPSY con capacidad antioxidante mediante el método ORAC y mediante el método ABTS se destaca a los péptidos MFTGPY, GESWCR, CCGDYY y YPSY. Asimismo, se destaca su multifuncionalidad, estos péptidos derivados de pajuro podrían servir como nuevos ingredientes de alimentos funcionales destinados a la prevención del SM. Sin embargo, para que estos péptidos alcancen órganos diana, para ejercer actividad biológica, es preciso que resistan el proceso de digestión gastrointestinal y que sean absorbidos para alcanzar la circulación sistémica.

Tabla 9. Evaluación de la multifuncionalidad de péptidos sintéticos derivados de semillas de *Erythrina edulis*

Péptidos	ORAC[a] (µmol TE/µmol péptido)	ABTS radical[a] (µmol TE/µmol péptido)	Inhibición ECA (IC_{50} = µM)	Inhibición de DPPIV (IC_{50} = µM)	Inhibición α-glucosidasa (%)	Inhibición α-amilasa (%)	Inhibición lipasa pancreática (%)
DGLGYY*	**3.83 ± 0.19**	0.63 ± 0.04	82.60 ± 0.58	n.d.	n.d.	n.d.	20.9 ± 1.31
AALWE*	1.05 ± 0.20	0.80 ± 0.50	n.d.	130.60 ± 2.34	n.d.	n.d.	18.19 ± 0.98
MFTGPY*	2.44 ± 0.02	**0.94 ± 0.01**	n.d.	214.30 ± 2.83	15.79 ± 0.55	n.d.	12.49 ± 2.01
YDLHGY	**3.59 ± 0.46**	0.64 ± 0.05	n.d.	n.d.	n.d.	10.60 ±0.01	n.d
GESWCR	2.43 ± 0.01	**1.12 ± 0.02**	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d
CCGDYY*	**3.61 ± 0.00**	**1.18 ± 0.03**	n.d.	n.d.	25.12 ± 0.54	32.10 ± 0.01	17.06 ± 1.05
NGENDWR	0.82 ± 0.05	0.13 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d
TWVV	2.27 ± 0.07	0.11 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	24.30 ± 0.01	n.d
GSYHDSK	1.74 ± 0.07	0.23 ± 0.02	n.d.	n.d.	19.57 ± 0.54	n.d	n.d
YYLTR	1.04 ± 0.07	0.40 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d
SQLPGW*	2.95 ± 0.24	0.53 ± 0.01	50.50 ± 0.95	n.d.	n.d.	n.d.	11.63 ± 1.06
GPPW	2.96 ± 0.38	0.26 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d
YPSY*	**3.26 ± 0.21**	**1.13 ± 0.06**	115.60 ± 0.26	32.60 ± 1.60	n.d.	n.d.	15.56 ± 1.35
SKDAPY	1.03 ± 0.13	0.43 ± 0.04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
Control positivo	1.00 -	1.00 -	6.81 ± 0.04	6.80 ± 0.03	62.36 ± 0.54	75.05 ± 1.55	94.62 ± 0.90

[a]resultados reportados por Intiquilla y col. 2019[10]. n.d.: no determinado. El control positivo fue Trolox en la actividad antioxidante ORAC-TE y ABTS, Captopril 0.5 µM en la actividad inhibitoria ECA, Sitagliptina [6 µM] en la actividad inhibitoria DPPIV, Acarbosa 0.5 mM en las actividades inhibitorias α-glucosidasa y α-amilasa, y Orlistat 0.5 µM en la actividad inhibitoria de lipasa pancreática. *Péptidos multifuncionales de pajuro seleccionados para continuar con el siguiente objetivo.

4.3. Análisis de los digeridos gastrointestinales de los péptidos de pajuro *in sílico*

Los péptidos en estudio por su naturaleza aminoacídica son susceptibles a la hidrólisis enzimática por proteasas del tracto gastrointestinal, para evaluar su comportamiento durante este proceso, los 6 péptidos con mejor perfil multifuncional, fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal en el programa PeptideCutter utilizando las proteasas pepsina (digestión gástrica), tripsina y pancreatina (digestión intestinal), de forma secuencial.

En la Tabla 10, se muestran los péptidos sin hidrolizar y los productos de la digestión gástrica e intestinal, los productos finales fueron evaluados en la base de datos BIOPEP para determinar si se mantenía o no la multifuncionalidad inicial. El péptido DGLGYY, en la fase gástrica liberó las secuencias DGLGY, LGYY, GYY, DGLG, DGL y YY, tras la digestión intestinal se obtuvieron DGLG, DGL e YY. Destacando las secuencias activas DGL, LGY y DG para las actividades inhibición de ECA, inmunoestimulante y antioxidante. Para los dipéptidos DG y GL las propiedades de inhibición de ECA y antioxidante y para el dipéptido YY actividades de inhibición de DPPIV y antioxidante. El péptido MFTGPY, producto de la digestión gástrica se obtuvieron FTGPY, MFTGP, TGPY y MF. En la fase intestinal, TGPY, MF, TGP, TGPY, MF. Las secuencias más activas fueron TGPY y MF por la inhibición de DPPIV, mientras que el péptido TGP presentó propiedades de inhibición de ECA, DPPIV y el dipéptido MF como inhibidor de DPPIV.

Con respecto a los péptidos YSPY y SQLPGW fueron digeridos sólo en la fase gástrica. Tras la digestión del primero se liberó el péptido PSY reportado como inhibidor de ECA. Para el segundo en mención, se obtuvieron los péptidos PGW y SQL, que mostraron propiedades como inhibición de ECA y antitrombótico, también se liberó el péptido QL como potencial inhibidor de DPPIV. Para el péptido AALWE, en la fase gástrica se obtuvieron los péptidos AALW, LWE, WE, AAL y AA. En la fase intestinal se obtuvieron los tripéptidos ALW, AAL y dipéptidos LW, WE y AA. Destacando AL como inhibidor de ECA, LW actividad antioxidante, WE y AAL como inhibidores de DPPIV y AA como inhibidor de ECA. El péptido CCGDYY a nivel de la digestión gástrica liberó los péptidos CGDY, CCGD e YY. Para la fase intestinal las secuencias se conservaron como CCGD e YY. Destacando las secuencias GDY y DY como antioxidante e inhibidores de ECA, mientras que el dipéptido YY como antioxidante.

Tabla 10. Análisis del comportamiento de los péptidos bioactivos derivados de semillas de *Erythrina edulis* durante el proceso de digestión gastrointestinal *in silico*

Secuencias de péptidos de Pajuro	Actividad biológica *in sílico* de los péptidos sin digerir	Productos de la digestión		Potenciales sitios activos de los productos de la digestión	Actividad biológica de los productos de digestión *in sílico*
		Digeridos Gástricos[1] Pepsina (Y, F, L)	Digeridos intestinales[1,2] Tripsina (K, R) Quimiotripsina (F, Y, W, M, L)		
DGLGYY (687 Da)	Inhibidor de ECA, DPPIV, Antioxidante y Opioide	DGLGY	DGLGY	DGL	Inhibidor de ECA
		LGYY	n.d	LGY	Inmunoestimulante
		GYY			Antioxidante
		DGLG	DGLG	DG	Inhibidor de ECA
		DGL	DGL	GL	
		YY	YY	YY	inhibidor de DPPIV
					Antioxidante
MFTGPY (715 Da)	Inhibidor de ECA, DPPIV, renina y antitrombótico	FTGPY	TGPY	TGPY	Inhibidor de DPPIV
		MFTGP	MF	MF	
			TGP	TGP	Inhibidor de ECA
		TGPY	TGPY		Inhibidor de DPPIV
		MF	MF	MF	
SQLPGW (687 Da)	Inhibidor de ECA, DPPIV y antioxidante	PGW	PGW	PGW	Inhibidor ECA, Antitrombótico
		SQL	SQL	QL	Inhibidor DPPIV
AALWE (589 Da)	Inhibidor de ECA, DPPIV, renina y antioxidante	AALW	ALW	AL	Inhibidor de ECA
		LWE	LW	LW	Antioxidante
		WE	WE	WE	Inhibidor de DPPIV
		AAL	AAL	AAL	
		AA	AA	AA	Inhibidor ECA
YPSY (529 Da)	Inhibidor de ECA, alfa glucosidasa y DPPIV	PSY	PSY	PSY	Inhibidor de ECA
CCGDYY (723 Da)	Inhibidor de ECA, DPPIV y antioxidante	CCGDY	CCGDY	GD - DY	Antioxidante
		CCGD	CCGD		Inhibidor de ECA
		YY	YY	YY	Antioxidante

[1]Enzima gástrica empleada pepsina (pH:1.3) (EC 3.4.23.1). [2]Enzima intestinal empleada tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina de alta especificidad (EC 3.4.21.1), el análisis fue secuencial. nd: no determinado, basado en las bases de datos BIOPEP y Software PeptiCutter.

Evaluación de la toxicidad de los productos de la digestión gástrica e intestinal de los péptidos de pajuro *in sílico*

Antes de evaluar el efecto protector de los péptidos de pajuro, fue necesario evaluar la toxicidad de las 6 secuencias peptídicas multifuncionales de pajuro. Esto se realizó *in sílico* y en un modelo celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para el análisis de la toxicidad se usó el predictor ToxinPred, que utiliza bases de datos de SwiisProt y TrEMBL para la predicción de la toxicidad, utilizando la herramienta *machine-learning support vector machine* (SVM), discrimina los péptidos tóxicos de aquellos que no lo son, en base a la presencia de residuos aminoacídicos reportado en la literatura

En la tabla 11, se observa los péptidos y los productos obtenidas tras la digestión gastrointestinal, los péptidos de pajuro no resultaron tóxicos. Esta predicción resulta importante ya que permitirá seguir con las próximas evaluaciones *in vitro* a fin de corroborar la predicción de la no toxicidad de los péptidos de pajuro.

Tabla 11. Predicción de la toxicidad de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis in sílico*

Secuencias de péptidos de Pajuro	Predicción ToxinPred	Productos de los digeridos gastrointestinales	Predicción ToxinPred
DGLGYY (687 Da)	No tóxico	DGLGY	No tóxico
		DGLG	
		DGL	
		YY	
MFTGPY (715 Da)	No tóxico	TGPY	No tóxico
		MF	
		TGP	
SQLPGW (687 Da)	No tóxico	PGW	No tóxico
		SQL	
AALWE (589 Da)	No tóxico	ALW	No tóxico
		LW	
		WE	
		AAL	
		AA	
YPSY (529 Da)	No tóxico	PSY	No tóxico
CCGDYY (723 Da)	No tóxico	CCGDY	No tóxico
		CCGD	
		YY	

4.4. Determinación del efecto de los péptidos de pajuro sobre de la viabilidad de células SH-SY5Y

Las células de neuroblastoma SH-SY5Y se trataron con los péptidos de pajuro durante 24 h a las concentraciones 25, 50 y 100 µM, se utilizó como control células que no contenían péptidos. Los resultados se presentan en la Tabla 12, se puede apreciar que los péptidos de pajuro no generaron toxicidad en las condiciones ensayadas.

Tabla 12. Efecto de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* sobre la viabilidad de células SH-SY5Y

	% células viables con relación a las células control en la línea celular SH-SY5Y		
	25 µM	**50 µM**	**100 µM**
Control	100 ± 1.87	100 ± 3.47	100 ± 1.54
MFTGPY	99.99 ± 3.66	100.00 ± 5.10	98.87 ± 0.97
SQLPGW	107.57 ± 5.99	99.99 ± 5.86	101.02 ± 2.19
YPSY	94.56 ± 1.64*	96.75 ± 4.61	98.02 ± 3.44
DGLGYY	100.01 ± 1.83	100.01 ± 2.90	101.78 ± 2.10
AALWE	102.68 ± 3.31	100.00 ± 2.00	103.27 ± 3.48
CCGDYY	105.00 ± 4.81	102.80 ± 5.10	97.15 ± 2.13

**p<0.05, diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Test Student-Newman-Keuls*)

4.5. Generación de un modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ en la línea celular SH-SY5Y

El hierro (Fe) es un microelemento fundamental en el ser humano porque interviene como cofactor de diversas enzimas que participan en diferentes reacciones de oxido reducción por su capacidad de adoptar dos formas iónicas, ferrosa ($Fe^{+2)}$ y/o férrica (Fe^{+3})[116]. La toxicidad del hierro libre está vinculado con su competencia de catalizar la generación de radicales libres vía reacción de Haber-Weiss ($Fe^{3+} + \bullet O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_{2)}$ y la reacción de Fentón ($Fe^{2+}+H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}+OH^- + {}^{\bullet}OH$), siendo potencialmente peligroso porque se induce la producción de EROs provocando incrementa la toxicidad celular y el daño oxidativo de macromoléculas; alterando su estructura y funciones[117].

Con el objeto de replicar este evento, se indujo la liberación de radicales libres por adición de diferentes concentraciones de $FeSO_4$ en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y durante 60 min. En la Figura 10 se representa los resultados obtenidos en URF. Todas las concentraciones probadas incrementaron los radicales libres de forma estadísticamente significativa, para los ensayos posteriores se eligió la concentración del tóxico a 200 µM porque generó un incremento de URF de 57.62 % con respecto a las células control ($p<0.01$).

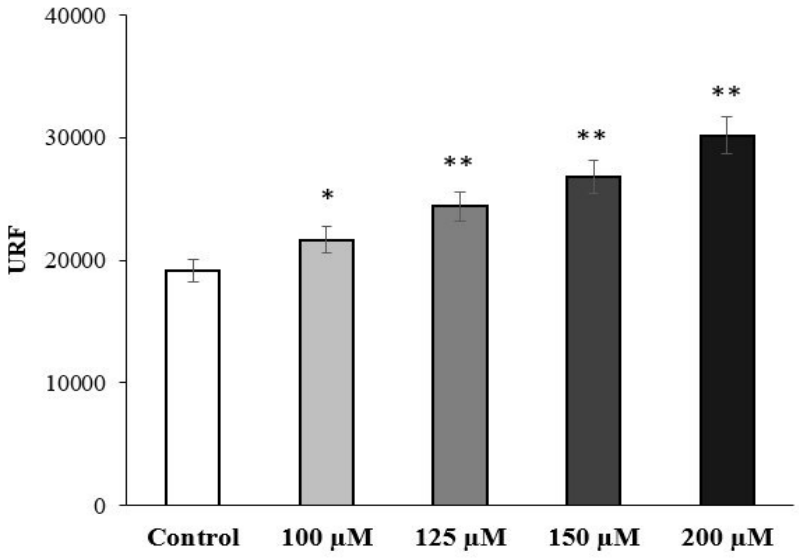


Figura 10. Generación de radicales libres inducido por diferentes concentraciones de $FeSO_4$ en células SH-SY5Y.

*p<0.05 **p<0.001, diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Test Student-Newman-Keuls).

Efecto protector de los péptidos derivados de pajuro sobre la generación de radicales libres inducido por $FeSO_4$ a 200 µM en células SH-SY5Y

Para evaluar el efecto protector, de los péptidos derivados de pajuro, en el modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ a 200 µM, los compuestos se adicionaron a la concentración de 100 µM en medio de tratamiento con FBS 1% durante 3, 6, 12 y 24 h, previo a la adición del tóxico que se trató durante 60 min.

En la figura 11, se presentan los resultados obtenidos expresados en URF, podemos apreciar que la adición del $FeSO_4$ a 200 µM, incrementó la liberación de radicales libres en un rango de 55.48% a 59.61% ($p<0,001$) con respecto a las células control. Todos los péptidos en mayor o menor grado fueron capaces de revertir este incremento, observando un mejor efecto protector a las 3 h de pretratamiento con los péptidos CCGDYY, YPSY y SQLPGW, que lograron contrarrestar la liberación de radicales libres en 76.28, 71.13 y 68.31%, respectivamente, estos resultados fueron similares al efecto del estándar Trólox a la concentración de 100 ηM.

Se observó que el mejor efecto antioxidante de los péptidos se obtuvo a la 3 h de pretratamiento, por tanto, se eligió dicha condición para evaluar el efecto de los péptidos a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 µM) en el mismo modelo de estrés oxidativo. Los resultados se presentan en la Figura. 12, se puede apreciar que el tóxico aumentó la liberación de radicales libres en un 58.69% en relación a las células control ($p<0,001$). Todos los péptidos de pajuro disminuyeron la liberación del radicales libres inducida por el tóxico a las concentraciones ensayadas, siendo los péptidos CCGDYY, YPSY y SQLPGW los que presentaron un mayor efecto protector a la concentración a 100 µM, logrando disminuir la liberación de radicales libres de 76.51, 70.92 y 68.49 %, respectivamente de forma estadísticamente significativa ($p<0.001$). También se puede apreciar un efecto concentración dependiente entre las concentraciones de 25 y 100 µM con una significancia ($p<0.050$).

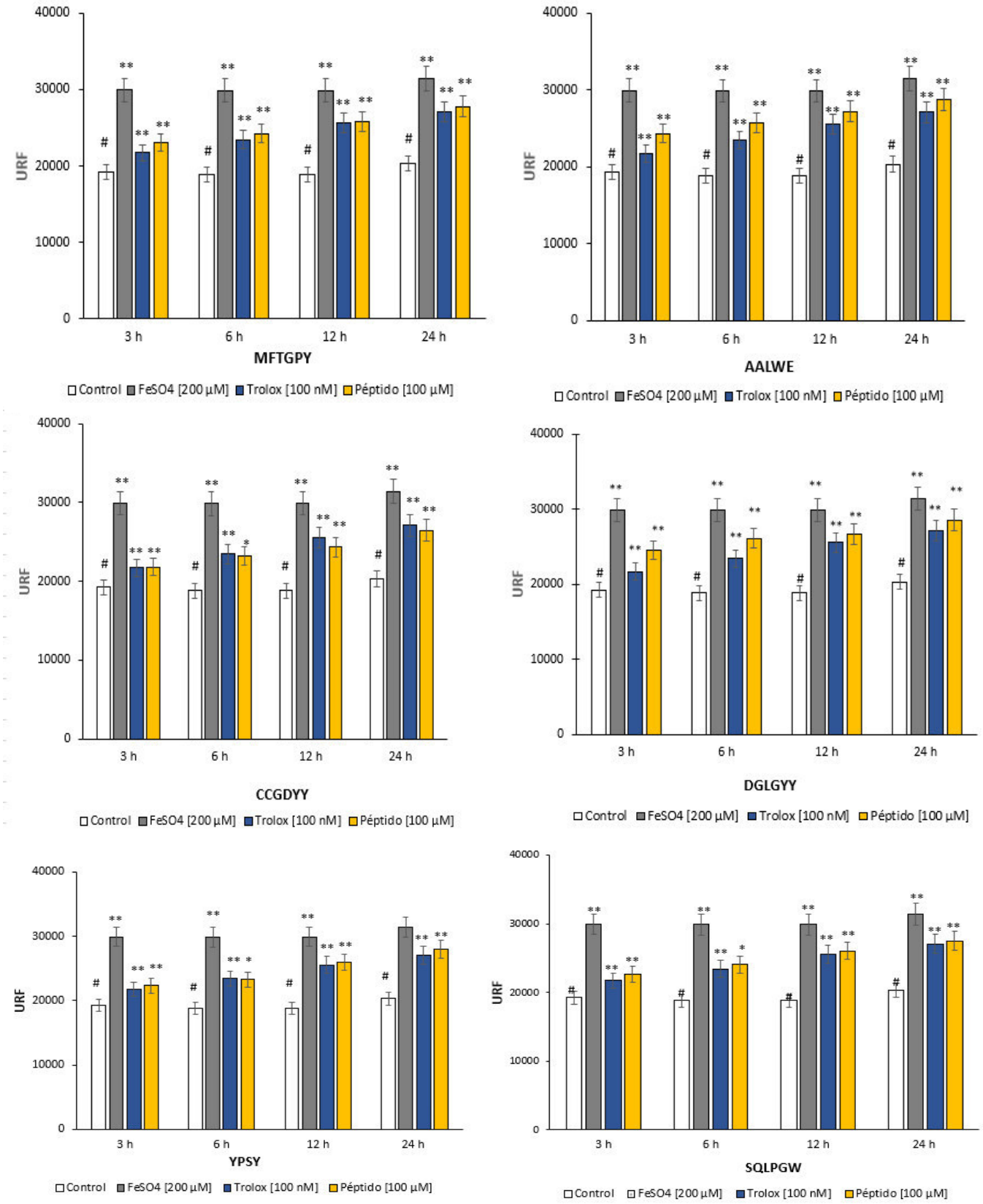


Figura 11. Captación de radicales libres de péptidos derivados de *Erythrina edulis* a diferentes tiempos de exposición frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200µM] en células SH-SY5Y.

*p<0.05 **p<0.001 frente al control # p<0.001 vs $FeSO_4$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Test Student-Newman-Keuls).

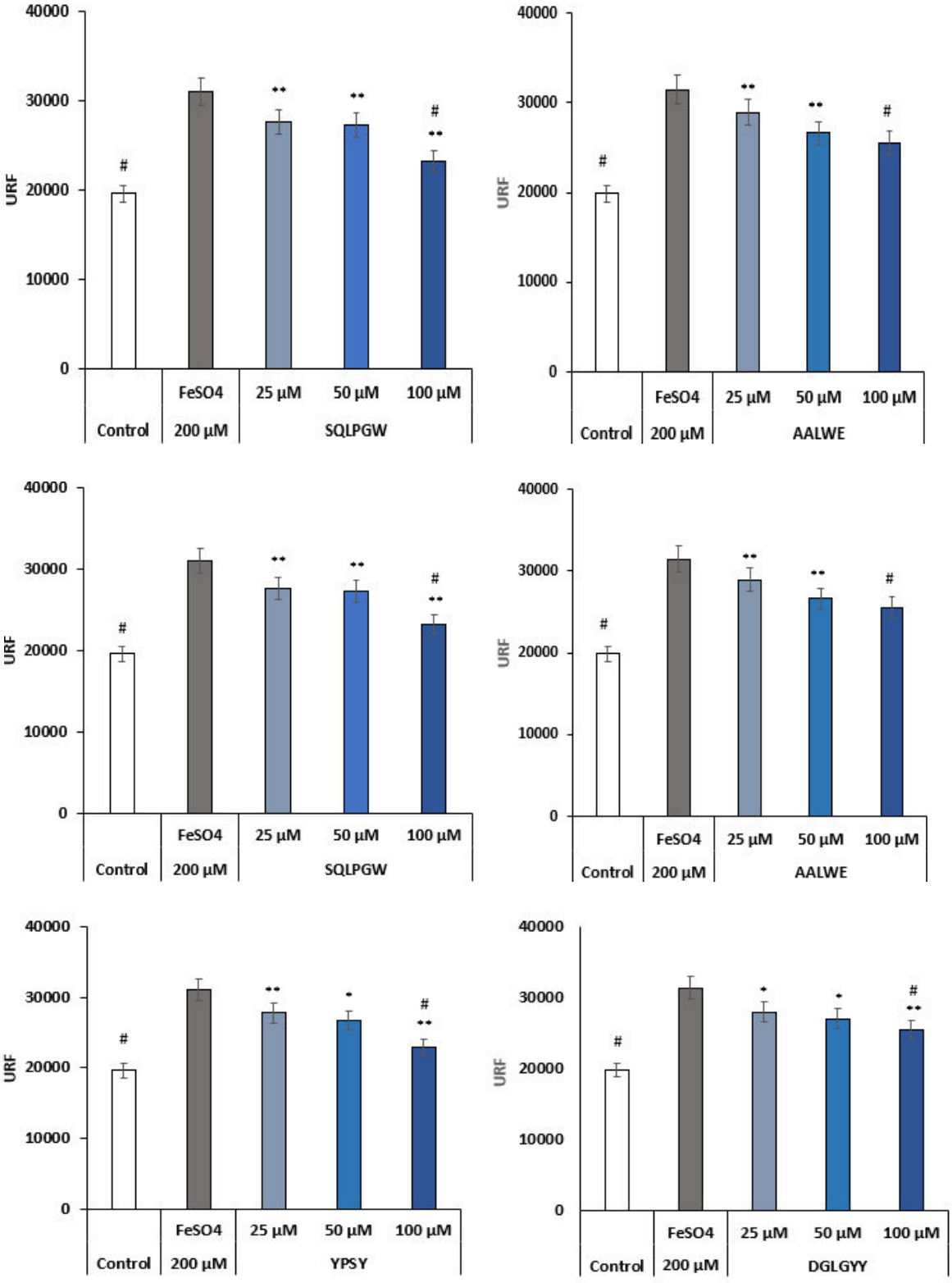


Figura 12. Captación de radicales libres de péptidos derivados de *Erythrina edulis* a diferentes concentraciones frente al estrés oxidativo inducido con FeSO4 [200µM] en células SH-SY5Y.

*p<0.05 **p<0.001, # p<0.001vs $FeSO_4$ diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Test Student-Newman-Keuls).

4.6. Determinación del efecto protector de los péptidos derivados de pajuro frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$

Actividad lactato deshidrogenasa (LDH)

Las células SH-SY5Y se pretrataron, con los péptidos a 100 µM, durante 30 min, transcurrido el tiempo se eliminó el sobrenadante y se adicionó el $FeSO_4$ a 200 µM durante 3 h, la actividad LDH se evaluó en el sobrenadante, en la Figura 13 se presentan los resultados expresados en porcentaje, siendo el 100% la actividad LDH de las células sin tratamiento. La exposición al $FeSO_4$ 200 µM logró incrementar de forma estadísticamente significativa ($p<0.05$) la actividad enzimática, de este biomarcador de muerte celular, en un 49.79 ± 5.22 %, respecto al control, mientras que los péptidos en estudio disminuyeron este efecto incluso por debajo de los niveles basales; destacando el efecto protector de los péptidos YPSY y SQLPGW que lograron disminuir en más del 50% la actividad de LDH en relación a las células control, los resultados fueron similares al efecto mostrado por el Trólox a 100 ηM.

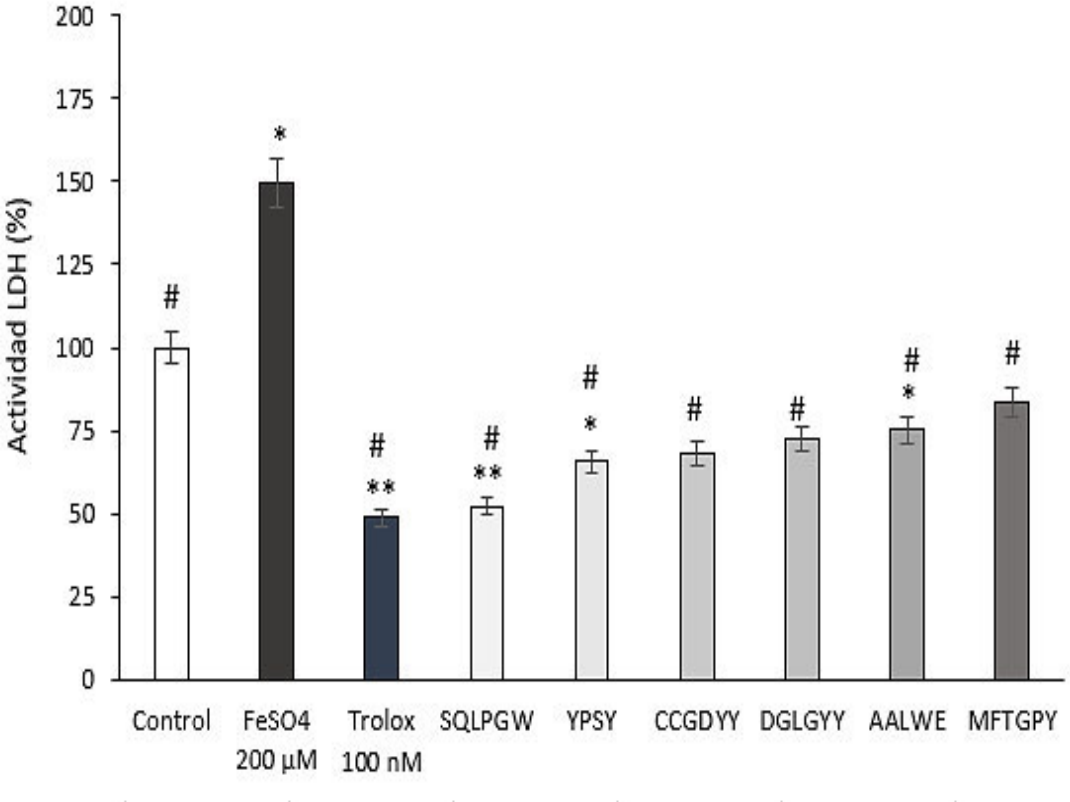


Figura 13. Efecto de los péptidos derivados de *Erythrina edulis* sobre la actividad lactato deshidrogenasa frente al estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200µM] en células SH-SY5Y.

*p<0.05 **p<0.001 frente al control # p<0.001 frente al $FeSO_4$ (Test Student-Newman-Keuls).

Efecto de los péptidos de pajuro sobre la peroxidación lipídica mediante la determinación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre la peroxidación lipídica, se utilizaron los sedimentos del tratamiento indicado anteriormente. En la figura 14, se muestra los niveles de MDA expresados en ηmoles /mg de proteína. El control utilizado fueron las células SH-SY5Y sin tratamiento. Los péptidos MFTGPY y SQLPGW tuvieron mejor actividad inhibitoria de lipoperoxidación en un 53.16 y 50.84 ± 0.90 % respectivamente ($p<0,001$). Los resultados fueron similares al tratamiento con Trólox, usado como estándar, que inhibió en 65.01% ($p<0,001$) los niveles de MDA con relación al $FeSO_4$.

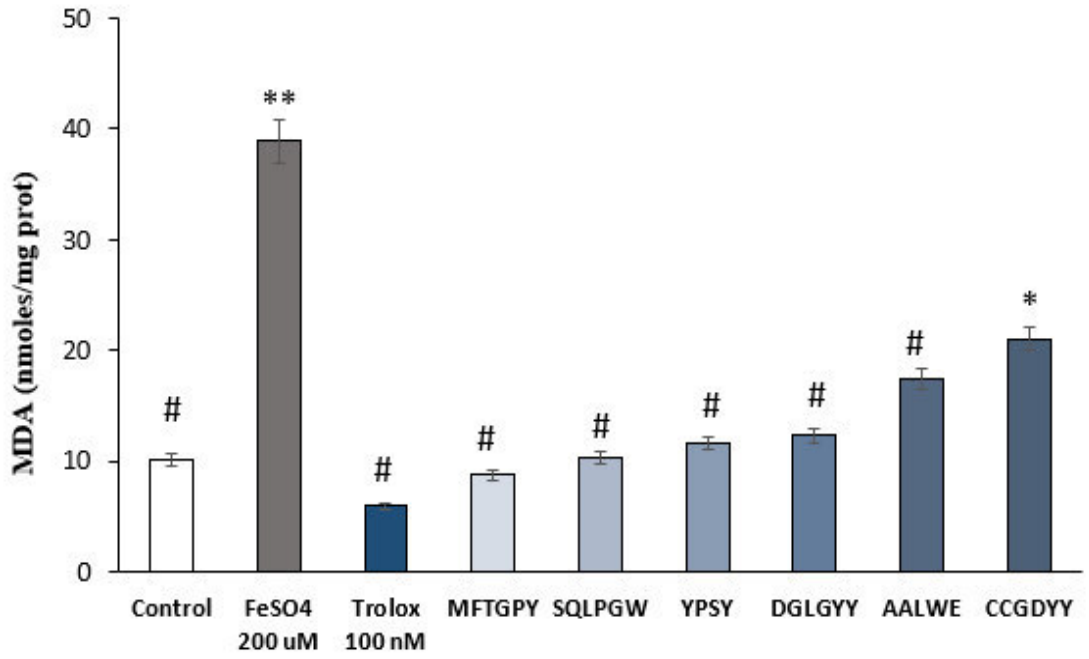


Figura 14. Efecto de péptidos derivados de *Erythrina edulis* sobre los niveles de TBARS durante el estrés oxidativo inducido con $FeSO_4$ [200μM] en células SH-SY5Y

*p<0.05 **p<0.001 frente al control # p<0.001 frente al $FeSO_4$ (Test Student-Newman-Keuls).

CAPITULO V. DISCUSIÓN

El abordaje integral del SM requiere compuestos multifuncionales que sean capaces de interactuar en diferentes dianas terapéuticas, entre ellos los péptidos antioxidantes describen potencial multifuncionalidad que pueden prevenir el SM, posicionándose como una de las estrategias más prometedoras. Una leguminosa subutilizada como *Erythrina edulis* (pajuro) la venimos estudiando desde el 2013, desde la obtención de harina, concentrado, hidrolizado y fracciones proteicas que permitieron la identificación de 30 péptidos con buen perfil antioxidante y mediante diferentes ensayos *in silico* se resaltó el potencial multifuncional de varios péptidos[9,10]. En el presente trabajo, se seleccionaron 14 péptidos con mayor actividad antioxidante, se evaluó la multifuncionalidad y el efecto de los mismos sobre diferentes dianas terapéuticas relacionadas con el SM, se determinó el comportamiento de los péptidos durante la digestión gastrointestinal simulada *in silico* y los péptidos que mostraron mejor perfil multifuncional se profundizó en el estudio del efecto protector en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, por tratarse de células más susceptibles al EO y a los procesos fisiopatológicos que se desencadenan en el SM.

El primer objetivo del trabajo se centró en la evaluación de los 14 péptidos derivados de semillas de pajuro sobre dianas farmacológicas relacionadas con el SM, se determinó el efecto de los péptidos sobre la actividad antihipertensiva, actividad hipolipemiante y actividad antidiabética y actividad antioxidante mediante métodos *in vitro* (Tabla 9).
En relación a la actividad antihipertensiva, el estudio se centró en la búsqueda de péptidos IECA, donde los péptidos derivados de pajuro SQLPGW, DGLGYY e YPSY mostraron buen perfil inhibidor con valores de IC_{50} 50.50 ± 0.95, 82.60 ± 0.58 y 115.60 ± 0.26 µM, respectivamente, estos resultados fueron corroborados mediante modelado molecular *in sílico.* Donde la presencia de residuos de leucina en los péptidos de pajuro favoreció la interacción con el sitio activo (Anexo 3). Una de las características de los IECA, es que pueden formar complejos estables con la enzima, impidiendo el paso de los sustratos de la ECA, como la angiotensina I, a través de hidrógenos y compuestos hidrofóbico[118,119]. Otros autores reportaron péptidos IECA a partir de proteínas de semillas de leguminosas, por ejemplo, en hidrolizados de guisantes con alcalasa se caracterizó dipéptidos IR (IC_{50} = 0.25 mM); KF (IC_{50} =7,23 mM); EF (IC_{50} = 2,98 mM)[66,120]. También, en diferentes variedades de judías se han reportado los péptidos, GLTSK ($IC_{50=}$65,4 µM), LSGNK ($IC_{50=}$130,6 µM), GEGSGA ($IC_{50=}$113,7µM), MPACGSS ($IC_{50=}$191,5 µM) y MTEEY ($IC_{50=}$90,3 µM)[7] y PVNNPQIH ($IC_{50=}$206,7µM) [66,121], con propiedades inhibidoras de

IECA similares a los péptidos de pajuro. En semillas de soya se ha identificado el péptido HHL con potencial multifuncional por presentar actividad IECA (IC_{50} = 155,05 µM), antioxidante y antiinflamatoria[122,123]. Una característica en común de los péptidos IECA es el bajo peso molecular (3 a 12 aminoácidos), esto facilitaría la interacción con el centro activo de ECA y la inhibición competitiva con el ligando endógeno[124]. La presencia de los aminoácidos prolina, triptófano y tirosina, facilitarían la interacción con el centro activo mostrando un potente efecto inhibidor de tipo competitivo[118,119]. En relación al proceso fisiopatológico de la HTA se ha descrito que la angiotensina II está implicada en alteraciones del balance oxidativo estimulando la producción de EROs en tejido vascular y cardiaco[66]. A su vez, un exceso de EROs produce oxidación de macromoléculas dañando estructuras cardiovasculares y alterando los procesos de crecimiento y muerte celular, producción de matriz extracelular y degradación de factores vasodilatadores como el óxido nítrico (ON)[125]. Por tanto, compuestos IECA con propiedades antioxidantes como SQLPGW, DGLGYY e YPSY, podrían ayudar a controlar la HTA y disminuir los efectos deletéreos desencadenados por el EO que contribuye al desarrollo de alteraciones funcionales y estructurales.

El SM debido a la obesidad visceral e insulinorresistencia se asocia a un riesgo aumentado de padecer DM2 por las alteraciones que se generan en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas[25]. Diversos estudios se han centrado en la investigación de nuevos inhibidores de la enzima Dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), la cual es responsable de la hidrólisis e inactivación de las hormonas incretinas péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y péptido insulinotrópico dependiente de la glucosa (GIP))[126,127], las cuales son secretadas en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen intestinal y actúan estimulando la secreción de insulina (glucosa-dependiente) a nivel de las células beta pancreáticas[126]; promoviendo la regularización de los niveles de glucosa en sangre, sin embargo, sus efectos son de corta duración producto de la hidrólisis catalizada por la DPPIV[58,88]. Los péptidos de YPSY AALWE y MFTGPY, derivados de semillas de *Erythrina edulis,* mostraron potencial antidiabético por la inhibición de DPPIV, con valores de IC_{50} de 32.60 ± 1.60, 130.60 ± 2.34 y 214.30 ± 2.83 µM, respectivamente, en este tipo de compuestos se destaca el carácter hidrofóbico y el bajo peso molecular de preferencia de 2 a 8 aminoácidos, siendo característico el residuo de prolina en el extremo N-terminal y la presencia de L, I, V y W en la posición N-terminal, dichos residuos facilitarían la interacción con el centro activo y serian determinantes en la inhibición de la enzima[66,128]. También se analizó interacción de los péptidos de pajuro inhibidores de

DPPIV mediante ensayos *in sílico*. Se resalta la interacción del aminoácido prolina del péptido YPSY con el subsitio S2, que es el más grande y contiene acido glutámico en las posiciones E_{205} - $E_{206,}$ y se encuentran unidos por puentes salinos, motivo por la cual ejercería mayor inhibición que los otros péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* (Anexo3). En la relación a la alteración del metabolismo de carbohidratos, la absorción de los mismos se da por acción de las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa que intervienen en la digestión de los carbohidratos de la dieta, hidrolizando los enlaces α-1,4-glucosídicos liberando oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos para facilitar la absorción a nivel de las microvellosidades intestinales, por ende, compuestos inhibidores de estas enzimas ayudarían a regular los niveles de glicemia. Los péptidos CCGDYY, MFTGPY y GSYHDSK derivados de semillas de *Erythrina edulis,* a una concentración de 100 µM, evidenciaron una ligera inhibición de la enzima α-amilasa con valores porcentuales de 25,1, 15,8 y 19,6%, respectivamente. El mecanismo de acción para la capacidad inhibidora de α-amilasa estaría relacionada con la formación de enlaces de hidrógeno con los residuos catalíticos y de unión al sustrato[127]; la presencia de F, W e Y favorecerían la actividad inhibitoria, sin embargo, no están presentes en los péptidos mencionados a excepción del residuo Y lo cual explicaría la baja actividad encontrada[36,66].

Otra característica del SM es la obesidad periférica que a largo plazo favorece el desarrollo de HTA y DM2. Por ello, compuestos hipolipemiantes serían útiles en el tratamiento de la obesidad, siendo la enzima lipasa pancreática, un blanco terapéutico de interés, debido a que interviene en la digestión intestinal de los triacilgliceroles, hidrolizando los enlaces éster para liberar ácidos grasos que se absorben a nivel de los enterocitos donde se da la formación de los quilomicrones, para su posterior distribución a nivel sistémico, por tanto, la inhibición de esta enzima es clave para limitar la absorción de ácidos grasos y posterior almacenamiento a nivel del tejido adiposo[129,130]. Los péptidos DGLGYY, AALWE Y CCGDYY de pajuro presentaron una ligera inhibición de lipasa pancreática con valores de 20.9 ± 1.31, 18.19 ± 0.98, 17.06 ± 1.05%, respectivamente a la concentración de 200 µM. Los péptidos inhibidores de lipasa pancreática se caracterizan por su carácter hidrofóbico y por la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como A, V, L o K, los cuales impedirían la solubilización micelar del colesterol[105], dificultando el acceso de la lipasa pancreática al sustrato[61].

El EO y el estado de inflamación subclínico es generado por el incremento de citoquininas proinflamatorias y la liberación de ácidos grasos no esterificados favorecen el desarrollo

de las alteraciones metabólicas, dañando a macromoléculas con consecuencias patológicas. Por ende, los compuestos antioxidantes serían clave para controlar las etapas iniciales de la enfermedad. En ese sentido, la evaluación de la actividad antioxidante de los 14 péptidos derivados de semillas de Erythrina edulis se evaluó mediante dos metodologías, mediante el método ORAC, se destaca la actividad antioxidante de los péptidos DGLGYY, CCGDYY y YDLHGY con valores de 3.83 ± 0.19, 3.61 ± 0.00, 3.59 ± 0.46 por µmol TE/µmol péptido y mediante el método de ABTS se resaltan los péptidos CCGDYY, GESWCR y YPSY con valores de TEAC de 1.18 ± 0.03, 1.12 ± 0.02, 1.13 ± 0.06 por µmol TE/µmol péptido (Tabla 9), más adelante detallaremos los aminoácidos relacionados con la actividad en mención. Los compuestos que presentaron mejor perfil antioxidante en ambos métodos fueron YPSY y CCGDYY. Sin embargo, debido a la potencial multifuncionalidad se eligió los péptidos DGLGYY, AALWE, MFTGPY, CCGDYY, SQLPGW e YPSY debido a que además de la actividad antioxidante destacan en otras dianas relacionadas con el SM. La multifuncionalidad de los péptidos puede verse afectada durante la digestión gastrointestinal, porque los compuestos son susceptibles a la hidrólisis de las proteasas gastrointestinales, lo cual ocasiona la pérdida de actividades biológicas, aunque en algunos casos, los péptidos liberados podrían tener mejores propiedades. Debido a ello, la evaluación del comportamiento de los péptidos durante la digestión gastrointestinal es muy importante para predecir su potencial biodisponibilidad.

Como parte del segundo objetivo se evaluó el comportamiento de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* con mejor perfil multifuncional durante en proceso de digestión gastrointestinal *in silico*, para lo cual se utilizó el servidor Peptide Cutter; siguiendo el modelo conceptual de *Schechter & Berger*[108]. Las enzimas utilizadas en el programa informático reconocen e hidrolizan enlaces peptídicos manteniendo la especificidad que se presenta *in vivo*, para pepsina (Y,F,L), tripsina (K,R) y quimiotripsina (F,Y,W,M,L). Tras el proceso *in silico*, se evidenció la liberación de dipéptidos y tripéptidos a lo largo de la digestión gastrointestinal que mantenían el potencial multifuncional (antioxidante, inhibición de la enzima DPPIV y ECA) (Tabla 10). Estudios reportados por *Vermeirssen y col* [131], en péptidos de guisantes sometidos a la digestión gastrointestinal en modelos *in sílico* e *in vitro*, con pepsina y quimiotripsina, reportaron actividad inhibitoria de ECA. En los compuestos más activos, también se evaluó la toxicidad mediante el programa ToxinPred y ninguno de ellos presento toxicidad, tampoco se observó sobre la viabilidad de células de neuroblastoma humano

SH-SY5Y en el rango de 25-100 µM (Tabla 12). Resultados similares fueron reportados por García y col[36], en 10 péptidos sintéticos derivados se semillas de amaranto a una concentración de 100 µM, tanto en ensayos *in silico* como en cultivo de células Caco-2 no evidenciaron toxicidad.

Como parte de nuestro último objetivo, se evaluó el efecto protector en líneas celulares, debido a la alta producción de RL, a consecuencia del EO, acumula metales de transición, que se han descrito como un factor importante que contribuye a la muerte de las células neuronales[86]. Motivo por el cual decidimos establecer un modelo de EO inducido con $FeSO_4$ en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y debido a la susceptibilidad que presentan frente al EO, el ion Fe^{+2} promueve la formación de RL mediante la reacción de Fenton [132]. En el modelo de EO los péptidos en estudio a la concentración de 100 µM se pretrataron durante 3, 6, 12 y 24 h, previo a la adición del $FeSO_4$ a 200 µM que se trató durante 60 min, el tóxico incrementó la liberación de RL en un rango de 55.48% a 59.61% ($p<0,001$) con respecto a las células control. Todos los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* en mayor o menor grado fueron capaces de revertir este incremento, observando mejor efecto protector a las 3 h de pretratamiento con los péptidos CCGDYY, YPSY y SQLPGW, logrando contrarrestar la liberación de radicales libres en 76.28, 71.13 y 68.31%, respectivamente, estos resultados fueron similares al péptido de lunasina [0.5 – 25 µM] en pretratamiento de 3 h redujo la liberación de RL, inducido con H_2O_2 y T-BOOH a las concentraciones de 4 y 3 mM respectivamente en células Caco-2[133]. Por otro lado, Bermejo y col, en el mismo modelo de EO empleado en este estudio, pretrataron las células con el extracto proteico de una microalga (*Spirulina platensis)*, en un rango de concentración del extracto proteico [100, 200 y 500 µg/ml], donde lograron observar el 58.9 % de reducción de EO a una concentración de 500 µg/ml[134]. El modelo de EO permitió generar la liberación de RL a nivel intracelular, por ende, aquellos péptidos que ejerzan efecto protector frente al tóxico deben de ser capaces de atravesar la membrana celular, lo cual depende de la composición aminoacídica, la concentración del compuesto, el tiempo de exposición y la capacidad antioxidante en el entorno intracelular, destacando el efecto protector de los péptidos derivados de semilla de pajuro a 100 µM durante 3 h de pretratamiento[135][136]. Además, se evaluó el efecto de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 µM) en el mismo modelo de EO (Figura. 12), se destaca el efecto protector de CCGDYY, YPSY y SQLPGW a 100 µM, logrando disminuir la liberación de radicales libres de 76.51%,

70.92% y 68.49 %, respectivamente de forma estadísticamente significativa ($p<0.001$) y concentración dependiente entre las concentraciones de 25 y 100 µM con una significancia ($p<0.050$). Asimismo, en el mismo modelo establecido, se determinó la actividad LDH y el índice de lipoperoxidación. El $FeSO_4$ incrementó de forma significativa la actividad LDH, que se considera como biomarcador de muerte celular[137], mientras que los pretratamientos con los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* lograron revertir dicha actividad. En el caso de la secuencia SQLPGW, la reducción fue similar a la ejercida por Trólox 100 nM (Figura 13). De forma similar se ha descrito el efecto de péptidos de amaranto como LQAEQDDR sobre la actividad de la LDH en las células Caco-2 en modelos de EO con H_2O_2[36].

Otro marcador de EO es el índice de lipoperoxidación, en el estudio se determinó las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico expresados como niveles de MDA, el $FeSO_4$ incrementó de forma significativa el contenido de MDA en 3,9 veces en comparación con las células no estresadas, los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* evaluados, disminuyeron los niveles de MDA de forma estadísticamente significativa (Figura 14), lo que indica su potencial protector de las membranas celulares principalmente para los péptidos YPSY, SQLPGW y MFTGPY. De forma similar, Yousr y col[138], utilizaron como tóxico hidroperóxido de terc-butilo tóxico 3 mM (t-BHP) durante 2 h en células Caco-2, el pretratamiento con los péptidos WYGPD, TMFPSA y WIHNENQGF, derivados de la yema de huevo, inhibieron los niveles de MDA (24,2 µg/ml), en comparación con las células tratadas solo con t-BHP (32,2 µg/ml)[132,138].

Tras los resultados obtenidos los péptidos YPSY, SQLPGW y MFTGPY, se destaca la presencia de los aminoácidos aromáticos Y, F y W, compuestos por grupos fenólicos e indolicos que actúan como donadores de hidrógeno y mantienen la estabilidad molecular de los RL[98,124]. La ubicación de los aminoácidos como W, M, y Y en el extremo C-terminal también favorecerían la actividad antioxidante debido a la conformación estructural de resonancia que mejora la capacidad captadora de RL[36,66]. *Ketnawa y col*,[139] mencionan la importancia de los aminoácidos L, P, Y y T poseen alta capacidad de neutralización de RL a través de la transferencia de electrones logrando quelar iones metálicos prooxidantes. Por tanto, las propiedades de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* están relacionados con su composición, estructura e hidrofobicidad evidenciando multifuncionalidad, efecto protector y potencial biodisponibilidad que podrían ayudar a disminuir el desarrollo fisiopatológico del SM reduciendo la incidencia de DM2, HTA, ECV entre otras enfermedades.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

1. Se evaluó la actividad farmacológica de 14 péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* sobre diferentes dianas terapéuticas relacionadas con el SM, se seleccionaron 6 de los péptidos que describieron mejor perfil multifuncional. Así tenemos, YPSY (actividad antioxidante, inhibidora de DPPIV y ECA), AALWE (actividad antioxidante e inhibidora de DPPIV), CCGDYY (actividad antioxidante e inhibidora de DPPIV), SQLPGW (actividad antioxidante e inhibidora de ECA), DGLGYY (actividad antioxidante e inhibidora de ECA), MFTGPY (actividad antioxidante e inhibidora de DPPIV).
2. Se determinó el comportamiento de los 6 péptidos multifuncionales elegidos durante el proceso de digestión gastrointestinal *in sílico*, simulando condiciones fisiológicas, dichos péptidos a pesar de ser susceptibles a la hidrólisis enzimática con pepsina, tripsina y/o quimotripsina, liberaron péptidos que mantenían su potencial multifuncional sobre el SM.
3. La evaluación de la toxicidad de los 6 péptidos multifuncionales seleccionados no presentó ningún efecto en modelos *in sílico*, tampoco mostraron ningún efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y a las concentraciones 25 a 100 µM y durante 24 h de tratamiento, los resultados fueron similares a las células control.
4. Se estableció un modelo de estrés oxidativo inducido por $FeSO_4$ en la línea celular SH-SY5Y, donde el pretratamiento con los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* multifuncionales a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, en mayor o menor grado, evidenciaron su capacidad de atravesar la membrana celular y proteger frente al estrés oxidativo inducido por el tóxico. Los péptidos seleccionados también fueron capaces de revertir el incremento de la actividad lactato deshidrogenasa y los niveles de lipoperoxidación lipídica inducidos por $FeSO_4$, destacando el efecto protector de los péptidos YPSY, SQLPGW y MFTGPY.
5. Se concluye que los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* YPSY, SQLPGW y MFTGPY, presentan buen perfil multifuncional, potencial biodisponibilidad y capacidad de protección frente al EO inducido por $FeSO_4$, por tanto, podrían servir como ingredientes de alimentos funcionales destinados a la prevención del SM.

CAPITULO VII. RECOMENDACIONES

- Identificar y elucidar el mecanismo de acción y su comportamiento de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* multifuncionales en el organismo, mediante modelamiento y técnicas bioinformáticas.
- Desarrollar el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y caracterizar la multifuncionalidad de los digeridos gastrointestinales obtenidos.
- Encapsular los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* más activos a fin de mejorar la resistencia gastrointestinal.
- Evaluar la biodisponibilidad de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* mediante modelos *in vivo*.
- Identificar y elucidar el mecanismo de acción y su comportamiento de los péptidos derivados de semillas de *Erythrina edulis* multifuncionales de pajuro en el organismo.

CAPITULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Saklayen M. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. Curr Hypertens Rep2018;20(2).

2. Spahis S, Borys JM, Levy E. Metabolic Syndrome as a Multifaceted Risk Factor for Oxidative Stress. Antioxid Redox Signal2017;26(9):445–61.

3. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact2006;160(1):1–40.

4. González-Montoya M, Hernández-Ledesma B, Silván JM, Mora-Escobedo R, Martínez-Villaluenga C. Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. Food Chem [Internet] 2018;242(October):75–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.035

5. Indiano-Romacho P, Fernández-Tomé S, Amigo L, Hernández-Ledesma B. Multifunctionality of lunasin and peptides released during its simulated gastrointestinal digestion. Food Research International [Internet] 2019;125(June):108513. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108513

6. Moreno-Valdespino CA, Luna-Vital D, Camacho-Ruiz RM, Mojica L. Bioactive proteins and phytochemicals from legumes: Mechanisms of action preventing obesity and type-2 diabetes. Food Research International2020;130.

7. Luna-Vital D, Liang K, González de Mejía E, Loarca-Piña G. Dietary peptides from the non-digestible fraction of Phaseolus vulgaris L. decrease angiotensin II-dependent proliferation in HCT116 human colorectal cancer cells through the blockade of the renin–angiotensin system. Food Funct 2016;7(5):2409–19.

8. Moreno C, Mojica L, González de Mejía E, Camacho Ruiz RM, Luna-Vital DA. Combinations of Legume Protein Hydrolysates Synergistically Inhibit Biological Markers Associated with Adipogenesis. Foods 2020;9(11):1678.

9. Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Zavaleta AI, Arnao I, Peña C, Chavez-Hidalgo EL, et al. Erythrina Edulis (Pajuro) Seed Protein: A New Source of Antioxidant Peptides. Nat Prod Commun [Internet] 2016;11(6):1934578X1601100. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100620

10. Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Guzmán F, Álvarez CA, Zavaleta AI, Izaguirre V, et al. Novel antioxidant peptides obtained by alcalase hydrolysis of Erythrina edulis (pajuro) protein. J Sci Food Agric 2019;99(5):2420–7.

11. Xue Z, Wen H, Zhai L, Yu Y, Li Y, Yu W, et al. Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (Cicer arietinum L.). Food Research International 2015;77:75–81.

12. Pownall Trisha, Udenigwe Chibuike, Aluko Rotimi. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (Pisum sativum L.) Enzymatic protein hydrolysate fractions. J Agric Food Chem 2010;58(8):4712–8.

13. Mojica L, Luna-Vital D, González de Mejía E. Characterization of peptides from common bean protein isolates and their potential to inhibit markers of type-2 diabetes, hypertension and oxidative stress. J Sci Food Agric 2017;97(8):2401–10.

14. Oseguera-Toledo M., Gonzalez de Mejia E, Amaya-Llano S. Hard-to-cook bean (Phaseolus vulgaris L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. Food Research International 2015;76:839–51.

15. Jakubczyk A, Karaś M, Złotek U, Szymanowska U. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (Phaseolus vulgaris L.) seeds. Food Research International 2017;100:489–96.

16. Lule V, Garg S, Pophaly S, Tomar S. Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide. J Food Sci 2015;80(3):C485–94.

17. Fernández-Tomé S, Sanchón J, Recio I, Hernández-Ledesma B. Transepithelial transport of lunasin and derived peptides: Inhibitory effects on the gastrointestinal cancer cells viability. Journal of Food Composition and Analysis 2018;68:101–10.

18. Solano E. Modelo de digestión gastrointestinal *in vitro* para la obtención de fracciones peptídicas antioxidantes y quelantes de metales a partir de las semillas de *Erythrina edulis* [Internet]. UNMSM2017;Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12672/8225

19. Garcés M. Hidrolizados de proteína de huevo como nuevos ingredientes funcionales frente al sindrome metabolico y sus complicaciones [Internet]. 2013;Available from: http://hdl.handle.net/10486/660410

20. Alberti K, Eckel R, Grundy S., Zimmet P, Cleeman J, Donato K, et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. Circulation 2009;120(16):1640–5.

21. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Programa de Enfermedades No Transmisibles y Transmisibles 2019. [Internet]. Lima: 2019 [cited 2021 Dec 14]. Available from: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1734/cap01.pdf

22. Ellulu MS. Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms. Inflammopharmacology 2017;25(3):313–28.

23. Moreno S. Hidrolizados de proteínas de huevo para controlar el síndrome metabólico y sus complicaciones asociadas. [Internet]. 2018;Available from: http://hdl.handle.net/10486/686088

24. Muñoz AM, Bedoya G, Velásquez C. An approach to the etiology of metabolic syndrome. Colomb Med 2013;57–63.

25. Bautista S. Obtención de un ingrediente multifuncional a partir de lenteja mediante fermentación e hidrolisis enzimática a pH controlado dirigido al control del síndrome metabólico. 2018;

26. Engin A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. 2017. page 305–26.

27. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? British Journal of Nutrition 2008;100(2):227–35.

28. Lafontan M. Adipose tissue and adipocyte dysregulation. Diabetes Metab 2014;40(1):16–28.

29. Grundy SM. Metabolic syndrome update. Trends Cardiovasc Med [Internet] 2016;26(4):364–73. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050173815002492

30. Schrover I, Spiering W, Leiner T, Visseren F. Adipose Tissue Dysfunction: Clinical Relevance and Diagnostic Possibilities. Hormone and Metabolic Research 2016;48(04):213–25.

31. Badimon L, Cubedo J. Adipose tissue depots and inflammation: effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. Cardiovasc Res 2017;113(9):1064–73.

32. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. Trends Pharmacol Sci 2015;36(7):461–70.

33. Wada J, Nakatsuka A. Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. Acta Med Okayama 2016;70(3):151–8.

34. Castro JP, Grune T, Speckmann B. Review Open Access The two faces of reactive oxygen species (ROS) in adipocyte function and dysfunction. Biol Chem 2016;397(8):709–24.

35. Intiquilla A. Potencial neuroprotector de péptidos obtenidos mediante hidrolisis enzimática de las proteínas solubles aisladas de las semillas de lupinus mutabilis (tarwi) [Internet]. 2018;Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12672/8045

36. García S. Evaluación de aislado proteico de amaranto como fuente de péptidos antioxidantes: estudios in vitro e in vivo [Internet]. 2019;Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/78721

37. Orsini M. Amaranto como ingrediente funcional: propiedades antioxidantes de proteínas y péptidos [Internet]. 2015;Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46175

38. Saracho V. Evaluación de la capacidad antioxidante asociada a péptidos bioactivos derivados de leches fermentadas con cepas de lactococcus lactis aisladas de diferentes ecosistemas [Internet]. 2011;Available from: http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/175

39. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantication. Toxicologic Pathology 2002;30(6):620–50.

40. Ramírez M, Gomez L. Influencia de la deficiencia de hierro sobre los niveles de estrés oxidativo en ratas Wistar hembra y macho en diferentes grupos etáreos [Internet]. 2013;Available from: http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/13913

41. Cordova A, Ruiz C, Cordova A, Guerra J, Rodriguez E, Arancibia K. Oxidative stress and antioxidants in the spermatica conservation. Ciencias Veterinarias 2009;3(1):01–38.

42. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quanti cation. Toxicol Pathol 2002;30(6):620–50.

43. Deicher R, Hörl W. New insights into the regulation of iron homeostasis. Eur J Clin Invest 2006;36(5):301–9.

44. Membrillo A, Córdova A, Valencia J de Jesús, Hicks JJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. 2003;28(12):699–704.

45. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 2011;283(2–3):65–87.

46. González del pozo I. Biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en el paciente con hipertrofia cardiaca: estudio observacional . 2019;

47. Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, López-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Pérez M, et al. Oxidative Stress Caused by Ozone Exposure Induces Loss of Brain Repair in the Hippocampus of Adult Rats. Toxicological Sciences 2010;113(1):187–97.

48. Pryor W. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environ Health Perspect 1997;105(suppl 4):875–82.

49. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organization Journal 2012;5(1):9–19.

50. Aw TY. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. Am J Clin Nutr 1999;70(4):557–65.

51. Guadalupe B, Pérez-Fuentes R, Zamora-Ginez I, Torres E. Síndrome Metabólico y su relación con estrés oxidativo. 2011;Available from: https://www.researchgate.net/publication/319403475

52. García-Ruiz E, Reynés B, Díaz-Rúa R, Ceresi E, Oliver P, Palou A. The intake of high-fat diets induces the acquisition of brown adipocyte gene expression features in white adipose tissue. 2015;Available from: DOI: 10.1038/ijo.2015.112

53. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2017;1863(5):1066–77.

54. Jankovic A, Korac A, Buzadzic B, Otasevic V, Stancic A, Daiber A, et al. Redox implications in adipose tissue (dys)function—A new look at old acquaintances. Redox Biol 2015;6:19–32.

55. Li L, Li J. Oxidative stress and insulin resistance. Chinese medical sciences journal 2007;22(4):254–9.

56. Mujica A, Chira E, Moscoso G, Vignalde N. Innovaciones tecnológicas en los cultivos andinos conseguidas en la última década. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria 2021;109–20.

57. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Effect of digestion on bioavalability of peptides with biological activity | Efecto de la digestión en la biodisponibilidad de péptidos con actividad biológica. Revista Chilena de Nutricion 2010;37(3):386–91.

58. Torruco J, Chel L, Betancur D. Funcionalidad biológica de péptidos bioactivos [Internet]. Madrid: 2012. Available from: https://www.bookdepository.com/es/Funcionalidad-Biologica-de-Peptidos-Bioactivos-Juan-Torruco-Uco/9783659009181

59. McCarthy AL, O'callaghan YC, O'brien NM. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops-Bioactivity and Potential for Functional Food Development. Agriculture [Internet] 2013;3:112–30. Available from: www.mdpi.com/journal/agricultureArticle

60. Adler-Niessen J. Enzyme in Food Processing. In: Proteases. Tercera edición. San Diego: 1993.

61. Palma C. Evaluacion de la multifuncionalidad de hidrolizados de la fracción de albumina de Erythrina edulis [Internet]. 2020;Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12672/16093

62. Guadix A, Guadix E, Paez- Dueñas M, González- Tello P. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. Ars Farm 2000;79–89.

63. Sanjukta S, Rai AK. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. Trends Food Sci Technol 2016;50:1–10.

64. Ferri M, Serrazanetti DI, Tassoni A, Baldissarri M, Gianotti A. Improving the functional and sensorial profile of cereal-based fermented foods by selecting Lactobacillus plantarum strains via a metabolomics approach. Food Research International 2016;89:1095–105.

65. Yamamoto N, Akino A, Takano T. Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from Lactobacillus helveticus CP790. J Dairy Sci 1994;77(4):917–22.

66. Vilcacundo R. Liberación de péptidos multifuncionales durante la digestion gastrointestinal simulada de proteínas de quinua (Chenopodium quinoaWild.) y amaranto(Amaranthus caudatus) [Internet]. 2017;Available from: http://hdl.handle.net/10486/683691

67. Hernández-Ledesma B, Miguel M, Amigo L, Aleixandre MA, Recio I. Effect of simulated gastrointestinal digestion on the antihypertensive properties of synthetic β-lactoglobulin peptide sequences. Journal of Dairy Research 2007;74(3):336–9.

68. Shimizu M. Food-derived peptides and intestinal functions. BioFactors 2004;21(1–4):43–7.

69. Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V, Denis S, Blanquet-Diot S, Alric M. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends Biotechnol 2012;30(11):591–600.

70. Matsui T, Yukiyoshi A, Doi S, Sugimoto H, Yamada H, Matsumoto K. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. J Nutr Biochem 2002;13(2):80–6.

71. Miguel M, Aleixandre MA, Ramos M, López-Fandiño R. Effect of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Antihypertensive Properties of ACE-Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin. J Agric Food Chem 2006;54(3):726–31.

72. Diaz de la Cruz S. Estudios bibliografico y experimental sobre la biodisponibilidad y bioactividad de péptidos de leguminosas. 2020;

73. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. Biotechniques 2000;28(6):1102, 1104.

74. Martínez Villaluenga C. Nuevas Aproximaciones al Desarrollo de Ingredientes Multifuncionales Dirigidos al Control Del Síndrome Metabólico [Internet]. Available from: www.ictan.csic.es

75. Jakubczyk A, Karaś M, Złotek U, Szymanowska U. Identification of potential inhibitory peptides of enzymes involved in the metabolic syndrome obtained by simulated gastrointestinal digestion of fermented bean (Phaseolus vulgaris L.) seeds. Food Research International 2017;100:489–96.

76. Holst JJ, Deacon CF. Glucagon-like peptide 1 and inhibitors of dipeptidyl peptidase IV in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Curr Opin Pharmacol 2004;4(6):589–96.

77. Caron J, Domenger D, Dhulster P, Ravallec R, Cudennec B. Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. Food Research International 2017;92:113–8.

78. el Abed H, Chakroun M, Fendri I, Makni M, Bouaziz M, Drira N, et al. Extraction optimization and in vitro and in vivo anti-postprandial hyperglycemia effects of inhibitor from Phoenix dactylifera L. parthenocarpic fruit. Biomed Pharmacother 2017;88:835–43.

79. Aguirre A, Abanto N, Acosta I, Carranza D, Cordova D, Plasencia J. Aplicación clínica de los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV en diabetes mellitus tipo 2. Revista Medica de Trujillo 2021;16(4).

80. Oseguera Toledo ME, González de Mejía E, Sivaguru M, Amaya-Llano SL. Common bean (Phaseolus vulgaris L.) protein-derived peptides increased insulin secretion, inhibited lipid accumulation, increased glucose uptake and reduced the phosphatase and tensin homologue activation in vitro. J Funct Foods 2016;27:160–77.

81. Carrasco-Castilla J, Hernández-Álvarez AJ, Jiménez-Martínez C, Jacinto-Hernández C, Alaiz M, Girón-Calle J, et al. Antioxidant and metal chelating activities of Phaseolus vulgaris L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. Food Chem 2012;131(4):1157–64.

82. Mojica L, de Mejía EG. Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (Phaseolus vulgaris L.) proteins, their characterization and biological potential. Food Funct 2016;7(2):713–27.

83. Zhang H, Duan Y, Feng Y, Wang J. Transepithelial transport characteristics of the cholesterol- Lowing soybean peptide, WGAPSL, in Caco-2 cell monolayers. Molecules 2019;24(15).

84. Karami Z, Akbari-adergani B. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. J Food Sci Technol [Internet] 2019;56(2):535–47. Available from: https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4

85. García-Nebot MJ, Recio I, Hernández-Ledesma B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. Food and Chemical Toxicology 2014;65:155–61.

86. Hernández-Ledesma B, Hsieh C, De Lumen B. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. Biochem Biophys Res Commun [Internet] 2009;390(3):803–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.053

87. Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J Sci Food Agric 2000;80(13):1925–41.

88. Campos-Segura M, Guerrero L, Betancur D. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. OmniaSciencie 2013. Mexico: OmniaScience; 2013.

89. Goya L, Martin M, Ramos S, Mateos R, Bravo L. A Cell Culture Model for the Assessment of the Chemopreventive Potential of Dietary Compounds. Curr Nutr Food Sci 2009;5(1):56–64.

90. Uysal O, Sevimili T, Gunes S. Cell and Tissue Culture : The Base of Biotechnology. Elsevier Inc. Omics Technologies and Bio-engineering; 2018.

91. Ríos J. Desarrollo de un modelo experimental in vitro con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y para la evaluación de la toxicidad [Internet]. 2003;Available from: https://idus.us.es/handle/11441/72698#.

92. Carrera I, Cacabelos R. Current Drugs and Potential Future Neuroprotective Compounds for Parkinson's Disease. Curr Neuropharmacol 2019;17(3):295–306.

93. Escamilo Cárdenas S. El Pajuro (Erythrina edulis) alimento andino en extinción. Investigaciones Sociales 2014;16(28):97–104.

94. Intiquilla A. Evaluación de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de hidrolizados proteínicos obtenidos a partir de semillas de Erythrina edulis [Internet]. 2015;Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12672/4598

95. Acero LE, Bernal H. Guía para el cultivo y aprovechamiento del Chachafruto o Balú: Erythrina edulis triana ex micheli. Bogotá: Convenio Andrés Bello; 2000.

96. Delgado-Soriano V, Cortés-Avendaño P, Guevara-Pérez A, Vílchez-Perales C. Características físico-químicas de las semillas de pajuro (Erythrina edulis Triana) y propiedades funcionales después de la extrusión. Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research 2020;22(3):263–73.

97. FAO. Cereales, Legumbres, Leguminosas y Productos Proteínicos Vegetales. primera. Roma: 2007.

98. Hernández-Ledesma B, Dávalos A, Bartolomé B, Amigo L. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. J Agric Food Chem 2005;53(3):588–93.

99. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999;26(9–10):1231–7.

100. Sigma A. Manual del kit DPPIV_SIGMA [Internet]. 2020 [cited 2020 Jan 23];Available from: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/2/mak203bul.pdf.

101. Liu S, Yu Z, Zhu H, Zhang W, Chen Y. In vitro α-glucosidase inhibitory activity of isolated fractions from water extract of Qingzhuan dark tea. BMC Complement Altern Med 2016;16(1):378.

102. Johnson MH, Lucius A, Meyer T, Gonzalez de Mejia E. Cultivar Evaluation and Effect of Fermentation on Antioxidant Capacity and *in Vitro* Inhibition of α-Amylase and α-Glucosidase by Highbush Blueberry (*Vaccinium corombosum*). J Agric Food Chem 2011;59(16):8923–30.

103. Bello G, Carrera E, Diaz Y. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba 2006;XL(2).

104. Subramanian R, Asmawi MZ, Sadikun A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of Andrographis paniculata extract and andrographolide. Acta Biochim Pol 2008;55(2):391–8.

105. Gupta N, Rathi P, Gupta R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. Anal Biochem 2002;311(1):98–9.

106. Dolenc A, Govedarica B, Dreu R, Kocbek P, Srčič S, Kristl J. Nanosized particles of orlistat with enhanced in vitro dissolution rate and lipase inhibition. Int J Pharm 2010;396(1–2):149–55.

107. Hayakari M, Kondo Y, Izumi H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. Anal Biochem 1978;84(2):361–9.

108. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. page 571–607.

109. Keil B. Specificity of Proteolysis. In: Specificity of Proteolysis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992. page 7–18.

110. Keil B. Proteolysis Data Bank: specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages. Protein Seq Data Anal 1987;1(1):13–20.

111. Schechter I, Berger A. On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. Biochem Biophys Res Commun 1968;32(5):898–902.

112. Minkiewicz, Iwaniak, Darewicz. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. Int J Mol Sci 2019;20(23):5978.

113. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava PS. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. PLoS One 2013;8(9).

114. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 1992;5(2):227–31.

115. Jiménez-Aliaga K, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Martín-Aragón S. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells. Life Sci 2011;89(25–26):939–45.

116. Silva M, Bonomo L de F, Oliveira R de P, Geraldo de Lima W, Silva ME, Pedrosa ML. Effects of the interaction of diabetes and iron supplementation on hepatic and pancreatic tissues, oxidative stress markers, and liver peroxisome proliferator-activated receptor-α expression. J Clin Biochem Nutr 2011;49(2):102–8.

117. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. J Mol Biol 2000;304(1):55–68.

118. Shahidi F, Zhong Y. Bioactive Peptides. AOAC International [Internet] 2019;91(4):914–31. Available from: https://doi.org/10.1093/jaoac/91.4.914

119. Iwaniak A, Piotr M. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. Acta SciPol Technol Aliment 2007;6(3):5–15.

120. Li H, Aluko R. Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. J Agric Food Chem 2010;58(21):11471–6.

121. Rui X, Boye J, Simpsons B, prasher S. Purification and characterization of angiotensinI-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (Phaseolus vulgaris) hydrolysates. J Funct Foods 2013;5(3):1116–24.

122. Vernaza M, Dia V, Gonzalez de Mejia E, Chang Y. Antioxidant and antiinflammatory properties of germinated and hydrolysed Brazilian soybean flours. Food Chem 2012;134(4):2217–25.

123. Boschin G, Scigliuolo G, Resta D, Arnoldi A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. Food Chem 2014;145:34–40.

124. Hernández-Ledesma B, Amigo L, Recio I, Bartolomé B. ACE-Inhibitory and Radical-Scavenging Activity of Peptides Derived from β-Lactoglobulin f(19−25). Interactions with Ascorbic Acid. J Agric Food Chem 2007;55(9):3392–7.

125. Briones AM, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. Curr Hypertens Rep 2010;12(2):135–42.

126. Bleakley S, Hayes M, O' Shea N, Gallagher E, Lafarga T. Predicted Release and Analysis of Novel ACE-I, Renin, and DPP-IV Inhibitory Peptides from Common Oat (Avena sativa) Protein Hydrolysates Using in Silico Analysis. Foods 2017;6(12):108.

127. Caron J, Domenger D, Dhulster P, Ravallec R, Cudennec B. Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. Food Research International 2017;92.

128. González-Montoya M, Hernández-Ledesma B, Silván JM, Mora-Escobedo R, Martínez-Villaluenga C. Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. Food Chem 2018;242:75–82.

129. Grundy S. Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome. Journal of Investigative Medicine 2016;64(6):1082–6.

130. Hosseinpour-Niazi S, Mirmiran P, Sohrab G, Hosseini-Esfahani F, Azizi F. Inverse association between fruit, legume, and cereal fiber and the risk of metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study. Diabetes Res Clin Pract 2011;94(2):276–83.

131. Vermeirssen V, van der Bent A, van Camp J, van Amerongen A, Verstraete W. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. Biochimie 2004;86(3):231–9.

132. Palma-Albino C, Intiquilla A, Jiménez-Aliaga K, Rodríguez-Arana N, Solano E, Flores E, et al. Albumin from Erythrina edulis (Pajuro) as a Promising Source of Multifunctional Peptides. Antioxidants 2021;10(11):1722.

133. García-Nebot MJ, Recio I, Hernández-Ledesma B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. Food and Chemical Toxicology 2014;65(December 2013):155–61.

134. Bermejo-Bescós P, Piñero-Estrada E, Villar del Fresno ÁM. Neuroprotection by Spirulina platensis protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. Toxicology in Vitro 2008;22(6):1496–502.

135. Ettcheto Arriola M. Efecto del síndrome metabólico provocado por una dieta rica en grasa en ratones APPswe/PS1dE9, modelo experimental de la enfermedad de Alzheimer, y posibles terapias farmacológicas [Internet]. TDX (Tesis Doctoral en Xarxa)2018;Available from: http://www.tesisenred.net/handle/10803/565535

136. González-Sarrías A, Núñez-Sánchez M, Tomás-Barberán F, Espín J. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. J Agric Food Chem 2017;65(4):752–8.

137. Orsini M, Añon M, Tironi V. Péptidos antioxidantes derivados de la digestión gastrointestinal de proteínas de amaranto: Una primera aproximación a la evaluación de su absorción intestinal y posterior actividad. Revista del laboratorio tecnológico de Uruguay [Internet] 2016;11:18–26. Available from: http://ojs.latu.org.uy/revistadellaboratoriotecnológicodeluruguay.

138. Yousr M, Aloqbi A, Omar U, Howell NK. Antioxidant Effect of Egg Yolk Peptides against Tert-butyl Hydroperoxide Induced Oxidative Stress in Caco-2 Colon Cancer Cells. Food Science and Technology 2016;4(3):36–41.

139. Ketnawa S, Wickramathilaka M, Liceaga AM. Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. Food Chem 2018;254:36–46.

140. Acevedo-Fernández J, Angeles Chimal J, Rivera H, Petricevich V, Nolasco N, Collí D, et al. Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. In: Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Bentancur Ancona D, editors. Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias. Barcelona: OmniaScience; 2013. page 29–82.

141. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982;157(1):105–32.

CAPITULO VIII. ANEXOS

Anexo 1

Características de hidrofobicidad, hidrofilicidad, carga pI, solubilidad de los péptidos de pajuro.

Péptidos	Carga	pI	% Aminoácidos						
			aromáticos	alifáticos	azufrados	básicos	ácidos	Alifáticos hidroxilicos	GRAVY[1]
P1	-1.00	3.80	33.33	50.00	0.00	0.00	16.67	0.00	-0.517
P2	-1.00	4.00	20.00	60.00	0.00	0.00	20.00	0.00	0.600
P3	-1.08	5.88	33.33	16.67	16.67	0.00	0.00	16.67	0.117
P4	-0.50	5.09	33.33	33.33	0.00	16.67	16.67	0.00	-0.983
P5	0.00	6.32	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	-1.267
P6	-1.00	3.80	33.33	16.67	33.33	0.00	16.67	0.00	-0.250
P7	-1.00	4.38	14.29	14.29	0.00	14.29	57.14	0.00	-2.829
P8	0.00	5.88	25.00	50.00	0.00	0.00	0.00	25.00	-1.700
P9	0.50	7.09	14.29	14.29	0.00	28.57	14.29	28.57	-1.986
P10	1.00	8.93	40.00	20.00	0.00	20.00	0.00	20.00	-0.800
P11	0.00	5.88	16.67	33.33	0.00	0.00	16.67	16.67	-0.567
P12	0.00	5.88	25.00	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-1.125
P13	0.00	5.87	50.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.00	-1.250
P14	0.00	6.18	16.67	16.67	0.00	16.67	16.67	16.67	-1.550

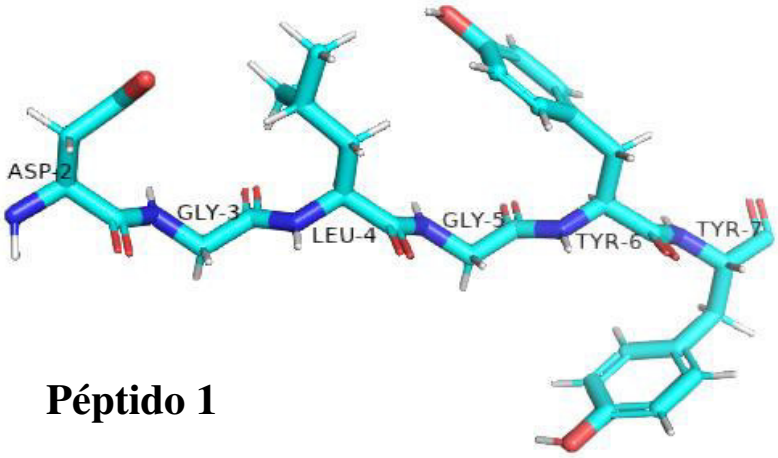
[1] Valor GRAVY (promedio de hidropatía) es calculado sumando el valor de hidropatía de cada residuo y dividiendo por la longitud de la secuencia [141]

pI = punto isoeléctrico

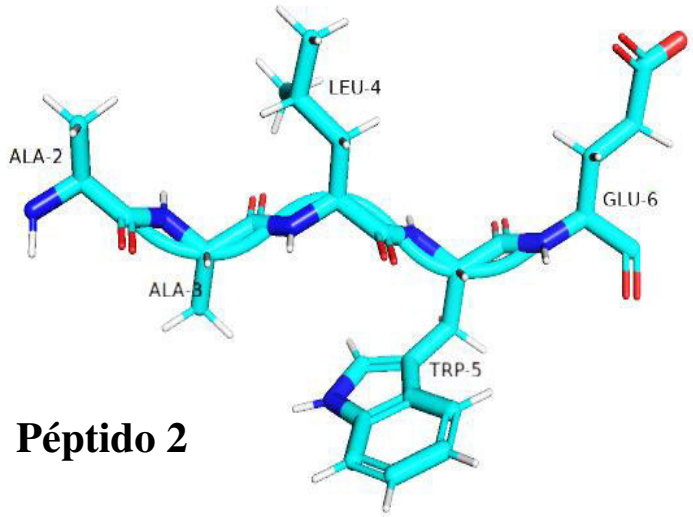
Aminoácidos Alifáticos: G, A, V, L, I, P. Aminoácidos aromáticos: F, W, Y. Aminoácidos azufrados: C, M. Aminoácidos básicos: K, R, H. Aminoácidos ácidos: B, D, E, N, Q, Z. Aminoácidos alifáticos hidroxilados: S, T.

Anexo 2

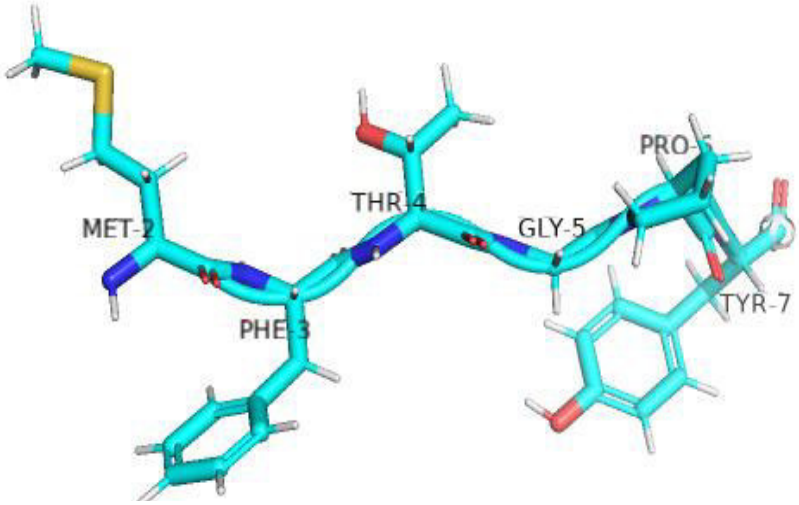
Diseño 3D de los péptidos de pajuro



Péptido 1

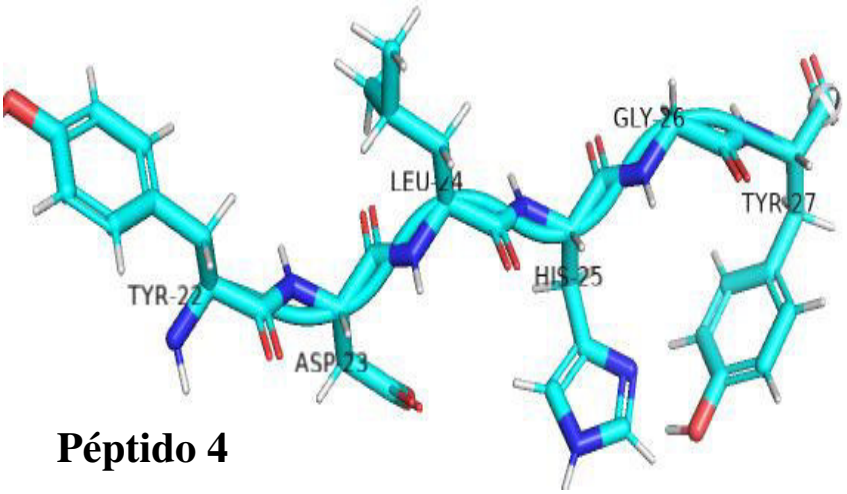


Péptido 2

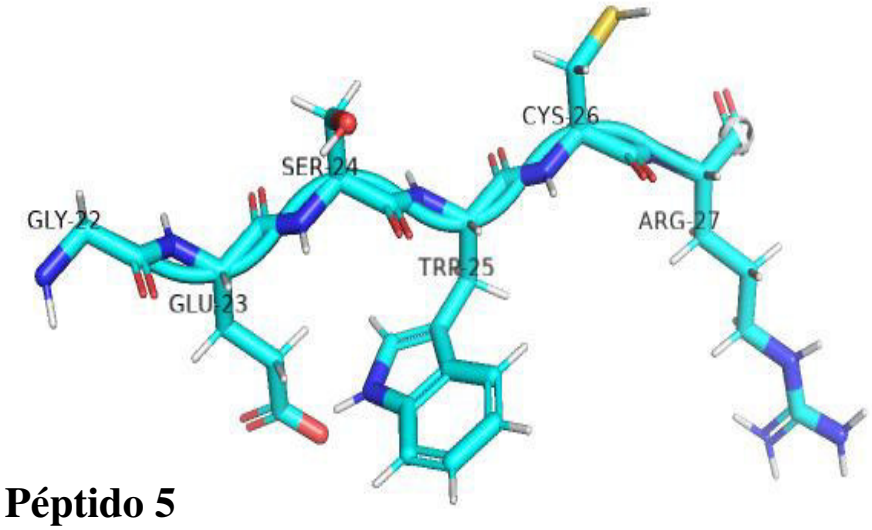


Péptido 3

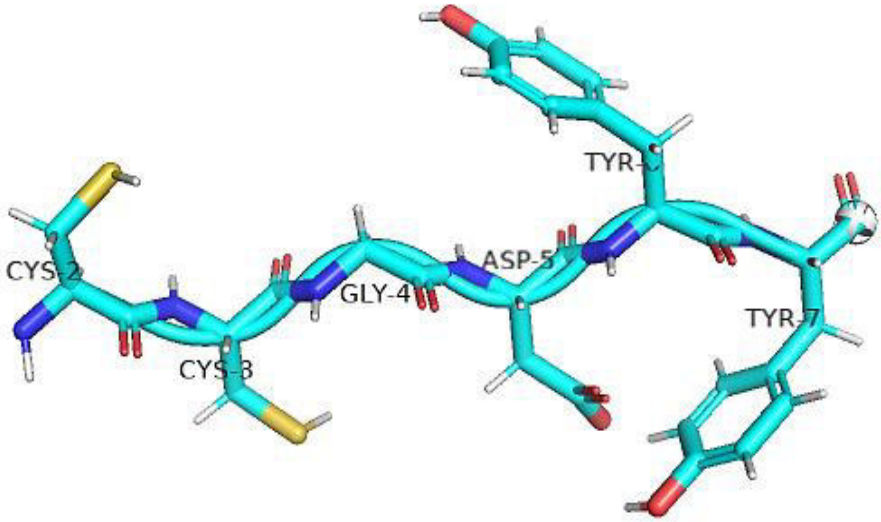
Figura anexa 2. Conformación tridimensional de los péptidos 1, 2, y 3 de pajuro obtenido por PyMol.



Péptido 4

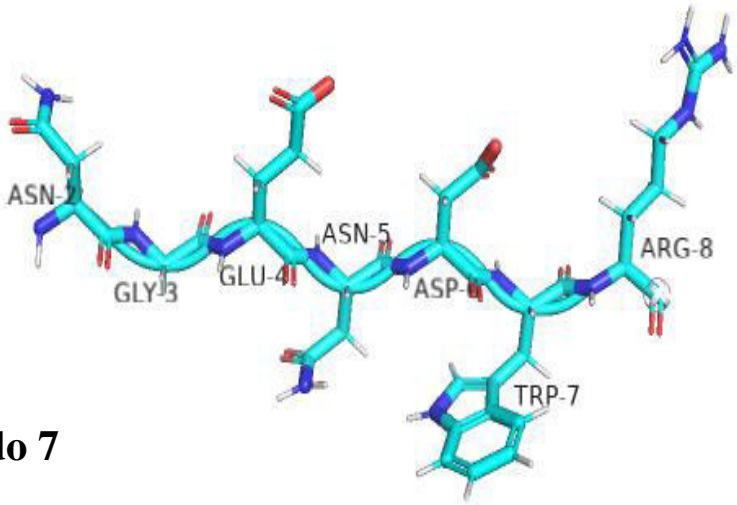


Péptido 5

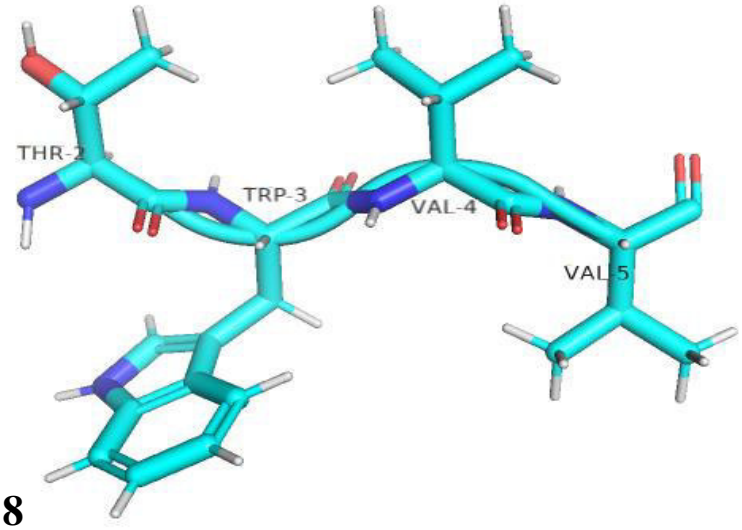


Péptido 6

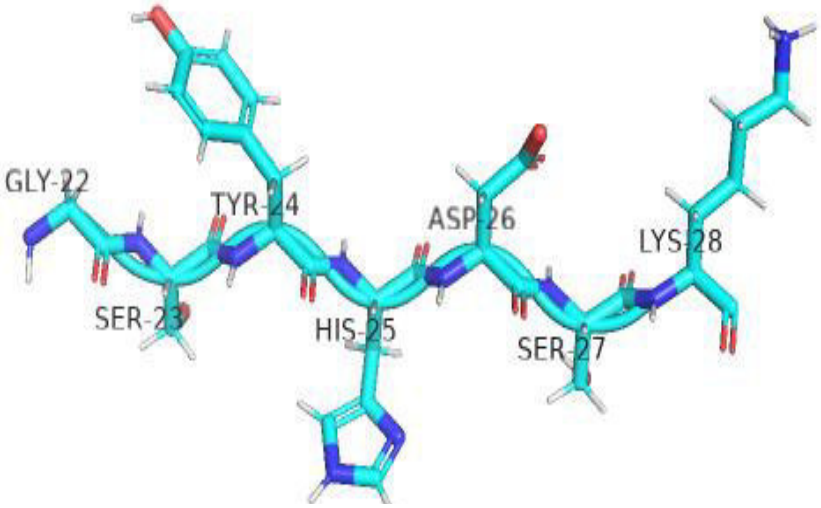
Figura anexa 2.1. Conformación tridimensional de los péptidos 3, 4 y 5 de pajuro obtenido por PyMol.



Péptido 7

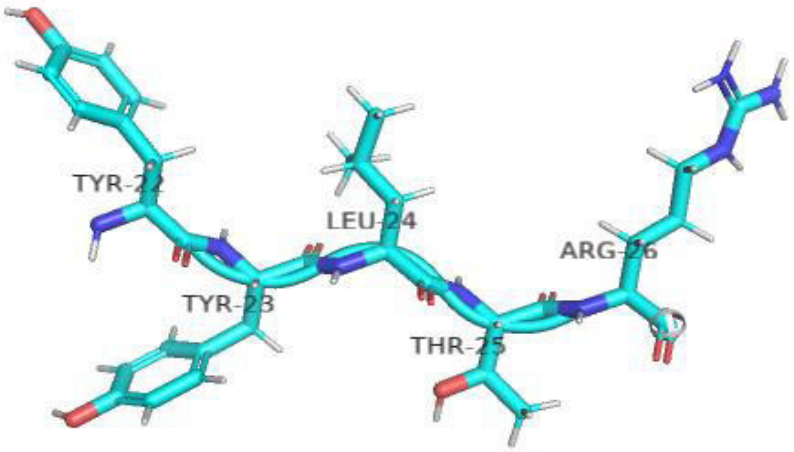


Péptido 8

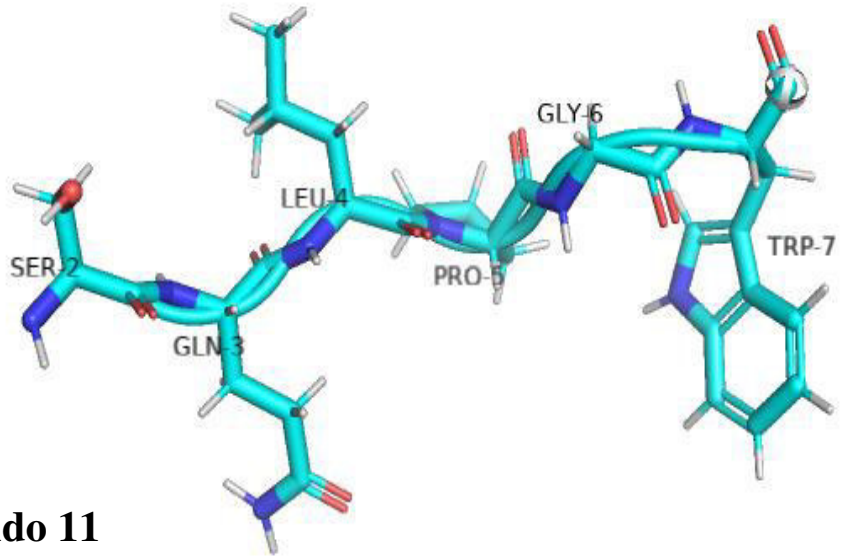


Péptido 9

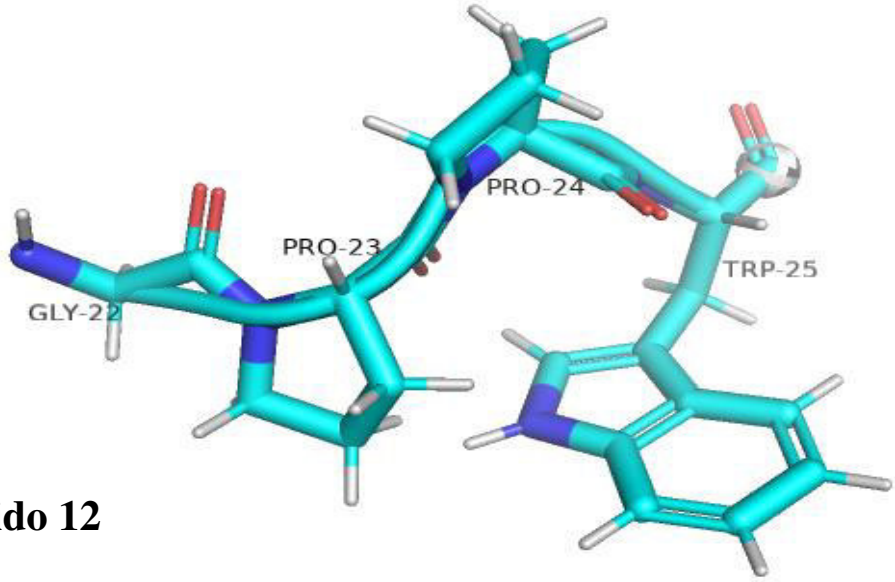
Figura anexa 2.3 Conformación tridimensional de los péptidos 7, 8 y 9 de pajuro obtenido por PyMol.



Péptido 10

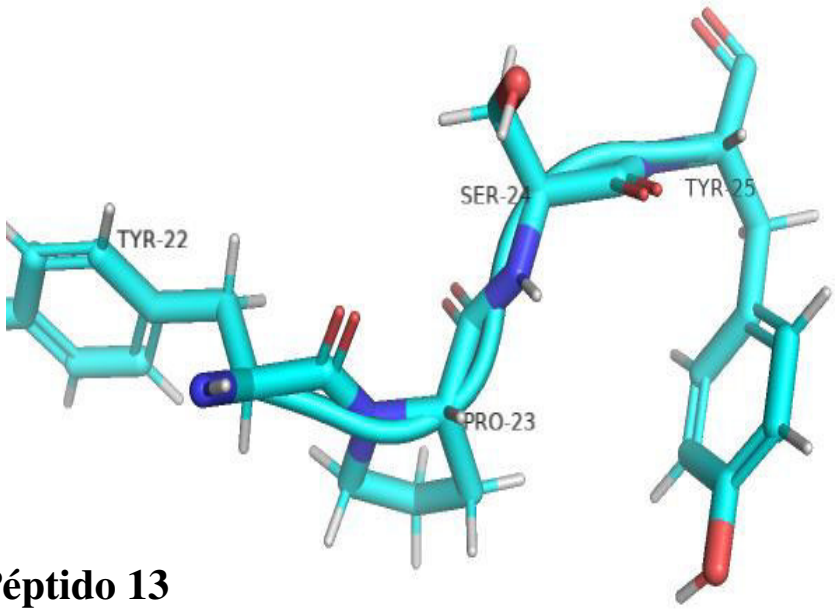


Péptido 11

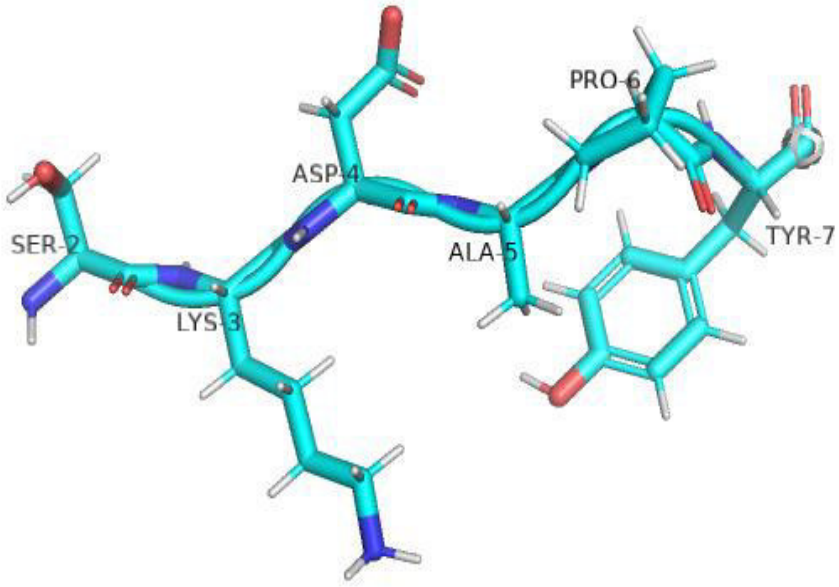


Péptido 12

Figura anexa 2.4. Conformación tridimensional de los péptidos 10, 11 y 12 de pajuro obtenido por PyMol.



Péptido 13



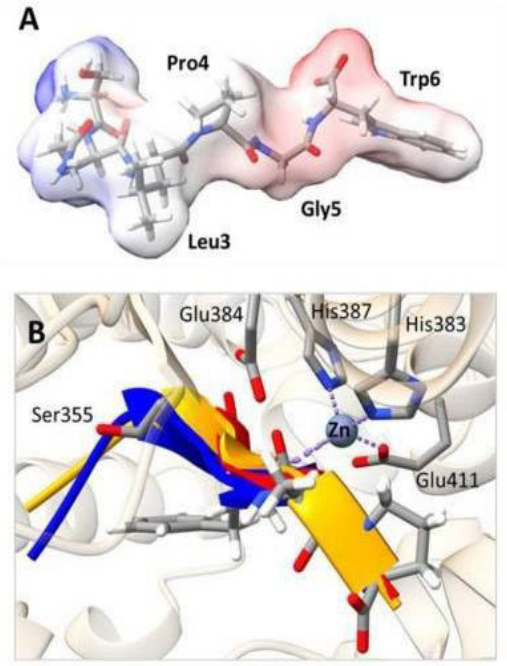
Péptido 14

Figura anexa 2.5 Conformación tridimensional de los péptidos 13 y 14 de pajuro obtenido por PyMol.

Se genero las estructuras 3D de las secuencias de péptidos con el software PyMol 2.4 (https://pymol.org/2/). PyMol utiliza programación Python y posee una interfaz gráfica PyQt para la visualización de las estructuras 3D, que contiene coordenadas cartesianas de los átomos que constituyen una determinada molécula. Para la presente investigación se visualizó en LINES las cadenas laterales del esqueleto proteico de los aminoácidos de cada péptido representado por colores, los elementos químicos estructurales.

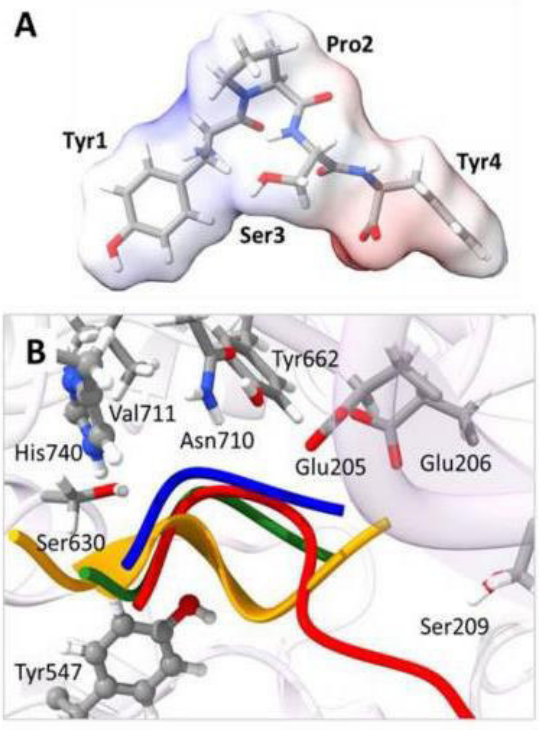
Anexo 3

Figura 1. Interacciones moleculares entre ECA y los péptidos pajuro después del refinamiento de la estructura del modelo.



(**A**) Representación del péptido SQLPGW a pH fisiológico y su isosuperficie de potencial electrostático que muestra regiones con carga negativa y positiva en rojo y azul, respectivamente. (**B**) Vista lateral de la enzima ECA para ilustrar la ocupación del subsitio por péptidos pajuro. Para los péptidos pajuro, solo se muestra la cadena principal, una cadena con color azul corresponde al péptido SQLPGW, naranja al péptido DGLGYY y una cadena naranja al péptido YPSY.

Figura 2. Interacciones moleculares entre DPPIV y los péptidos pajuro después del refinamiento de la estructura del modelo.



(A) Representación del péptido YPSY a pH fisiológico y su isosuperficie de potencial electrostático que muestra regiones cargadas negativa y positivamente en rojo y azul, respectivamente. (B) Vista lateral de la enzima DPP-IV para ilustrar la ocupación por péptidos pajuro. Para los péptidos pajuro, solo se muestra la cadena principal; las cadenas de color azul corresponden al péptido YPSY, las naranjas al péptido AALWE, las cadenas naranjas al péptido MFTGPY y las cadenas verdes al inhibidor de la diprotina A.