

Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía
Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales

**Evaluación *In silico* e *In vitro* de Hidrolizados de Garbanzo
(*Cicer arietinum* L.) para Inhibir a la Dipeptidil Peptidasa IV**

TESIS

Como requisito para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA NUTRICIÓN Y
ALIMENTOS MEDICINALES**

Presenta:

LN. José Antonio Mora Melgem

Culiacán, Sinaloa, México

17 de junio de 2024



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía y al Programa de Maestría en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales por mi formación académica. Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de manutención otorgada durante el tiempo que estuve cursando el posgrado. A la Facultad de Ciencias Biológicas y de Salud y al Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agrícolas, Campus Navojoa, de la Universidad de Sonora por el financiamiento recibido para poder llevar a cabo este proyecto (Número: USO513008508). A mi director de tesis el Dr. Jesús Gilberto Arámburo Gálvez, por su amistad, apoyo, paciencia, consejos y enseñanzas brindadas durante mi formación. Al Dr. Noé por abrirme las puertas de su laboratorio para el desarrollo de los experimentales de este proyecto, y por su apoyo, guía y conocimiento compartido durante mi formación académica. A la Dra. Marcela por su guía, apoyo y valiosas aportaciones en el desarrollo de este proyecto y mi formación académica. Al Dr. Giovanni por su asesoría, acompañamiento y consejos brindados durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y familia del laboratorio "Dr. Francisco Cabrera Chávez" Raúl, Cesar, Lizbeth, Jhonatan, Moroni, Xatzibe, Diana, Roció, Rogelio, quienes han contribuido y me han acompañado en este proceso. Al cDr. Oscar por su amistad, guía, consejos, asesoría y por sus valiosas aportaciones desde el planteamiento y durante el desarrollo de este proyecto de investigación. A mi familia, papá, mamá, David y Oscar por siempre apoyarme y estar para mí, muchas gracias. Al Dr. Francisco Cabrera Chávez por motivarme, confiar en mí, y por la oportunidad brindada para conocer el camino de la ciencia, siempre se lo agradeceré.

DEDICATORIA

*Para mi papá, mamá y hermanos quienes siempre me han dado su apoyo
incondicional, gracias por todo.*

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un problema de salud mundial que continúa aumentando. Se estima que para el año 2030, aproximadamente 643 millones de personas en todo el mundo padecerán esta enfermedad. El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) representa una fuente prometedora de péptidos bioactivos, incluidos aquellos con actividad para inhibir blancos terapéuticos importantes para el tratamiento de la DM2 como la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Sin embargo, no se conocen las interacciones moleculares de los péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV para inhibir su actividad. Además, hay poca información tanto de las propiedades farmacocinéticas de estos péptidos como de la capacidad de hidrolizados de garbanzo para inhibir a la DPP-IV *In vitro*. Por lo tanto, nuestro objetivo fue predecir las interacciones moleculares entre péptidos de garbanzo y el sitio activo de la DPP-IV, así como las propiedades farmacocinéticas de dichos péptidos. Adicionalmente, se realizaron ensayos de inhibición enzimática *In vitro* con hidrolizados de proteína de garbanzo para corroborar su potencial inhibidor. Se utilizaron las secuencias de la legumina (Q9SM) y provicilina (Q304D4) de garbanzo para realizar 8 hidrólisis enzimáticas diferentes utilizando la plataforma BIOPEP-UWM. Los análisis de acoplamiento molecular y ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad) se realizaron utilizando autodock vina 1.1.2, con la estructura DPP-IV PDB: 4PNZ, y la plataforma ADMETLab2.0, respectivamente. Los ensayos de inhibición enzimática *In vitro* se realizaron utilizando un kit comercial de inhibición de la DPP-IV. Se identificaron 381 inhibidores de la DPP-IV, de los cuales 92 fueron únicos. Los análisis de unión molecular revelaron que estos péptidos tienen una energía de unión baja, que oscila entre -5,2 y -7,9 kcal/mol. Además, dichos péptidos exhibieron una absorción, biodisponibilidad, distribución y propiedades no tóxicas óptimas. Notablemente, los ensayos de inhibición mostraron que los

hidrolizados de garbanzo con alcalasa tienen la capacidad de inhibir a la DPP-IV *In vitro* con un IC_{50} de hasta 0.6883 mg/mL en condiciones optimizadas de hidrólisis (temperatura, tiempo y concentración enzima/sustrato). Así, la proteína del garbanzo es una fuente prometedora de péptidos bioactivos con capacidad de inhibir a la DPP-IV *In vitro* y de materia prima para el desarrollo de alimentos funcionales para el control glucémico. Los resultados del presente estudio sientan las bases para futuros proyectos que evaluarán la capacidad hipoglucemiante del hidrolizado de garbanzo en modelos *In vivo*.

INDICE

APROBACIÓN.....	2
DERECHOS DE AUTOR.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA	iii
RESUMEN.....	iv
INDICE	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. Diabetes Mellitus tipo 2.....	5
2.2. Prevalencia	5
2.3. Factores de riesgo y manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2	8
2.4. Diagnóstico	10
2.5. Insulina.....	12
2.6. Patogénesis de la Diabetes Mellitus tipo 2	14
2.7. Tratamiento farmacológico.....	16
2.8. Hormonas incretinas y Dipeptidil Peptidasa IV	20
2.9. Análisis In silico en el diseño de nutraceuticos	26
2.9.1. Proteólisis In silico.....	29
2.9.2. Acoplamiento molecular	29
2.9.3. Predicciones de las propiedades farmacocinéticas ADMET	32

2.10. El garbanzo como fuente de péptidos bioactivos	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
5.1. Metodología análisis In silico	37
5.1.1. Análisis de los péptidos inhibidores de la DPP-IV provenientes del garbanzo	39
5.1.2. Predicción de hidrólisis enzimática	40
5.1.3. Análisis de acoplamiento molecular	41
5.1.5. Predicciones de ADMET	42
5.1.6. Multi-bioactividad y digestión gastrointestinal	42
5.2. Ensayos <i>In vitro</i>	43
5.2.1. Extracción de proteínas del garbanzo.....	43
5.2.2. Análisis de superficie de respuesta	45
5.2.3. Hidrólisis con Alcalasa (considerar primero el texto y después la tabla (5)).....	48
5.2.4. Determinación del porcentaje de inhibición de la DPP-IV.....	50
5.2.5. Concentración media inhibitoria (IC ₅₀)	53
5.2.6. Análisis estadístico.....	53
6. RESULTADOS.....	54
6.1. Predicciones de Frecuencia y potencia de péptidos para inhibir a la DPP-IV (Valores de A, B, A _E y B _E).	54
6.2. Análisis de Acoplamiento Molecular	58
6.2.1. Validación de las coordenadas del sitio activo de la estructura cristalográfica de la DPP-IV.....	58

6.2.2. Acoplamiento molecular de péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV.	60
6.3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas ADMET de péptidos de garbanzo.	68
6.4. Multi-bioactividad y estabilidad a la digestión gastrointestinal.	70
6.5. Determinación del porcentaje de inhibición <i>In vitro</i> de la DPP-IV por péptidos derivados del garbanzo.	70
6.6. Determinación del IC ₅₀	75
7. DISCUSIÓN.	78
8. CONCLUSIONES.	88
9. RECOMENDACIONES.	89
10. REFERENCIAS.	90
ANEXOS.	106

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Prevalencia de diabetes mellitus en América.....	6
2	Factores de riesgo asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.....	8
3	Control efecto de las hormonas incretinas en el control de la glucosa posprandial.....	21
4	Efecto de la DPP-IV después de la secreción de GLP-1 y GIP después de la ingesta de alimentos.....	23
5	Enfoques convencional e In silico para el desarrollo de nutraceuticos.....	26
6	Esquema general de la metodología de los análisis In silico.....	36
7	Diagrama de flujo de la metodología utilizada para la extracción de proteína.....	42
8	Validación del sitio activo para realizar el acoplamiento molecular.....	56
9	Interacciones entre los péptidos de garbanzo con los residuos de aminoácidos del sitio activo de DPP-IV....	62
10	Acoplamiento molecular e interacciones del péptido His-Phe con la DPP-IV.....	64
11	Ensayos preliminares del correcto funcionamiento del Kit de inhibición de la DPP-IV.....	69
12	Porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV de los hidrolizados de garbanzo R7 y R3.....	73
13	Determinación de la concentración media inhibitoria del hidrolizado de proteína de garbanzo con alcalasa.....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Criterios de diagnóstico para diabetes mellitus tipo 2.....	10
2	Tratamiento farmacológico para la Diabetes Mellitus tipo 2	16
3	Estudios de hidrólisis con alcalasa en alimentos de origen vegetal para la producción de hidrolizados con capacidad de inhibir a la DPP-IV.....	44
4	Factores y niveles utilizados para realizar el análisis de superficie de respuestas.....	45
5	Condiciones para el análisis de superficie de respuesta...	47
6	Preliminar de la determinación de la inhibición de la DPP-IV.....	49
7	Frecuencia y potencia de péptidos para inhibidores de DPP-IV en la secuencia e hidrolizados de la legumina y provicilina de garbanzo.....	53
8	Energía de unión del acoplamiento molecular de los péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV.....	58-61
9	Propiedades farmacocinéticas ADMET de los fármacos gliptinas y péptidos inhibidores de DPP-IV derivados de garbanzos.....	66
10	Porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV <i>In vitro</i> de los 17 experimentos del modelo Box-Behken.....	71

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica crónica que se caracteriza por la resistencia a la insulina y/o una deficiencia en la producción de esta (Chatterjee et al., 2017). La diabetes afecta alrededor de 537 millones de adultos alrededor del mundo, lo que representa al 10.5% de esta población, además, se estima que para el 2045 el número de casos aumentara a 783 millones (Magliano et al., 2021). El 90% de los casos de diabetes son DM2 (Artasensi et al., 2020). La DM2 compromete la calidad de vida de las personas que la padecen y algunos tratamientos provocan efectos secundarios con su uso crónico (Zurita-Cruz et al., 2018). Por lo tanto, ha crecido el interés por la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos efectivos, libres de o con efectos secundarios mínimos para el manejo de la DM2 (Chelliah et al., 2021; Nauck et al., 2021).

Uno de los enfoques terapéuticos más recientes para el tratamiento de la DM2 es la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Deacon, 2020). La DPP-IV es una enzima proteolítica ubicua implicada en la degradación de las hormonas incretinas como el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) (Kshirsagar et al., 2011). Estas hormonas intervienen en diversos procesos biológicos, como la reducción de los niveles de glucosa plasmática posprandial, mejorar la síntesis de insulina, preservar la función de las células beta pancreáticas, facilitar la absorción y eliminación de glucosa periférica, moderar la tasa de vaciado gástrico, reforzar el metabolismo de la glucosa y promover la saciedad (Cornell, 2020). Por lo tanto, dado que la inhibición de DPP-IV mantiene el sistema de las incretinas, los inhibidores de la DPP-IV han sido reconocidos como agentes terapéuticos cruciales para el tratamiento de la DM2.

En los últimos años ha crecido el interés por el uso de péptidos bioactivos provenientes de los alimentos como una alternativa a la terapia convencional o como ingrediente de alimentos funcionales/medicinales, debido a que estos han mostrado tener diferentes actividades biológicas como antihipertensivas, antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antidiabéticas (Chelliah et al., 2021; Daliri et al., 2017a; Peredo-Lovillo et al., 2022). En este contexto, el garbanzo es una leguminosa rica en proteínas, representando entre el 15% y el 20% del grano, dependiendo de la especie. Además, es la tercera leguminosa más producida a nivel mundial (Chavan et al., 1987; Merga & Haji, 2019). Se ha demostrado que la hidrólisis de las proteínas del garbanzo puede liberar péptidos con actividad biológica, como la capacidad para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina I (ECA-I) o a la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) (Chandrasekaran et al., 2020; Figueroa-Salcido et al., 2024). Esto hace que el garbanzo sea una fuente prometedora de péptidos con aplicaciones terapéuticas. Por lo tanto, resulta relevante estudiar las propiedades de estos péptidos. Sin embargo, los métodos convencionales para el estudio y desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos son costosos y requieren mucho tiempo, lo cual limita la investigación y el avance en tratamientos basados en péptidos bioactivos (Tu et al., 2018). En este sentido, los enfoques bioinformáticos ofrecen una alternativa eficaz para la exploración inicial y la identificación de nuevos compuestos terapéuticos, entre ellos los péptidos bioactivos (Shuli et al., 2022). Estos análisis permiten descubrir nuevas fuentes de péptidos bioactivos, seleccionar la enzima más adecuada para la hidrólisis, hacer predicciones sobre las propiedades farmacocinéticas ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad), y llevar a cabo análisis de acoplamiento molecular para conocer la afinidad de los péptidos con la enzima diana, así como las interacciones entre ellos (Agnihotry et al., 2020; Xiong et al., 2021). Por otra parte, los ensayos In vitro permiten comprobar la actividad de los compuestos de interés en condiciones controladas. En este

contexto, los ensayos In vitro de manera convencional requieren de mucho tiempo e inversión para encontrar nuevas fuentes de péptidos bioactivos. Los pasos más comunes en el desarrollo convencional incluyen: selección de la fuente proteica, selección de la enzima, diversas hidrólisis, purificación e identificación de los péptidos y comprobación In vitro de la actividad. (Daroit & Brandelli, 2021). Actualmente, se propone la utilización de un enfoque híbrido donde se aprovechen los ensayos In silico en combinación con los ensayos In vitro para aumentar las probabilidades de éxito en el desarrollo de nuevos fármacos o compuestos terapéuticos, disminuyendo también el costo de desarrollo y prueba de los fármacos (Paul et al., 2010; Peredo-Lovillo et al., 2022).

En este estudio, se empleó una amplia gama de herramientas, plataformas y bases de datos para realizar análisis In silico en combinación con ensayos In vitro para confirmar la actividad inhibidora de la DPP-IV. Entre las bases de datos más destacadas, se utilizaron UniProtKB, Protein Data Bank y BIOPEP-UWM, esta última destacando por sus diversas herramientas, como la proteólisis In silico, conversión al formato SMILES, y ser una base de datos de compuestos bioactivos. Además, se utilizaron otros software y herramientas especializadas. ADMETLab2.0 fue empleado para realizar predicciones sobre propiedades farmacocinéticas y toxicidad, mientras que Chimera se usó para visualizar estructuras tridimensionales de la enzima y los ligandos. AutoDock Vina se utilizó como algoritmo de búsqueda para identificar la mejor conformación, y DiscoveryStudio permitió visualizar las interacciones moleculares entre los ligandos y el sitio activo de la enzima. Estas herramientas y plataformas, en conjunto, ofrecieron un entorno robusto para el análisis y la interpretación de datos, facilitando una evaluación completa de las características y potenciales aplicaciones terapéuticas de los péptidos resultantes de la hidrólisis de proteínas del garbanzo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Diabetes Mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica que se caracteriza por el metabolismo anormal de los carbohidratos y lípidos, principalmente atribuido a alteraciones en la secreción de la insulina debido a un mal funcionamiento de las células β pancreáticas, resistencia a la insulina en órganos diana o una combinación de ambas (Eizirik et al., 2020). Como consecuencia de esto, la insulina endógena no logra mantener la homeostasis de la glucosa, produciendo hiperglucemia (Chatterjee et al., 2017). La hiperglucemia crónica causa graves daños a la salud, como complicaciones microvasculares incluidas nefropatías, neuropatías, retinopatías, y complicaciones macrovasculares como comorbilidades cardiovasculares, disminuyendo considerablemente la calidad de vida de quienes la padecen (Campos, 2012; DeFronzo et al., 2015).

2.2. Prevalencia

En 2021, la Federación Internacional de la Diabetes (FID) estimó que el 10.5% de la población de 20 a 79 años de edad padece DM2 y que hay alrededor de 537 millones de casos de diabetes en el mundo (Magliano et al., 2021). La DM2 es la forma de diabetes más común, ya que representa más del 90% de los casos (Artasensi et al., 2020). Anteriormente, la DM2 se caracterizaba por comenzar en la etapa adulta, pero en las últimas 2 décadas diversos estudios muestran su aparición en jóvenes y niños, indicando que es una enfermedad que puede aparecer en distintas etapas de la vida (Dabelea et al., 1999; Valaiyapathi et al., 2020). Los reportes han demostrado una coexistencia de obesidad, resistencia a la insulina y disfunción de las células β del páncreas (Sinha et al., 2002). Se ha reportado que entre el 66 al 64.9%

de las personas con obesidad desarrollan resistencia a la insulina (Jiang et al., 2020).

Actualmente, diversos estudios indican que la prevalencia de diabetes está incrementando a nivel mundial. En este sentido, proyecciones realizadas por la FID indican que para el año 2045 el número de casos en el mundo ascenderá a aproximadamente 783 millones, esto atribuido principalmente a la falta de implementación de medidas eficaces para contrarrestar el crecimiento de la prevalencia de diabetes. Esta enfermedad representa una causa significativa de mortalidad, con alrededor de 6.7 millones de fallecimientos anuales atribuibles a sus complicaciones (Magliano et al., 2021).

En el continente americano, la prevalencia de diabetes va desde el 4 hasta >12% (Magliano et al., 2021) (Figura 1). En México, la prevalencia en el año 2018 fue de 16.8%, convirtiéndola en la segunda causa de muerte y la primera causa de discapacidad en este país (Basto-Abreu et al., 2023). En 2021, la FID reportó 14.1 millones de casos de diabetes en México, posicionándolo como uno de los países con el mayor número de casos y una de las prevalencias más altas en el continente americano (Magliano et al., 2021). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en 2022 reportó una prevalencia de resistencia a la insulina (prediabetes), diabetes diagnosticada y diabetes no diagnosticada del 22.1%, 12.6% y 5.8% respectivamente, indicando una prevalencia total de diabetes del 18.3% (Basto-Abreu et al., 2023). Estos datos reflejan un incremento en la prevalencia de esta enfermedad en México. Adicionalmente, se ha reportado que la prediabetes puede progresar a DM2 en tan solo 2.5 años (Yokota et al., 2017).

2.3. Factores de riesgo y manifestaciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es una enfermedad multifactorial, desencadenada por la presencia de una gran variedad de factores genéticos y ambientales que contribuyen a alteraciones fisiopatológicas responsables de la alteración de los niveles de glucosa en sangre y, por lo tanto, desarrollo de la DM2 (Fletcher et al., 2002). La Figura 2 muestra los principales factores de riesgo genéticos y ambientales para el desarrollo de DM2. En cuanto a los factores genéticos, existen reportes de que entre el 35 y el 50% de los pacientes con DM2 tienen familiares con esta misma enfermedad. Se ha reportado que esto puede deberse a defectos en la señalización de la insulina y en la secreción de insulina (Durruty et al., 2019). En el contexto de la DM2, los factores ambientales desempeñan un papel fundamental (Bi et al., 2012), ya que la mayoría de estos factores son susceptibles de modificación. La evidencia científica sugiere que en una gran cantidad de casos la DM2 puede prevenirse mejorando los principales factores de riesgo modificables, entre los que destacan la obesidad, actividad física y la dieta (Hu, 2003; Schellenberg et al., 2013). Por lo tanto, la base del tratamiento de la DM2 se centra en cambios en el estilo de vida, como ajustes en la dieta, disminución de la masa corporal, incremento en la actividad física y una adecuada gestión del descanso en combinación con el tratamiento farmacológico (Marín-Peñalver et al., 2016).

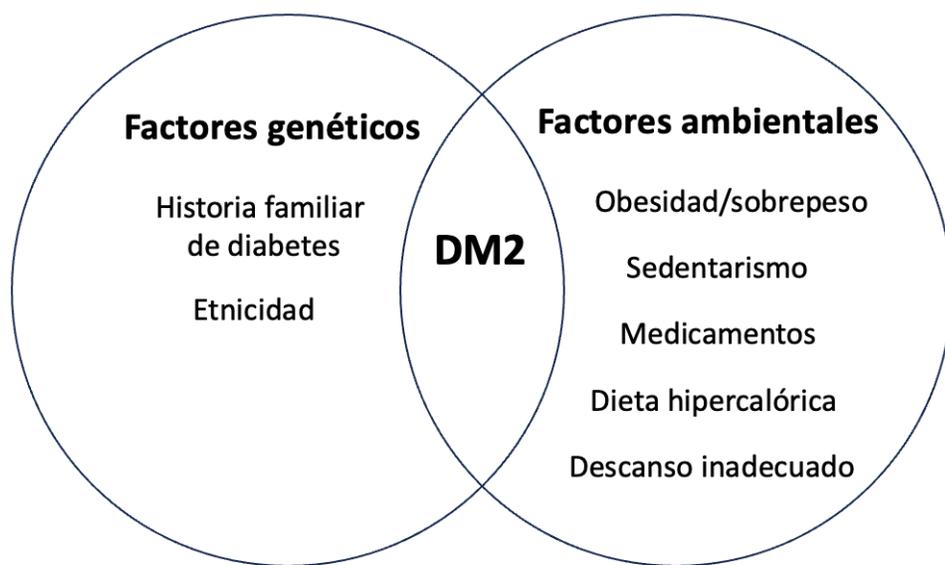


Figura 2. Factores de riesgo asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2.

Las manifestaciones clínicas más características de la DM2 son poliuria (incremento en la frecuencia y volumen de micción) para eliminar glucosa a través de la orina, en este sentido, se ha reportado que el 36.1% de hombres y 18.9% de mujeres con diabetes orinan frecuentemente. Se estima que el 65.5% de los hombres y el 77.5% de las mujeres que padecen diabetes orinan alrededor de 3 veces por las noches (Ali et al., 2023). La polidipsia (aumento de la sed) es un síntoma común como consecuencia de la poliuria (Xiao et al., 2013) y la polifagia (aumento del apetito) por la incapacidad de las células de utilizar la glucosa en circulación debido a la resistencia a la insulina o una disminución en la síntesis y secreción de esta hormona (Batchelor & German, 2019). Además, algunos pacientes reportan parestesia, disminución de peso involuntario y cerca del 84% de los pacientes reportan fatiga (Ali et al., 2023; Qureshi et al., 2017).

2.4. Diagnóstico

La Asociación Estadounidense de Diabetes (ADA), la Federación Internacional de Diabetes (FID) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecen las pautas generales para realizar el diagnóstico adecuado de la DM2. Los lineamientos establecen que la DM2 se puede diagnosticar basándose en las concentraciones de glucosa plasmática, ya sea en ayunas o durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) o según la concentración de hemoglobina glucosilada A1c (HbA1c) (Care, 2020; Magliano et al., 2021).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico para diabetes mellitus tipo 2.

Criterios de diagnóstico			
Diabetes	HbA1c	GPA	PTOG
ADA	≥ 6.5%	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL
OMS			
Prediabetes	HbA1c	GPA	PTOG
ADA	≥ 5.7 - <6.5%	≥ 100 - <125 mg/dL	≥ 140 - <200 mg/dL
OMS	No hay recomendación	≥ 110 - <125 mg/dL	
Normal	HbA1c	GPA	PTOG
ADA	<5.7%	<100 mg/dL	<140 mg/dL
OMS			

HbA1c: Hemoglobina glucosilada; GPA: Glucosa plasmática en ayuno; PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa. OMS: Organización Mundial de la Salud; ADA: Asociación Americana de Diabetes.

La prueba de glucosa en ayuno requiere que el individuo se abstenga de ingerir alimentos durante 8 horas previas a la realización de la prueba. Si la glucosa plasmática en ayuno es superior a 126 mg/dL en dos o más pruebas realizadas en diferentes días se confirma el diagnóstico de DM2 (Eizirik et al., 2020). Generalmente, cuando la prueba de glucosa en ayuno da un valor de entre 110 a 125 mg/dL, se recomienda realizar la PTOG. Esta prueba requiere también de un ayuno de 8 horas y después determinar los niveles de glucosa en ayuno. Posteriormente, se administran 75g de glucosa y se realizan mediciones subsecuentes de glucosa capilar cada 30 minutos durante 2 horas. Si la glucosa se mantiene por encima de 200 mg/dL durante las 2 horas, se confirma el diagnóstico de DM2 (American Diabetes Association., 2022). La hemoglobina tiene una vida media de entre 90 a 120 días. Durante el proceso de glucosilación, la hemoglobina se transforma en hemoglobina glucosilada A (HbA1c) y sirve como un indicador retrospectivo de la concentración media de glucosa en sangre a lo largo de dicho período. Un valor de HbA1c en sangre $\geq 6,5\%$ es considerado diagnóstico de diabetes. Además, esta prueba se utiliza como indicador en el seguimiento de pacientes con diabetes, ya que permite evaluar tanto el apego al tratamiento prescrito como su efectividad (Selvin et al., 2010).

2.5. Insulina

La DM2 se caracteriza por la resistencia a la insulina y en etapas avanzadas una deficiencia en su producción (Durruty et al., 2019). La insulina es una hormona polipeptídica que se sintetiza en las células β del páncreas (Rorsman & Ashcroft, 2018). A esta hormona la conforman 51 aminoácidos, sin embargo, el gen de la insulina codifica un polipéptido precursor de la insulina de 110 aminoácidos llamado preproinsulina (Fu et al., 2013). La preproinsulina está conformada por un péptido señal N-terminal, la cadena B, el péptido conector C y la cadena A. Al translocarse al retículo endoplásmico

(RE), se elimina el péptido señal y se pliega en una estructura tridimensional formando puentes disulfuro entre las cadenas A y B. En esta etapa, la preproinsulina se convierte en proinsulina (Vasiljević et al., 2020). Posteriormente, la proinsulina se desplaza por el complejo de Golgi hasta la red trans-Golgi para dividirla en gránulos secretores, aquí se escinde el péptido C y se forma la insulina madura, que consta únicamente de las cadenas A y B (Arvan & Halban, 2004).

Una vez que la insulina madura se encuentra en los gránulos secretores, esta permanece almacenada hasta que se desencadena su liberación. Este proceso se inicia principalmente en presencia de altas concentraciones de glucosa en la sangre (Boland et al., 2017). Cuando los niveles de glucosa en sangre aumentan, las células B del páncreas captan glucosa mediante los transportadores GLUT-2, que funcionan como sensores para detectar las variaciones en los niveles de glucosa (Thorens, 2001). Al ingresar glucosa a las células β del páncreas, comienza su catabolismo, lo que aumenta la proporción de ATP/ADP intracelular y conduce al cierre de los canales de potasio dependientes de ATP en la membrana plasmática. Esto provoca la despolarización de la membrana y la apertura de los canales de calcio, lo que aumenta las concentraciones intracelulares de calcio y permite la liberación de insulina mediante exocitosis (Galicia-Garcia et al., 2020).

La insulina juega un papel crucial para la homeostasis de la glucosa (Boland et al., 2017). La liberación de insulina estimula la captación de glucosa en varios tejidos, como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo, promoviendo la glucogénesis y lipogénesis (Newsholme & Dimitriadis, 2001). En el músculo esquelético, la insulina promueve la captación de glucosa y síntesis de glucógeno, debido a que esta aumenta la actividad de transporte de glucosa a través de la translocación de las vesículas de almacenamiento del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática del músculo

esquelético, permitiendo así la entrada de glucosa a la células (S.-H. Lee et al., 2021).

En el hígado la insulina promueve la glucogénesis a través de la activación de la glucógeno sintasa (Norton et al., 2022). Después de la ingesta de alimentos, la insulina promueve el anabolismo e inhibe rutas catabólicas. Por estas razones, la insulina tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en circulación. La glucogénesis y la glucogenólisis son vías contrarias reguladas por las concentraciones circulantes de insulina y glucagón (Norton et al., 2022). En un estado de ayuno, el hígado libera glucosa a circulación para mantener la homeostasis y proporcionar glucosa a los tejidos que la consumen. Este proceso implica la degradación del glucógeno hepático (glucogenólisis) y la síntesis de glucosa a partir de ácidos grasos y glicerol (gluconeogénesis) (Rizza, 2010). En la DM2, la insulina no puede regular adecuadamente la síntesis hepática de glucógeno ni la producción de glucosa, y la gluconeogénesis hepática se mantiene aumentada, por lo cual se presenta hiperglucemia en ayunas en la DM2 (Krssak et al., 2004).

2.6. Patogénesis de la Diabetes Mellitus tipo 2

La resistencia a la insulina (RI) se define como un defecto en el control del metabolismo de la glucosa mediado por la insulina, ocurriendo principalmente en el tejido graso, musculo y el hígado y es una de las manifestaciones clínicas iniciales en el desarrollo de la DM2 (James et al., 2021). Dentro de los factores ambientales que ocasionan la RI se encuentra el exceso de tejido adiposo, el cual desempeña un papel central en el almacenamiento de los ácidos grasos. Cuando la capacidad máxima de almacenamiento de los adipocitos se ve superada, estos se hipertrofian y provocan una hipoxia local y liberación de factores proinflamatorios. Como resultado, hay una supresión de la señalización de la insulina (Lionetti et al., 2009). En los adipocitos resistentes

a la insulina, la lipólisis no se suprime completamente, lo que provoca un aumento de la liberación de ácidos grasos (van de Weijer et al., 2011).

El tejido musculoesquelético y el cardíaco son esenciales para la oxidación de los ácidos grasos. Este proceso implica la movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo hacia los músculos, donde se absorben y son utilizados como fuente de energía (Frayn et al., 2006). En la obesidad, existe un desequilibrio entre la absorción y oxidación de los ácidos grasos, lo que provoca una acumulación excesiva de triacilgliceroles y metabolitos de ácidos grasos (diacilgliceroles, acil-CoAs y ceramidas) en el sarcoplasma. El aumento de la acumulación de lípidos dentro del músculo esquelético ocurre por una mayor absorción de ácidos grasos y/o una menor oxidación de estos (Boden et al., 2001). En el estado de obesidad, hay un incremento en la expresión de las proteínas transportadoras de ácidos grasos (Simoneau et al., 1999). Además, se produce una reubicación de la translocasa de los ácidos grasos (FAT)/CD36 hacia la membrana plasmática, de esta manera se facilita la absorción de los ácidos grasos (Boden et al., 2001).

La acumulación de ácidos grasos y sus metabolitos en las células musculares puede interferir en la señalización de la insulina y la homeostasis de la glucosa a través de diferentes mecanismos. Los diacilgliceroles activan la proteína quinasa C (PKC) y al activarse se transloca a la membrana celular donde fosforila el sustrato del receptor de insulina (IRS-1), lo cual provoca la inhibición de la señalización de insulina (Erion & Shulman, 2010). Además, la inhibición de la señalización de IRS-1 afecta a la activación de la proteína quinasa B (PKB), la cual fosforila una proteína llamada AS160, causando la inhibición de la translocación de los GLUT4. Esta inhibición tiene como consecuencia una disminución en la translocación de las vesículas que contienen GLUT4 desde el citoplasma hacia la membrana plasmática, permitiendo la entrada de glucosa a la célula (Timmers et al., 2008). Las ceramidas inhiben directamente la actividad de la PKB y están involucradas

en la inducción de apoptosis (Schubert et al., 2000). Por lo tanto, la activación de la PKC y la inhibición de la PKB contribuyen en gran medida con el desarrollo de resistencia a la insulina. Adicionalmente, la acumulación de ácidos grasos en el tejido muscular puede provocar ER, activación de vías inflamatorias, y disfunción mitocondrial las cuales pueden interferir con la señalización de la insulina y contribuyendo también al desarrollo de resistencia a la insulina (Rocha et al., 2016). Por otra parte, la exposición crónica a niveles elevados de glucosa en sangre también contribuye al desarrollo de la RI, debido al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células, lo que induce estrés oxidativo, daño celular y alteración en las vías de señalización de la insulina (Dali-Youcef et al., 2013; Hummasti & Hotamisligil, 2010).

2.7. Tratamiento farmacológico

En la actualidad, existe una amplia gama de fármacos para el tratamiento de la DM2, cada uno con mecanismos de acción distintos (Tabla 2). Entre estos medicamentos se encuentran las biguanidas, las sulfonilureas, agonistas del receptor y activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ) y los inhibidores de la α -glucosidasa y α -amilasa (Chaudhury et al., 2017). Además de estos fármacos, durante los últimos 10 años se han desarrollado y aprobado algunos otros fármacos con capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre, entre estos se encuentran inhibidores de los cotransportadores de sodio-glucosa 2 (SGLT-2), que disminuyen la reabsorción de glucosa del filtrado urinario a circulación, los agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), con actividad insulínica y los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que aumentan la vida media de las hormonas incretinas (Sterrett et al., 2016).

Tabla 2. Tratamientos farmacológicos para la Diabetes Mellitus tipo 2.

Fármacos	Mecanismo de acción
Biguanidas	Disminución de la gluconeogénesis hepática
Sulfonilureas	Insulínotropico
Agonistas de PPAR γ	Aumentan sensibilidad a la insulina
Inhibidores de α -glucosidasa	Disminuyen la digestión y absorción de HC
Inhibidores de α -amilasa	Disminuyen la digestión y absorción de HC
Inhibidores de SGLT-2	Disminuyen la reabsorción de glucosa del filtrado urinario
Agonistas de GLP-1	Insulínotropico
Inhibidores de la DPP-IV	Aumento de la vida media de las incretinas (Insulínotropico)

La metformina se encuentra dentro de la familia de las biguanidas y suele ser el fármaco de primera elección para el tratamiento de la DM2 (Davies et al., 2018). Esto debido a sus efectos hipoglucemiantes, su perfil de seguridad y su relativo bajo costo (McCreight et al., 2020). En la DM2 se presenta un aumento en la gluconeogénesis, siendo el principal causante de la hiperglucemia en ayuno. La metformina actúa en el hígado inhibiendo la producción de glucosa hepática, manteniendo así los niveles de glucosa plasmática controlada (LaMoia & Shulman, 2021).

En cuanto a las sulfonilureas, su principal objetivo es mejorar la liberación de insulina mediante la modificación del potencial de membrana de las células β del páncreas (Hirst et al., 2013). Las sulfonilureas inhiben los canales de K_{ATP} , provocando la despolarización de la membrana de las células β del páncreas y, a su vez, desencadenando la apertura de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje. Esto ocasiona un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y la estimulación de la secreción de insulina por exocitosis (Del Prato & Pulizzi, 2006).

Las tiazolidindionas (TZD) son agonistas $PPAR\gamma$ y su principal efecto es el aumento de la sensibilidad a la insulina activando $PPAR\gamma$ en tejido adiposo. Las TZD promueven la diferenciación de fibroblastos en los adipocitos, potencia la expresión de GLUT4, lipoproteína lipasa y mejoran la expresión de los sustratos de receptor de insulina IRS-1 e IRS 2, mejorando así la sensibilidad a la insulina (Bermúdez et al., 2010).

La α -glucosidasa es una enzima que se ubican en la membrana del borde de cepillo e hidroliza oligosacáridos en monosacáridos, permitiendo así la absorción de estos (Abe et al., 2011). Los inhibidores de la α -glucosidasa tienen una estructura similar a los oligosacáridos, pero presenta una mayor afinidad a esta enzima, uniéndose al sitio activo y provocando un retraso en la digestión y absorción de carbohidratos y, de esta manera, reduciendo la

glucosa posprandial (Rosak & Mertes, 2012). La α -amilasa es una enzima producida en las glándulas salivales y en el páncreas y desempeña un papel fundamental en la catálisis de los enlaces α -(1,4)-D-glucosídicos encontrados en el almidón, hidrolizándolos en fragmentos más pequeños. Al inhibir esta enzima, se disminuye la digestión y absorción de carbohidratos, disminuyendo la respuesta glucémica postprandial (Kaur et al., 2021).

Los cotransportadores de sodio-glucosa tipo 2 SGLT2 son los responsables del 80% al 90% de la reabsorción renal de glucosa (DeFronzo et al., 2017). En personas con DM2, se ha reportado una mayor capacidad de reabsorción renal de glucosa, atribuido a un aumento en la expresión de los SGLT2. La inhibición de la acción de SGLT2 disminuye la capacidad de los riñones para reabsorber glucosa del filtrado urinario, resultando en un incremento en la excreción de glucosa a través de la orina (Tentolouris et al., 2019).

La GLP-1 es una hormona incretina que juega un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa posprandial. Esto se consigue mediante la acción sobre los receptores de GLP-1 en el páncreas, estimulando la liberación de insulina desde las células β de los islotes pancreáticos de manera dependiente de la glucosa, y suprimiendo la secreción de glucagón de las células alfa (α) de los islotes pancreáticos. Este mecanismo contribuye significativamente a la reducción de los niveles de glucosa en sangre en individuos con hiperglucemia (Cornell, 2020).

Los inhibidores de la DPP-IV desempeñan un papel importante en el manejo de la DM2. Esta enzima es responsable de la inactivación de las hormonas incretinas, específicamente el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). En condiciones fisiológicas normales, estas hormonas poseen una vida media aproximada de 2 minutos (Dalla Man et al., 2009). Sin embargo, estas

hormonas mejoran la función de las células β del páncreas, provocando un aumento en la síntesis y secreción de insulina y una disminución de la secreción de glucagón, contribuyendo así al control glucémico (Vella, 2012). Por lo tanto, la inhibición de la DPP-IV prolonga la vida media de estas hormonas incretinas, facilitando un mejor control glucémico postprandial.

Aunque los fármacos utilizados para el tratamiento de la DM2 son efectivos, al ser la DM2 una enfermedad crónica implica una terapia continua a lo largo de la vida. Esto puede incrementar el riesgo de presentar efectos adversos asociados al uso de los fármacos. Entre las complicaciones potenciales se incluyen hiperglucemias severas, pancreatitis, un aumento del riesgo de desarrollo de ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de vejiga, infecciones de las vías urinarias y respiratorias, insuficiencia cardíaca, acidosis láctica y trastornos gastrointestinales (Razavi-Nematollahi & Ismail-Beigi, 2019). Por lo tanto, la búsqueda de compuestos terapéuticos inocuos y eficaces para el tratamiento de la DM2 sigue siendo un objetivo de mucha relevancia en la investigación.

2.8. Hormonas incretinas y Dipeptidil Peptidasa IV

GIP y GLP-1 desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa posprandial (Figura 3), esto debido a su capacidad de aumentar la síntesis y secreción de insulina y disminuir la secreción de glucagón, el vaciamiento gástrico y el apetito (Vella, 2012). En conjunto, estas hormonas provocan del 50% al 70% de la secreción de insulina después del consumo de alimentos (Gilbert & Pratley, 2020). GLP-1 se secreta a partir de células L endocrinas intestinales, que se encuentran principalmente en el íleon distal y el colon. En el caso de la GIP, esta se libera a partir de células K intestinales que se localizan en mayor cantidad en el duodeno y yeyuno (Theodorakis et al., 2006). La glucosa es el principal estimulante de la liberación de las

hormonas incretinas, debido a la captación de glucosa dependiente de Na^+ por el cotransportador de sodio y glucosa tipo 1 (SGLT1). La absorción de glucosa por este transportador puede provocar la despolarización de la membrana por el flujo de Na^+ , permitiendo así la apertura de los canales de Ca^{2+} , aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular y desencadenando la exocitosis de GLP-1 y GIP de las vesículas donde se encuentran almacenadas (Ezcurra et al., 2013).

GLP-1 actúa a través de su receptor llamado GLP-1R, principal responsable de la cascada de señalización para estimular la secreción de insulina por GLP-1. GLP-1R se encuentra acoplado a proteínas G en la membrana celular y, al unirse GLP-1 la subunidad α de la proteína G, se activa la adenilato ciclasa catalizando la conversión de ATP a AMPc. El aumento de los niveles de AMPc intracelular activan la proteína quinasa A (PKA) (Pabreja et al., 2014), la cual fosforila subunidades de los canales de K^+ provocando su cierre y ocasionando una despolarización de la membrana celular. Esto tiene como consecuencia la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, provocando que las vesículas que contienen insulina se fusionen con la membrana celular y liberen insulina (Baggio & Drucker, 2007). Adicionalmente, PKA puede fosforilar la proteína de unión a elementos sensible a AMPc (CREB), activando la transcripción del gen de insulina y de esta manera provocando un aumento en la síntesis de insulina (Dalle et al., 2011). Particularmente, en la DM2 el efecto incretina se muestra alterado e incluso ausente (Nauck & Müller, 2023). A pesar de que ambas hormonas en pacientes sanos tienen un efecto insulínotropico, se han realizado estudios en pacientes con DM2 donde se les administra GIP, incluso a dosis altas y no se observaron efectos significativos sobre la secreción de insulina (Vilsbøll et al., 2003). Contrariamente, se ha reportado que la administración de GLP-1 en pacientes con DM2 induce una mayor secreción de insulina, incluso a niveles comparables que individuos sanos (Kjems et al.,

2003). Por lo tanto, la GLP-1 es más relevante para el control glucémico en pacientes con DM2.

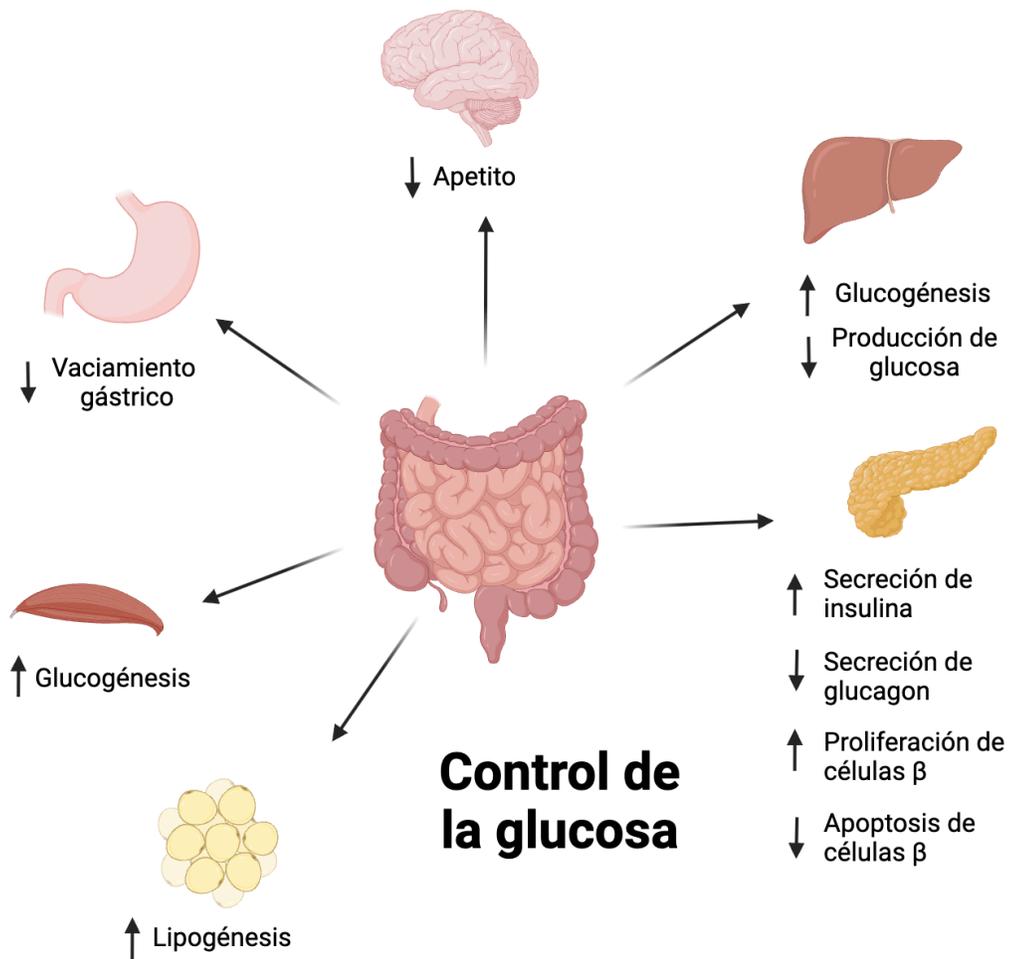


Figura 3. Control efecto de las hormonas incretinas en el control de la glucosa posprandial.

Aunque las incretinas desempeñan un papel crucial en la regulación de la glucemia posprandial, estas presentan una vida media corta, aproximadamente 2 minutos para el GLP-1 y 7 minutos para el GIP (Deacon et al., 1995). Esta característica limita su actividad insulínica, ya que son rápidamente degradadas por la DPP-IV poco después de su liberación (Florentin et al., 2022). La DPP-IV, también conocida como CD26, es una serina peptidasa homodimérica ubicua, compuesta por alrededor de 700 aminoácidos por subunidad, estas subunidades son idénticas estructuralmente y en algunos casos la unión de un ligando a una de las subunidades puede producir un cambio conformacional provocando una inhibición alostérica. Esta enzima tiene la particularidad de escindir preferentemente sustratos que presentan prolina o alanina en la penúltima posición del péptido, siendo así responsable directa de la degradación de las hormonas incretinas GLP-1 y GIP (Juillerat-Jeanneret, 2014; Roppongi et al., 2018). La degradación de las incretinas por la DPP-IV provoca una disminución en la síntesis y secreción de insulina, evitando los efectos positivos de las incretinas sobre el metabolismo de la glucosa (Figura 4). Por lo tanto, la inhibición de la DPP-IV ha sido un blanco terapéutico esencial en el tratamiento de la DM2 y en la actualidad este grupo de fármacos son ampliamente utilizados (Yin et al., 2022).

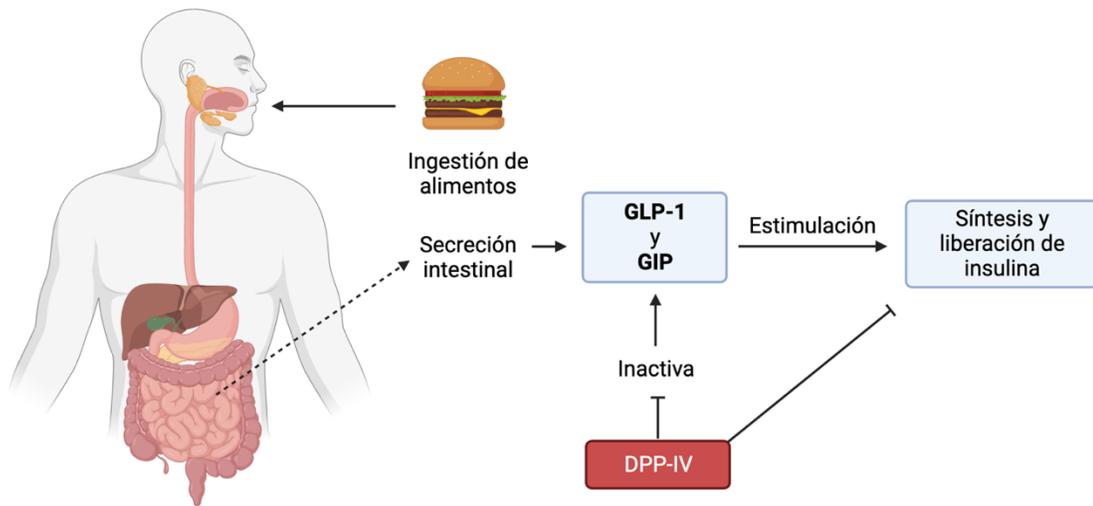


Figura 4. Efecto de la DPP-IV después de la secreción de GLP-1 y GIP después de la ingesta de alimentos.

La potencia de los inhibidores de la DPP-IV para disminuir la HbA1c es moderada (0.5% al 0.8%) (Craddy et al., 2014). Sin embargo, por su acción insulínica y su capacidad de disminuir la secreción de glucagón, los inhibidores de la DPP-IV se suelen utilizar en combinación con otros fármacos como la metformina (Seino et al., 2012). Adicionalmente, se ha reportado que la metformina aumenta la secreción de GLP-1, por lo que la combinación de inhibidores de la DPP-IV y metformina es eficaz para reducir por debajo del 7% la HbA1c (K. A. Lee et al., 2022). Sin embargo, los inhibidores de la DPP-IV también se utilizan como monoterapia en algunos pacientes con DM2 (Kshirsagar et al., 2011). Además, los inhibidores de la DPP-IV han mostrado bajo riesgo de hipoglucemia (Gilbert & Pratley, 2020). A pesar de los efectos benéficos de los fármacos inhibidores de la DPP-IV, se han reportado algunos efectos secundarios como dolores de cabeza, nasofaringitis, disfunción hepática e infección de vías respiratorias superiores (Gooßen & Gräber, 2012). Por lo tanto, se recomienda monitorear las enzimas hepáticas durante los primeros 3 meses de inicio del consumo de estos fármacos y no se recomienda su uso en pacientes con pancreatitis o antecedentes de esta enfermedad (Marín-Peñalver et al., 2016).

2.9. Análisis In silico en el diseño de nutraceuticos

El proceso de diseño, descubrimiento y desarrollo de fármacos/nutraceuticos mediante enfoques convencionales representa un proceso costoso y prolongado, que requiere de una serie de etapas entre las que se encuentran la identificación de blancos terapéuticos viables, el descubrimiento y optimización de compuestos con potencial terapéutico y la implementación de ensayos preclínicos y clínicos (Deore et al., 2019). Se estima que el costo para el desarrollo de un fármaco hasta su lanzamiento al mercado es de aproximadamente 1800 millones de dólares y el 96% de los fármacos candidatos son abandonados (Paul et al., 2010). Esto último debido a su falta

de eficacia, no tener adecuadas propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo y excreción), o por presentar toxicidad (Shaker et al., 2021). Por estas razones, el diseño de fármacos y nutraceuticos asistidos por computadora ha ganado mucha relevancia en los últimos años, debido a que se caracterizan por ser herramientas económicas y eficaces que crean modelos teóricos a partir de grandes bases de datos para el descubrimiento y la detección virtual de moléculas candidatas (Agnihotry et al., 2020).

Uno de los análisis *In silico* ampliamente utilizado en la búsqueda de fuentes potenciales proteicas para la generación de hidrolizados con potencial bioactivo son las hidrólisis enzimáticas simuladas. Este análisis permite realizar una proteólisis simulada con distintas enzimas y buscar péptidos bioactivos encriptados en las secuencias proteicas de diferentes fuentes alimentarias. Además, los análisis *In silico* nos permiten predecir posibles actividades biológicas, así como también evaluar mediante predicciones las propiedades farmacocinéticas (ADMET) del compuesto con potencial terapéutico. Adicionalmente, nos permiten evaluar el posible mecanismo de acción y las interacciones moleculares mediante análisis de acoplamiento molecular (Peredo-Lovillo et al., 2022; Xiong et al., 2021). Estos ensayos pueden ser utilizados como un mecanismo de filtrado para identificar aquellos compuestos con mayor potencial terapéutico e incluso utilizarse en un abordaje híbrido en la etapa preclínica, utilizando análisis *In silico* e *In vitro* para mejorar los resultados de los ensayos (Figura 5). Esta práctica contribuye significativamente a la optimización de recursos, consolidándose como una etapa esencial en el proceso de desarrollo de fármacos y nutraceuticos.

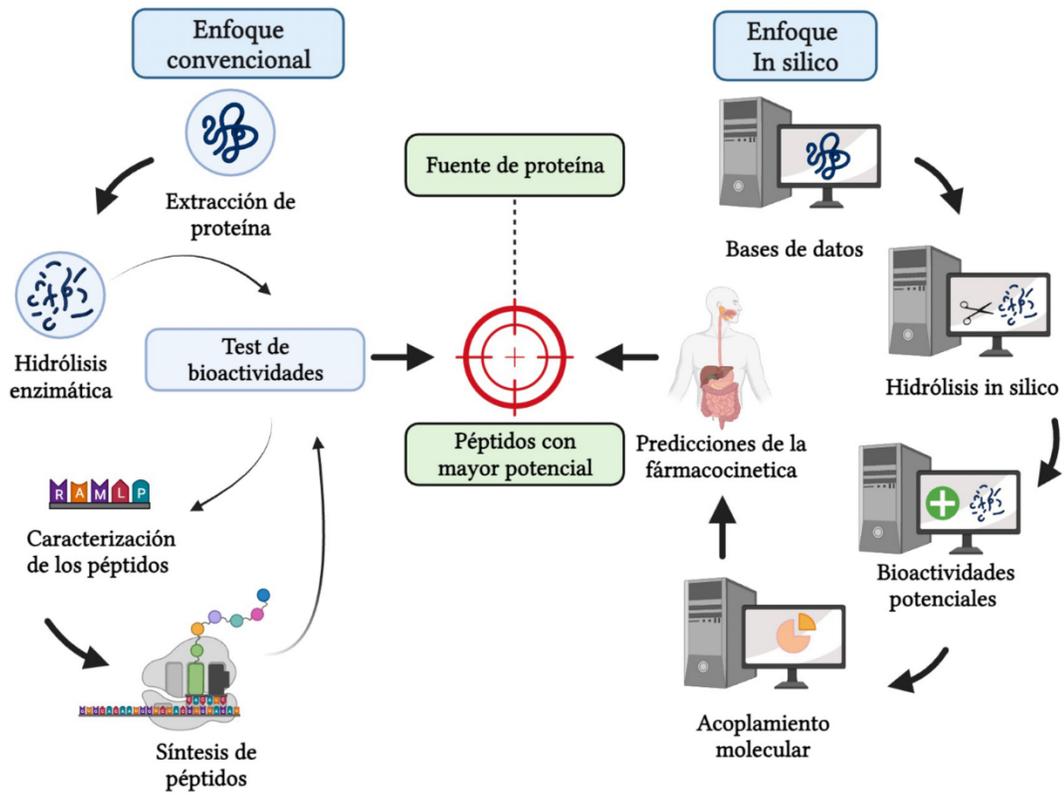


Figura 5. Enfoques convencional e In silico para el desarrollo de nutracéuticos.

2.9.1. Proteólisis In silico

Actualmente existen diversas plataformas que permiten realizar predicciones de hidrólisis enzimática In silico, entre las cuales destacan BIOPEP-UWM y PeptideCutter (Gasteiger et al., 2005; Minkiewicz et al., 2019). Estas herramientas permiten analizar los posibles sitios de escisión de las enzimas en una secuencia proteica utilizando como referencia la especificidad de las enzimas (Minkiewicz et al., 2019). La especificidad enzimática en las predicciones de proteólisis In silico se describe utilizando 2 términos, la secuencia de reconocimiento (secuencia de aminoácidos de una proteína reconocida) y una secuencia de corte (entendido como un residuo de aminoácido que procede al enlace hidrolizado por la proteasa (Minkiewicz et al., 2008). La precisión de la hidrólisis enzimática In silico ha sido validada a través de métodos experimentales, incluyendo el uso del cromatógrafo líquido acoplado a espectrometría de masas (LC-MS) (Lau ChingChing et al., 2013; Qiao et al., 2016). Particularmente, la plataforma BIOPEP-UWM permite realizar predicciones de hidrólisis enzimáticas utilizando entre 1 y 3 enzimas (Minkiewicz et al., 2019). Esta herramienta resulta de gran utilidad para la predicción de los péptidos que se liberan a través de diversas hidrólisis enzimáticas, permitiendo así la selección de enzimas con mayor potencial para el desarrollo de hidrolizados proteicos que posean un efecto biológico significativo.

2.9.2. Acoplamiento molecular

El análisis de acoplamiento molecular constituye una metodología teórica sustentada en la bioinformática. Esta técnica se fundamenta en el estudio detallado de las interacciones entre diversas moléculas, tales como ligandos y receptores, con el propósito de predecir sus patrones de unión y afinidad (Tao et al., 2020; Trott & Olson, 2010). Este proceso se facilita mediante el uso de

plataformas digitales especializadas, que permiten simular y visualizar las posibles conformaciones y afinidades entre las moléculas implicadas. (Pagadala et al., 2017). Estos estudios son fundamentales para la comprensión de mecanismos moleculares y para el desarrollo de agentes terapéuticos más eficaces.

Inicialmente se utilizaba el modelo de “la llave y la cerradura” propuesto por Fischer en 1894 para el reconocimiento molecular, el cual postula que el sitio activo de una enzima es específico y tiene una forma única, por lo cual, solo encaja con un sustrato (Śledź & Cafilisch, 2018). Sin embargo, este modelo tiene sus limitantes, ya que sugiere que la enzima y el ligando son estructuras rígidas. Por lo tanto, Koshland propuso la teoría del ajuste inducido, la cual postula que el sitio de unión de una proteína no es rígido, sino que es capaz de modificar su conformación para acomodar al ligando. Esta teoría fue respaldada por resultados de difracción de rayos X (Taratula et al., 2010). Por estas razones, actualmente se considera el principio básico del reconocimiento/acoplamiento molecular.

Los ensayos de acoplamiento molecular nos permiten predecir la posición y la afinidad de un ligando en un sitio de unión al receptor (Roche et al., 2015). La afinidad de un ligando puede cuantificarse debido a las diferentes interacciones que se establecen entre el ligando y receptor, entre las cuales se encuentran los puentes de hidrogeno, interacciones de van der Waals, interacciones electroestáticas e interacciones hidrofóbicas (Naqvi et al., 2018). Sin embargo, la flexibilidad del receptor juega un papel importante en el análisis de acoplamiento molecular. En este sentido, podemos encontrar 3 tipos de análisis de acoplamiento molecular: acoplamiento rígido, acoplamiento semiflexible y acoplamiento flexible. En el acoplamiento rígido no se modifica la estructura del receptor ni la del ligando, generalmente se utiliza entre macromoléculas (proteína-proteína) (Tao et al., 2020). El acoplamiento semiflexible se caracteriza porque la conformación del receptor

no se modifica, solamente cambia la conformación del ligando y tiene una gama más amplia de aplicaciones, aunque se suele usar entre una macromolécula y una molécula de menor tamaño (proteína-ligando) (Morris et al., 2009). El acoplamiento flexible permite que el receptor modifique su sitio de unión según la orientación del ligando y también es utilizado para el acoplamiento de proteína-ligando (Pagadala et al., 2017).

Uno de los softwares más utilizados para realizar los análisis de acoplamiento molecular es el AutoDock Vina (Butt et al., 2020; Tanchuk et al., 2016; Zhou et al., 2023). AutoDock Vina utiliza un algoritmo de optimización que combina métodos de búsqueda global y local, enfocado en explorar el espacio de manera amplia y, de la misma manera, en explorar las áreas prometedoras para encontrar el óptimo local más cercano (Trott & Olson, 2010). En este sentido, el algoritmo está diseñado para explorar eficientemente el espacio de configuraciones posibles de un ligando dentro del sitio activo o de unión de una proteína, con el fin de encontrar la conformación óptima que maximice la afinidad de unión (Tanchuk et al., 2016). En el algoritmo de búsqueda del software AutoDock Vina, se siguen una serie de pasos comenzando con una mutación (búsqueda global) donde ocurren ajustes en la posición, orientación y/o conformación, seguido de una optimización local de la nueva configuración proponiendo mejorando la afinidad mediante ajustes menores y encontrando el óptimo local. Una vez realizada la optimización local, el algoritmo evalúa si acepta o rechaza la nueva configuración mediante los criterios de Metrópolis comparando la energía de unión, principalmente si la nueva configuración tiene una energía igual o menor a la configuración inicial tiene altas probabilidades de aceptarse. Este proceso se repite generalmente hasta que se alcanza un criterio de convergencia donde la energía de unión se aleja de los valores de referencia durante varias repeticiones. Este enfoque mejora las posibilidades de encontrar la solución

óptima global que en estos casos sería la conformación con mayor afinidad al sitio de unión de una proteína (Trott & Olson, 2010).

2.9.3. Predicciones de las propiedades farmacocinéticas ADMET

Un fármaco exitoso debe conseguir un equilibrio entre su comportamiento bioquímico, parámetros farmacocinéticos y perfil de seguridad. Por lo tanto, un fármaco ideal, además de su potencia y selectividad, debe poder absorberse, ser biodisponible, distribuirse por el cuerpo, metabolizarse de manera que no se elimine su actividad de inmediato y eliminarse adecuadamente, y no presentar toxicidad (Cumming et al., 2013).

En el desarrollo de fármacos de manera tradicional, las evaluaciones de las propiedades farmacocinéticas se realizaban después de determinar su potencia hacia un objetivo específico (Selick et al., 2002). Sin embargo, se ha reportado que parámetros no adecuados de farmacocinética y toxicidad son causa de fracaso en las últimas etapas del desarrollo de fármacos. Por lo tanto, es recomendable que estas evaluaciones sean implementadas en etapas tempranas en el desarrollo de nuevos fármacos (van de Waterbeemd & Gifford, 2003). Por estas razones, existe un creciente interés por el uso de enfoques computacionales para guiar la selección de compuestos con potencial terapéutico con el fin de reducir el fracaso en el desarrollo debido a sus propiedades farmacocinéticas y, de este modo, los investigadores pueden centrar sus esfuerzos en los compuestos más prometedores (Cumming et al., 2013; Göller et al., 2020).

Las predicciones de las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas de diferentes compuestos moleculares son realizadas utilizando diferentes plataformas existentes que utilizan bases de datos de descriptores moleculares de fármacos y compuestos bioactivos evaluados y caracterizados experimentalmente, haciendo de esta forma predicciones a partir de la relación

cuantitativa estructura actividad (QSAR) y la relación cuantitativa estructura propiedad (QSPR) (Göller et al., 2020; Paul Gleeson et al., 2011). Los QSAR y los QSPR son modelos estadísticos y matemáticos que correlacionan parámetros estructurales con un atributo o capacidad determinada. Este enfoque se fundamenta en que la actividad biológica de un compuesto está relacionada con sus descriptores estructurales/moleculares, como interacciones intermoleculares, peso molecular, permeabilidad a la membrana, pKa, polaridad, entre otras características (Costa et al., 2021). Teniendo en cuenta que las propiedades de una molécula derivan fundamentalmente de su configuración, geometría y estructura molecular, se postula que, teniendo un conjunto de datos suficientemente amplio y descriptores estructurales precisos, es posible predecir cualquier propiedad de interés recurriendo solamente a la información estructural disponible del conjunto de datos analizado (Lounkine et al., 2008).

2.10. El garbanzo como fuente de péptidos bioactivos

El garbanzo se posiciona como la tercera leguminosa con mayor producción a nivel mundial, registrando una producción media de aproximadamente 11.5 millones de toneladas al año (Merga & Haji, 2019). Esta leguminosa tiene un papel muy importante en la nutrición debido a su alto contenido de proteína (20-25%) y un bajo aporte de grasa (5%), entre la cuál podemos encontrar ácidos grasos insaturados como el linoleico y oleico y algunos minerales como el K, Ca, Mg y P (Chavan et al., 1987). Además, es un alimento rico en vitaminas como la riboflavina, la niacina, la tiamina y el ácido fólico (Jukanti et al., 2012). Además de sus beneficios nutricionales, se ha reportado al garbanzo como una fuente potencial de péptidos bioactivos, entre los cuales podemos encontrar péptidos con actividad antihipertensiva, antioxidante y antidiabética (Chandrasekaran et al., 2020; Chandrasekaran & de Mejia, 2022; Figueroa-Salcido et al., 2024; Zan et al., 2023).

En este sentido, algunos estudios han evaluado el potencial de hidrolizados de proteínas de garbanzo como agente hipoglucemiante al inhibir a la enzima dipeptidil peptidasa IV *In vitro*. Chandrasekaran y colaboradores evaluaron la capacidad de hidrolizados de garbanzo con diferentes enzimas para producir péptidos con capacidad de inhibir a la DPP-IV. El hidrolizado con pepsina seguido con pancreatina reportó un IC_{50} de 0.245 mg/mL mientras que el hidrolizado con bromelina reportó un IC_{50} de 0.790 mg/mL (Chandrasekaran et al., 2020). Adicionalmente, Acevedo Martínez y colaboradores evaluaron el efecto de hidrolizados de garbanzo crudo, precocido y cocido y su potencial para inhibir a la DPP-IV, encontrando IC_{50} que van desde 0.17mg/mL hasta pruebas con 10mg/mL que no alcanzaron el IC_{50} (Acevedo Martínez & Gonzalezde Mejia, 2021). Aunque ya existen algunos hidrolizados de proteína de garbanzo con capacidad de inhibir a la DPP-IV *In vitro*, existe información limitada sobre las interacciones moleculares de los péptidos del garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV, sus propiedades farmacocinéticas, y que enzima genera el mejor perfil de péptidos bioactivos. Por lo tanto, en el presente proyecto se realizaron predicciones de hidrólisis enzimáticas con diversas enzimas, se evaluaron los valores de A_E y B_E para cada hidrólisis con el fin de seleccionar la enzima más adecuada para los ensayos *In vitro*, se realizaron análisis de acoplamiento molecular y predicciones de las propiedades farmacocinéticas, y se realizó la evaluación *In vitro* de inhibición de la DPP-IV con hidrolizados de proteínas de garbanzo.

3. HIPÓTESIS

Los hidrolizados enzimáticos de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) contienen péptidos con características hidrofóbicas que favorecen las interacciones con el sitio activo de la Dipeptidil Peptidasa IV produciendo su inhibición *In silico* e *In vitro*.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar *In silico* la capacidad de hidrolizados de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) para inhibir a la DPP-IV, sus propiedades farmacocinéticas e interacciones moleculares y optimizar las condiciones de hidrólisis *In vitro* mediante un análisis de superficie de respuesta.

Objetivos específicos:

Determinar la capacidad de péptidos de garbanzo liberados por hidrólisis enzimática de inhibir a la DPP-IV en un modelo *In silico*

Evaluar *In silico* las propiedades farmacocinéticas de péptidos de garbanzo con potencial para inhibir a la DPP-IV y predecir sus interacciones moleculares con esta enzima.

Optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática mediante un análisis de superficie de respuesta para obtener un hidrolizado de proteína de garbanzo con capacidad para inhibir *In vitro* a la DPP-IV.

Determinar el IC₅₀ del hidrolizado optimizado para obtener una mayor inhibición de la DPP-IV.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Metodología análisis In silico

La Figura 6 muestra el esquema general de la metodología de los análisis In silico. Brevemente, la estructura primaria de las proteínas del garbanzo (legumina UniProt ID: Q9SM y provicilina UniProt ID: Q304D4) se obtuvieron de la base de datos UniProtKB. Posteriormente, se utilizó la plataforma BIOPEP-UWM para realizar la búsqueda de péptidos inhibidores de la DPP-IV en las secuencias de legumina y provicilina. Las propiedades farmacocinéticas de los péptidos liberados a partir de las hidrólisis simuladas con potencial de inhibir a la DPP-IV fueron calculadas utilizando la plataforma ADMETLab2.0. Los péptidos con adecuados valores de ADMET (Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) y estructura PubChem reportada se utilizaron para hacer el análisis de acoplamiento molecular utilizando AutoDock Vina versión 1.1.2.

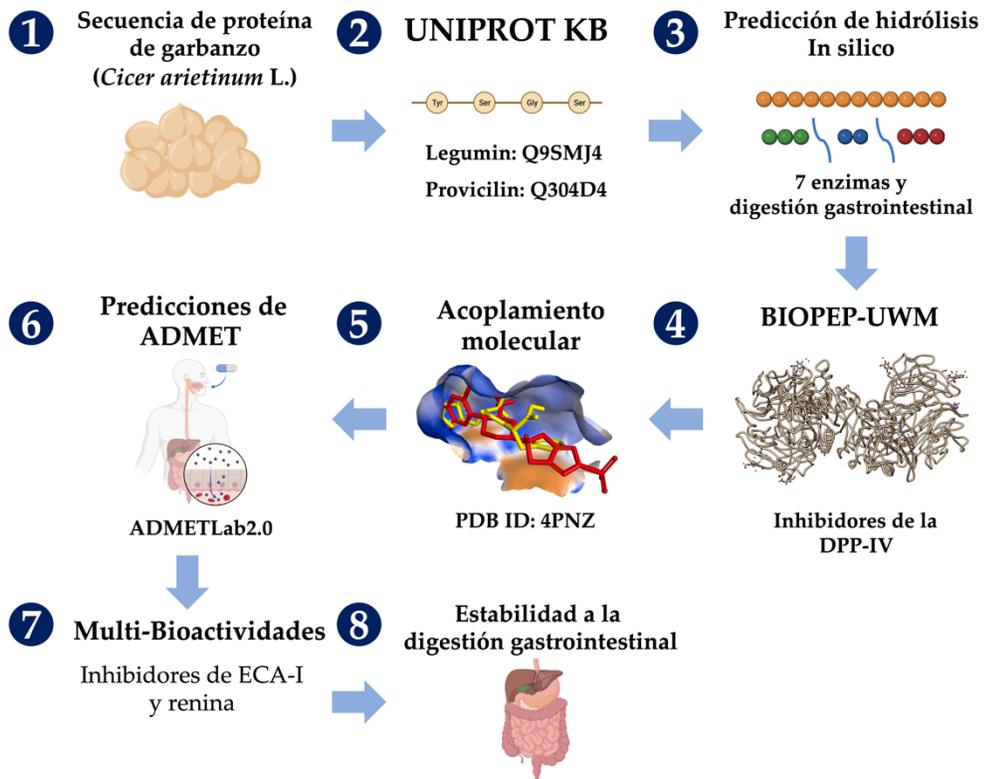


Figura 6. Esquema general de la metodología de los análisis In silico.

5.1.1. Análisis de los péptidos inhibidores de la DPP-IV provenientes del garbanzo

Se evaluaron las secuencias de proteínas legumina (UniProt ID: Q9SMJ4) y provicilina (UniProt ID: Q304D4) provenientes del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Se determinó la presencia de péptidos con capacidad de inhibir la DPP-IV utilizando la plataforma BIOPEP-UWM. Se determinaron los valores de frecuencia de aparición de fragmentos bioactivos “A” y el potencial de actividad inhibidora que es el valor de “B” con la herramienta “Calculo” disponible en la plataforma BIOPEP-UWM. El valor de A nos permite conocer la frecuencia con la que se encuentran péptidos con capacidad para inhibir a la DPP-IV en cada una de las proteínas evaluadas y el valor de B nos permite estimar el potencial de los péptidos de cada una de las proteínas evaluadas para llevar a cabo la actividad biológica. Las siguientes ecuaciones fueron utilizadas para determinar el valor de A y de B:

$$A = \frac{a}{N}$$

a = Número de péptidos con actividad inhibidora de la DPP-IV.

N = Número de aminoácidos de la proteína.

$$B = \frac{\sum_i^k = 1 \frac{a_i}{EC_{50i}}}{N}$$

a_i = Número de repeticiones de fragmentos inhibidores de la DPP-IV en la secuencia proteica.

k = Número de fragmentos únicos inhibidores de la DPP-IV.

N = Número de aminoácidos de la secuencia proteica.

EC_{50i} : Concentración media efectiva.

5.1.2. Predicción de hidrólisis enzimática

Se utilizó la herramienta “acción enzimática” disponible en la plataforma BIOPEP-UWM para realizar las predicciones de hidrólisis *In silico*. Las enzimas alcalasa (EC 3.4.24.62), papaína (EC 3.4.22.2), bromelina (EC 3.4.22.32), ficina (EC 3.4.22.3), pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4), quimiotripsina (EC 3.4.21.1) y una combinación de estas 3 (digestión gastrointestinal simulada) fueron utilizadas para realizar la hidrólisis enzimática simulada. La herramienta “Buscar fragmentos bioactivos” se utilizó para seleccionar los péptidos liberados a partir de la hidrólisis *In silico* con capacidad de inhibir a la DPP-IV de acuerdo con lo reportado por la base de datos de BIOPEP-UWM. Se calcularon los valores de frecuencia de aparición del fragmento inhibidor de la DPP-IV en cada hidrólisis “A_E” y el potencial inhibidor de la DPP-IV por cada enzima “B_E”. Valores altos de A_E corresponden a un mayor número de péptidos liberados con actividad inhibidora de la DPP-IV, por el contrario, valores bajos de B_E corresponden a un mayor potencial inhibidor de la DPP-IV de los péptidos liberados por cada una de las enzimas. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular el valor de A_E y B_E:

$$A_E = \frac{d}{N}$$

d= Número de péptidos inhibidores de la DPP-IV liberados por una enzima/enzimas.

N= Número de aminoácidos de la secuencia proteica.

$$B_E = \frac{\sum_j^I = 1 \frac{d_j}{EC_{50j}}}{N}$$

dj= Número de péptidos inhibidores de la DPP-IV repetidos que libera

l= Número de péptidos únicos liberados una hidrólisis determinada

N= Número de aminoácidos de la secuencia proteica.

EC50j: Concentración media efectiva.

5.1.3. Análisis de acoplamiento molecular

Las estructuras tridimensionales de los péptidos inhibidores de la DPP-IV se obtuvieron de la base de datos PubChem. Los péptidos se prepararon para el acoplamiento molecular añadiendo hidrógenos polares y asignando cargas. Los péptidos sin estructura 3D disponible se excluyeron del análisis de acoplamiento molecular. Se utilizó la estructura cristalográfica de la DPP-IV humana en complejo con el inhibidor Omarigliptin (PDB ID: 4PNZ) disponible en la plataforma Protein Data Bank.

La estructura de la DPP-IV se preparó para el análisis de acoplamiento molecular eliminando las moléculas de agua y el inhibidor de la DPP-IV “Omarigliptina” acoplado a la estructura cristalográfica. El acoplamiento se realizó utilizando la herramienta de acoplamiento flexible AutoDock Vina 1.1.2. Las coordenadas del sitio activo de la DPP-IV (PDB ID: 4PNZ) fueron x: 6.733, y: 62.839, z: 35.416, con un radio de 20 Å. Se establecieron los siguientes parámetros para el acoplamiento molecular: el número de patrones de unión por ligando =10, la integridad de la unión =8 y la diferencia de energía máxima entre patrones se =2 kcal/mol. Los análisis de acoplamiento molecular se validaron calculando la desviación cuadrática media (RMSD) entre el ligando predicho y el ligando cristalográfico (como se encuentra en la estructura cristalográfica) utilizando la plataforma DockingRMSD (Universidad de Michigan, Ann Arbor, MI, EE. UU.) (Roy et al., 2010). Se consideró aceptable un RMSD < 2 Å de separación entre la mejor predicción del ligando acoplado y el ligando cristalográfico. La mejor pose de cada péptido inhibidor se seleccionó en función de la energía de unión más baja resultante de las

predicciones de acoplamiento molecular. Se utilizó el software Discovery Studio v21.1.0 para visualizar las interacciones entre los residuos del sitio activo de la DPP-IV y los péptidos bioactivos. Se descartaron los acoplamientos moleculares con interacciones desfavorables. El fármaco acoplado a la estructura de la DPP-IV omarigliptina fue utilizado como control para el análisis del acoplamiento molecular.

5.1.5. Predicciones de ADMET

Se determinaron las potenciales propiedades farmacocinéticas de los péptidos inhibidores de la DPP-IV que tienen reportada una estructura en la plataforma PubChem. Los análisis de ADMET se llevaron a cabo utilizando la plataforma ADMETLab2.0 (Xiong et al., 2021). La secuencia de aminoácidos de los péptidos con capacidad de inhibir a la DPP-IV se tradujeron a formato SMILES utilizando la plataforma BIOPEP-UWM. Posteriormente, la secuencia en formato SMILES de los péptidos inhibidores de la DPP-IV se ingresaron en la plataforma ADMETLab2.0 y se calcularon las siguientes propiedades para cada uno de los péptidos inhibidores de la DPP-IV: (1) regla de Lipinski; (2) absorción intestinal humana (HI; VO: 20-30%); (4) volumen de distribución (VO: 0.04-20L/kg); (5) vida media (VO: $\geq 0,5$ horas); (6) toxicidad aguda oral en ratas (VO > 500 mg/kg). Las características de las propiedades ADMET de los péptidos inhibidores de la DPP-IV se interpretaron con base a los criterios descritos por la plataforma ADMETLab2.0.

5.1.6. Multi-bioactividad y digestión gastrointestinal

A los péptidos sometidos al análisis de acoplamiento molecular se les determinaron bioactividades distintas a la inhibición de la DPP-IV, así como su susceptibilidad a la digestión gastrointestinal simulada (pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina (EC 3.4.21.1)), utilizando la plataforma BIOPEP-UWM.

5.2. Ensayos *In vitro*

5.2.1. Extracción de proteínas del garbanzo

Se utilizó el garbanzo de la variedad "Blanco Sinaloa 92" para la obtención del aislado proteico siguiendo la metodología reportada por Chávez-Ontiveros y col., 2022 (Chávez-Ontiveros et al., 2022). Se realizó un proceso de molienda de los granos de garbanzo para obtener la harina. Posteriormente, la harina pasó por un proceso de extracción de grasa utilizando acetona (1:4 p/v) y se mantuvo en agitación continua durante 4 horas. Una vez obtenida la harina desgrasada, se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, la harina se resuspendió en agua destilada (1:10 p/v), se ajustó el pH a 8.5 con NaOH a 1M y se mantuvo en agitación durante 2h. Posterior a las 2h, la suspensión se centrifugó a 10,000g x 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y al pellet se le aplicó el mismo tratamiento. Posteriormente, se mezclaron los sobrenadantes y se ajustó a un pH de 4.5 con HCl a 1M. La suspensión se mantuvo en agitación durante 2 h y posteriormente se centrifugó a 10,000g x 10 minutos a 4°C. Finalmente, se recuperaron los pellets, se liofilizaron y se almacenaron a -20°C (Figura 7). El contenido de proteína del aislado proteico se determinó mediante un ensayo micro kjeldahl (AACC 960.52).

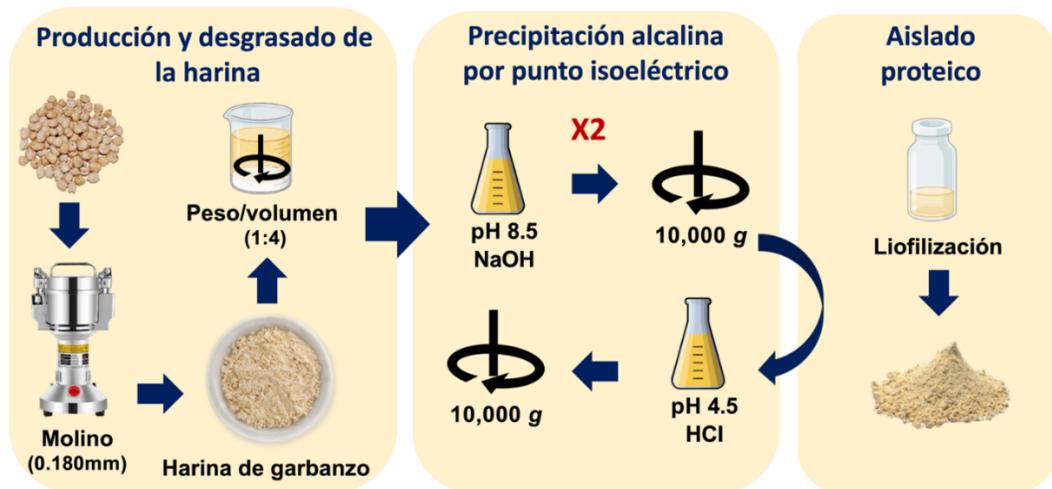


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología utilizada para la extracción de proteína.

5.2.2. Análisis de superficie de respuesta

Se utilizó el modelo Box-Behnken para realizar el análisis de superficie de respuesta. La enzima seleccionada para las hidrólisis fue la Alcalasa (Alcalase ≥ 2.4 U/g, Sigma- Aldrich). Los puntos centrales se determinaron a partir de condiciones de hidrólisis reportadas para obtener hidrolizados proteicos con capacidad de inhibir a la DPP-IV (Tabla 3).

Los factores por optimizar fueron la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), concentración enzima/sustrato (U/g) y tiempo (h) y se utilizaron un total de 3 niveles por factor (-1, 0, +1) (Tabla X). Se consideraron un total de 5 réplicas para los puntos centrales. Un total de 2 réplicas fueron utilizadas para los puntos factoriales. La variable de respuesta fue la inhibición de la DPP-IV. A partir de estas condiciones, se generó una hoja de trabajo con las diferentes condiciones experimentales (Tabla 4).

Tabla 3. Estudios de hidrólisis con alcalasa en alimentos de origen vegetal para la producción de hidrolizados con capacidad de inhibir a la DPP-IV.

Blanco	Alimento	Temperatura	pH	Tiempo	E/S ratio	Inactivación	Artículo
DPP-IV	Avena	37°C	10	4h	8 μL/100 mg	85°C 10 min	(Ramírez Fuentes et al., 2021)
DPP-IV	Frijol pinto	50°C	8	2h	1:17 (E/S)	75 °C 20 min.	(Oseguer a-Toledo et al., 2015)
DPP-IV	Frijol negro	50°C	7	2h	1:20 (E/S)	75°C 20 min	(Mojica & Mejía, 2016)
DPP-IV	Frijol Bambara	55°C	7	24h	4%	95°C 5 min	(Mune Mune et al., 2018)
DPP-IV	Microalgas	66.85°C	8.2	6h	1:100 (E/S)	91.8°C 10 min	(Villaró et al., 2023)

Tabla 4. Factores y niveles utilizados para realizar el análisis de superficie de respuestas

Factores	Nivel codificado		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40	50	60
Concentración E/S (U/g)	0.2	0.3	0.4
Tiempo (h)	2	3	4

5.2.3. Hidrólisis con Alcalasa

Se resuspendieron 15 mg del aislado proteico en 1 mL de buffer BIS-TRIS-Propano (20 mM). La suspensión se sónico durante 10 minutos utilizando un homogeneizador ultrasónico (Modelo 150 V/T) configurado la potencia al 40% y pulsador al 30%. Posteriormente, la muestra fue agitada a 1200 rpm a una temperatura de 50°C durante 10 min. La alcalasa se agregó una vez que la temperatura de cada condición se ajustó conforme a los requerimientos específicos del diseño experimental (Tabla 5). Las reacciones se llevaron a cabo en un ThermoMixer Eppendorf. Las hidrólisis fueron detenidas ajustando la temperatura a 90°C durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos, se recolectaron los sobrenadantes y fueron almacenados a -20°C hasta su siguiente uso.

Tabla 5. Condiciones para el análisis de superficie de respuesta.

Experimento	Tiempo (H)	Temperatura (°C)	Concentración E/S (U/g)
R1	2	40	0.3
R2	4	40	0.3
R3	2	60	0.3
R4	4	60	0.3
R5	2	50	0.2
R6	4	50	0.3
R7	2	50	0.4
R8	4	50	0.4
R9	3	40	0.2
R10	3	60	0.2
R11	3	40	0.4
R12	3	60	0.4
R13	3	50	0.3
R14	3	50	0.3
R15	3	50	0.3
R16	3	50	0.3
R17	3	50	0.3

E/S: Enzima/Sustrato

5.2.4. Determinación del porcentaje de inhibición de la DPP-IV

El porcentaje de inhibición de la DPP-IV se determinó utilizando el kit de inhibición de Sigma-Aldrich (Código de catálogo: MAK203). La actividad de la DPP-IV se mide por la capacidad de esta enzima de escindir un sustrato para obtener un producto fluorescente. La enzima y el sustrato fluorogénico fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante. Primeramente, se agregaron 25 μ L de las muestras por evaluar en cada uno de los pocillos (control positivo, control negativo, blanco, buffer, hidrolizados). Posteriormente, se agregaron 25 μ L del buffer de ensayo con el sustrato fluorogénico (23 μ L buffer ensayo: 2 μ L sustrato fluorogénico) y se dejó en incubación a 37 °C por 10 min. Finalmente, se agregaron 50 μ L del buffer de ensayo con la enzima para comenzar la reacción (49 μ L buffer ensayo: 1 μ L enzima) (Tabla 6). Se consideró como control positivo la reacción en la que no había ningún tipo de muestra inhibidora. La actividad de la DPP-IV fue determinada utilizando un lector de fluorescencia (Varioskan™ LUX, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) con una longitud de onda de excitación y emisión de 360 y 460 nm, respectivamente.

El porcentaje de inhibición de la DPP-IV se determinó calculando la pendiente de la reacción enzimática entre dos puntos del tiempo (T1 y T2) que siguen un comportamiento lineal en la cinética de reacción de las muestras y su respectiva fluorescencia (FLU) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Pendiente} = (\text{FLU2} - \text{FLU1}) / (\text{T2} - \text{T1}) = \Delta\text{FLU}/\text{minuto}$$

El porcentaje de inhibición relativa se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición relativa} = \frac{(\text{Pendiente}_{\text{EC}} - \text{Pendiente}_{\text{SM}})}{\text{Pendiente}_{\text{EC}}} \times 100\%$$

Donde:

Pendiente $_{SM}$: Pendiente del inhibidor de muestra.

Pendiente $_{EC}$: Pendiente del control

Tabla 6. Determinación de la inhibición de la DPP-IV

	Control Positivo	Control Negativo	Blanco	Control BTP	Muestra (1:8)	Muestra (1:4)	Muestra (1:2)	Muestra
	Buffer de Ensayo (25 μ L)	Sitagliptina (25 μ L)	Hidrolizado (25 μ L)	BTP (25 μ L)	Hidrolizado (25 μ L)	Hidrolizado (25 μ L)	Hidrolizado (25 μ L)	Hidrolizado (25 μ L)
Buffer de Ensayo	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L	23 μ L
Sustrato	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L

Incubación a 37°C durante 10 minutos

Buffer de Ensayo	49 μ L	49 μ L	50 μ L	49 μ L				
Enzima (DPP-IV)	1 μ L	1 μ L	----	1 μ L				

5.2.5. Concentración media inhibitoria (IC₅₀)

La determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀) de los hidrolizados de proteína de garbanzo se realizó mediante análisis de regresión no lineal utilizando ocho concentraciones diferentes del hidrolizado. La concentración de proteína soluble se determinó con el ensayo del Ácido Bicinconínico. La concentración media inhibitoria necesaria para inhibir el 50% de la enzima fue definida como IC₅₀ y expresada como mg/mL.

5.2.6. Análisis estadístico

Los datos cualitativos se presentan como números y porcentajes. Se evaluó la distribución de los datos mediante una prueba de Shapiro-Wilk. La diferencia entre los porcentajes de inhibición de la DPP-IV de los hidrolizados se determinó por una prueba T. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

Parte de los resultados que se presentan en este trabajo, fueron publicados en el Journal “Pharmaceuticals” de la editorial MDPI en el artículo titulado “Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides from Chickpea Proteins (*Cicer arietinum* L.): Pharmacokinetics, Molecular Interactions, and Multi-Bioactivities” (doi: <https://doi.org/10.3390/ph16081109>) (Mora-Melgem et al., 2023) el cual se anexa al final del documento (Anexo I).

Adicionalmente, como parte del desarrollo integral, durante el curso del programa de posgrado en Ciencias de la Nutrición y Alimentos Medicinales se participó en diversas actividades académicas como ponente en congresos internacionales en modalidad cartel, ponente de talleres y demostraciones científicas en el marco de las Jornadas Universitarias del Conocimiento UAS 2022-2023 y una ponencia como invitado en conmemoración del Día Mundial de la Diabetes (Anexos II-VII).

6.1. Predicciones de Frecuencia y potencia de péptidos para inhibir a la DPP-IV (Valores de A, B, A_E y B_E).

En el presente estudio se llevaron a cabo hidrólisis enzimáticas simuladas de las principales proteínas del grano de garbanzo (provilicina y legumina) y se realizaron predicciones del potencial de los péptidos derivados la hidrólisis para inhibir la enzima DPP-IV utilizando la plataforma BIOPEP-UWM. La tabla 7 muestra la frecuencia (A) y potencia (B) de los péptidos inhibidores de la DPP-IV de las secuencias proteicas de la legumina y provicilina, así como la frecuencia (A_E) y la potencia (B_E) de los péptidos obtenidos con capacidad para inhibidor a la DPP-IV a partir de cada hidrólisis enzimática. Los valores de A y B para cada una de las proteínas: Provicilina (A: 0.6093), (B: 0.0003526629028523) y Legumina (A: 0.5847), (B: 0.0002483186581999).

Respecto a los valores de A_E de las hidrólisis simuladas de legumina, las predicciones mostraron que la hidrólisis con papaína ($A_E=0.0927$), bromelina ($A_E=0.0867$) y ficina ($A_E=0.0484$) liberan una mayor cantidad de péptidos inhibidores de la DPP-IV que las otras enzimas utilizadas (Tabla 7). Con respecto a la provicilina, las predicciones mostraron que la hidrólisis con bromelina ($A_E=0.0817$), papaína ($A_E=0.0795$), ficina ($A_E=0.0728$) y alcalasa ($A_E=0.0662$) son las que liberan una mayor cantidad de péptidos inhibidores de la DPP-IV (Tabla 7).

Con relación a los valores de B_E de las hidrólisis simuladas de legumina y provicilina, las predicciones mostraron que la hidrólisis con tripsina ($B_E=6.8625336714504E-7$), quimiotripsina ($B_E=3.2429337219228E-5$), pepsina ($B_E=4.7635643240156E-5$) y pepsina ($B_E=5.3720267147866E-6$), alcalasa ($B_E=9.1420948488684E-6$), papaína ($B_E=2.5172135076017E-5$) liberan los péptidos inhibidores de la DPP-IV con mayor potencia reportada a partir de la provicilina y la legumina, respectivamente (Tabla 7) (redactar como en el párrafo anterior, para dar mayor claridad).

Tabla 7. Frecuencia y potencia de péptidos inhibidores de la DPP-IV en la secuencia e hidrolizados de la legumina y provicilina de garbanzo.

Proteína	A	B	Enzima	A _E	B _E
Provicilina	0.6093	0.000352	Pepsina	0.022	4.7635643240156E-5
			Quimiotripsina	0.0287	3.2429337219228E-5
			Tripsina	0.0088	0.068625336714504E-5
			Gastrointestinal	0.0596	6.7698735295912E-5
			Papaína	0.0795	8.271490429923E-5
			Ficina	0.0728	6.4223543298536E-5
			Bromelina	0.0817	6.0467750947608E-5
			Alcalasa	0.0662	16.5417E-5
Legumina	0.5847	0.000248	Pepsina	0.0141	0.53720267147866E-5
			Quimiotripsina	0.0423	1.302957714179E-5
			Tripsina	0.0040	0
			Gastrointestinal	0.0585	1.8401603856577E-5
			Papaína	0.0927	2.5172135076017E-5
			Ficina	0.0484	4.2932403610376E-5
			Bromelina	0.0867	0
			Alcalasa	0.0383	0.91420948488684E-5

A = Frecuencia de aparición de péptidos inhibidores de la DPP-IV en la secuencia proteica; B = Potencia de la inhibición de la DPP-IV de los péptidos encriptados en la proteína; A_E = frecuencia de aparición de los péptidos inhibidores de la DPP-IV por una enzima seleccionada; B_E = Actividad potencial de los péptidos inhibidores de la DPP-IV liberados por una enzima seleccionada. Los valores más altos de A y A_E equivalen a una frecuencia más alta de péptidos inhibidores de DPP-IV. Los valores más bajos de B y B_E equivalen a una actividad inhibidora de DPP-IV de mayor potencia de la secuencia de proteínas y de péptidos liberados por las diferentes enzimas seleccionadas, respectivamente.

En los anexos VII al XIV se muestran los péptidos liberados a partir de las hidrólisis simuladas de la legumina y la provicilina del garbanzo con capacidad de inhibir a la DPP-IV. Se presenta la enzima utilizada en la hidrólisis simulada, el ID de BIOPEP de cada péptido liberado, su ubicación en la secuencia de la proteína en formato FASTA o estructura lineal, así como su peso molecular. Además, se indica si existe reporte de la concentración media inhibitoria (EC_{50}) de cada péptido.

De manera general, las predicciones mostraron que se pueden liberar un total de 381 péptidos con capacidad para inhibir la DPP-IV a partir de la hidrólisis con las diferentes enzimas utilizadas. De los cuales, 191 péptidos pertenecían a la legumina y 190 a la provicilina. En cuanto al número de residuos, de los 381 péptidos con capacidad para inhibir a la DPP-IV, 376 fueron dipéptidos y 5 tripéptidos, identificando un total de 92 péptidos con secuencia única (Anexos VIII-XV).

Las hidrólisis simuladas con las enzimas gastrointestinales humanas predijo la liberación de 5 péptidos inhibidores de la DPP-IV por la hidrólisis con tripsina, 12 con pepsina, 17 con quimiotripsina y 31 con la digestión gastrointestinal. Estos péptidos derivan en mayor proporción de la legumina (52-66%), con un peso molecular de 188 a 221 Da y una concentración media inhibitoria de 74 hasta 2615.03 μ M (Anexos VIII-XI).

En cuanto a las enzimas de uso industrial, se predijo una liberación de 28 péptidos inhibidores de la DPP-IV por la hidrólisis con ficina, papaína o alcalasa, y 40 para la bromelina. La mayor cantidad de péptidos fue liberada de la provicilina (50–65.6%) en las hidrólisis con papaína, alcalasa y ficina. La hidrólisis de legumina con bromelina libera una mayor cantidad de péptidos inhibidores de la DPP-IV comparado con la provicilina (25 vs 15). El peso molecular de los péptidos inhibidores de la DPP-IV varía de 172 a 328 Da y

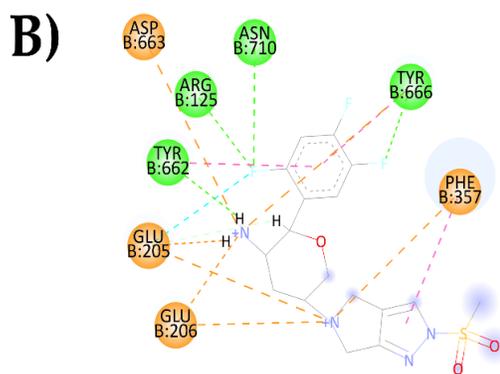
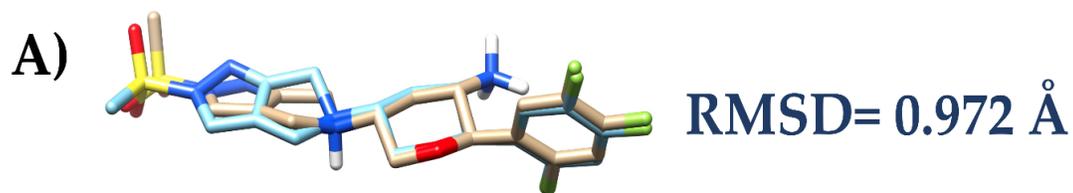
tienen una concentración media inhibitoria reportada de 49 hasta 2615.03 μM (Anexos XII-XV).

6.2. Análisis de Acoplamiento Molecular

6.2.1. Validación de las coordenadas del sitio activo de la estructura cristalográfica de la DPP-IV.

Se validaron las coordenadas del sitio activo calculando la desviación cuadrática media (RMSD) entre la posición predicha del ligando después de un acoplamiento molecular y la posición original del ligando en la estructura cristalográfica de la enzima. El RMSD entre la posición predicha del ligando obtenida después del análisis de acoplamiento molecular en las coordenadas del sitio activo de la DPP-IV ($x: -6.733$; $y: 62.839$; $z: 35.416$, radio de 20 Å) y la pose del ligando acoplado a la estructura cristalográfica fue de 0.972 Å (Figura 8 A).

Las interacciones predichas en la mejor posición del ligando extraído de la estructura cristalográfica de la DPP-IV después del acoplamiento molecular fueron similares a las interacciones observadas del ligando en la estructura cristalográfica original (Figura 8 B y C, respectivamente). En ambos casos, se observó un puente de hidrógeno entre ligando y la TYR⁶⁶² del pocket S1 del sitio activo de la DPP-IV. En el pocket S2, se encontraron interacciones electrostáticas entre el ligando y los residuos ácido glutámico 205 y 206 (GLU²⁰⁵ y GLU²⁰⁶), además de un puente de hidrógeno con la arginina 125 (ARG¹²⁵). También, se identificó una interacción electrostática entre el ligando y la fenilalanina 357 (PHE³⁵⁷) del pocket S2' y un puente de hidrógeno con la asparagina 710 (ASN⁷¹⁰) del sitio activo de la DPPV. La única interacción que no se pudo predecir en el acoplamiento molecular fue el puente de hidrógeno con la serina 209 (SER²⁰⁹) del pocket S2' de la posición original del ligando en la estructura cristalográfica.



Interactions

 Salt Bridge

 Attractive Charge

 Conventional Hydrogen Bond

 Carbon Hydrogen Bond

 Halogen (Fluorine)

 Pi-Cation

 Pi-Pi Stacked

 Pi-Pi T-shaped

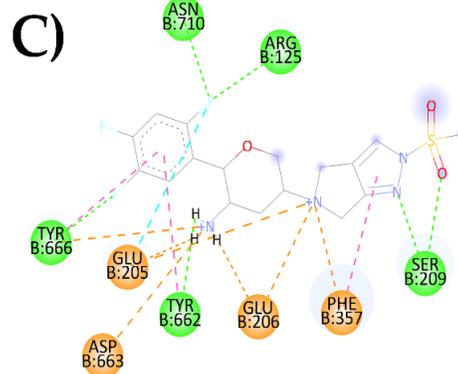


Figura 8. Validación del sitio activo para realizar el acoplamiento molecular. A) Posiciones superpuestas de la Omarigliptina cristalográfica y la mejor conformación acoplada de la Omarigliptina. B) Interacciones moleculares de la mejor conformación acoplada de la Omarigliptina con el sitio activo de la DPP-IV. C) Interacciones moleculares de la Omarigliptina cristalográfica con el sitio activo de la DPP-IV. Siglas. RMSD: Desviación cuadrática media.

6.2.2. Acoplamiento molecular de péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV.

Se utilizaron los péptidos liberados a partir de las hidrólisis enzimáticas que contaban con estructura PubChem reportada para realizar el análisis de acoplamiento molecular. Un total de 46 péptidos cumplieron con los criterios para el análisis. En la Tabla 8 se muestra la energía de unión (kcal/mol) de los péptidos con el sitio activo de la DPP-IV, la proteína de la cual provienen y la hidrólisis específica que facilitó su liberación. La energía de unión de los péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV fue desde -5.2 kcal/mol hasta -7.9 kcal/mol. El péptido con menor energía de unión fue el His-Phe (-7.9 kcal/mol), seguido del Ile-Trip (-7.8 kcal/mol), Tyr-Phe (-7.8 kcal/mol) y Gln-Phe (-7.7 kcal/mol). Un total de 32 péptidos se originaron de la hidrólisis de la provicilina y 33 procedían de la legumina; esta superposición numérica se debe a la presencia de algunos péptidos que están encriptados en ambas secuencias proteicas.

Se predijo que todos los péptidos pueden interactuar con al menos un pocket del sitio activo de la DPP-IV mediante puentes de hidrógeno (Figura 9 A) y el 76.1% (n=35) pueden establecer interacciones electrostáticas con los residuos del pocket S2 (GLU²⁰⁵, GLU²⁰⁶ y ARG¹²⁵). Además, de los 46 péptidos sometidos al acoplamiento molecular, se predijo que 30 (65,2%) podrían formar interacciones hidrofóbicas con el sitio activo de DPP-IV, principalmente con el pocket S1 (TYR⁶³¹, VAL⁶⁵⁶, TYR⁶⁵⁹, TYR⁶⁶²) y el pocket S2' (PHE³⁵⁷) (Figura 9 C).

Tabla 8. Energía de unión del acoplamiento molecular de los péptidos de garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV.

Péptido	BIOPEP ID	Energía de unión (Kcal/Mol)	Proteína	Locación	Liberado	Pubchem ID
HF	8791	-7.9	Provicilina	426-427	Bromelina; Alcalasa	152198
			Legumina	473-474	Bromelina; Alcalasa; Pepsina; Papaína	
IW	8807	-7.8	Legumina	457-458	Alcalasa	7019084
YF	8935	-7.8	Provicilina	95-96	Bromelina	7009600
			Legumina	99-100	Bromelina; Papaína	
QF	8870	-7.7	Provicilina	153-154	Gastrointestinal; Papaína; Ficina	57288566
			Legumina	61-62	Gastrointestinal; Papaína; Ficina	
YL	8940	-7.6	Legumina	182-183	Pepsina; Papaína; Bromelina	87071
FR	8780	-7.5	Legumina	135-136	Tripsina	150903
KF	8809	-7.1	Legumina	124-125	Bromelina; Alcalasa	151410
VF	8917	-7.1	Provicilina	58-59 122-123	Papaína; Alcalasa	6993120
			Legumina	103-104	Quimotripsina;	
				148-149 403-404	Gastrointestinal; Ficina; Alcalasa	
YA	8932	-7.1	Legumina	384-385 394-395	Bromelina	7020632
HL	8557	-7	Provicilina	72-73	Pepsina; Papaína; Bromelina; Alcalasa	189008
NR	8849	-7	Provicilina	162-163	Papaína; Ficina; Bromelina	14299174
			Legumina	133-134 225-226	Bromelina	

PH	8856	-7	Provicilina	295-296	Quimotripsina; Gastrointestinal; Ficina	9856353
GF	8782	-6.9	Provicilina	63-64 375-376 377-378	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Alcalasa	92953
			Legumina	212-213 312-313	Quimotripsina; Gastrointestinal; Alcalasa	
GY	8788	-6.9	Legumina	98-99	Quimotripsina; Gastrointestinal	92829
PF	8854	-6.9	Provicilina	362-363	Quimotripsina; Gastrointestinal; Ficina	6351946
			Legumina	471-472	Bromelina	
SF	8891	-6.9	Provicilina	176-177	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Papaína	7009597
			Legumina	10-11 347-348	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Papaína	
TF	8900	-6.9	Provicilina	110-111	Gastrointestinal; Ficina	7010580
IPA	8304	-6.7	Provicilina	357-359	Bromelina	10040393
YV	8946	-6.7	Legumina	433-434	Bromelina	7009560
DR	8769	-6.6	Provicilina	203-204 416-417	Tripsina; Gastrointestinal; Ficina; Bromelina	16122509
			Legumina	440-441 429-430	Gastrointestinal; Ficina; Bromelina	
IR	8806	-6.6	Provicilina	442-443	Tripsina; Gastrointestinal; Ficina	7021814
ET	8774	-6.5	Legumina	109-110	Bromelina	6998031
PT	8863	-6.5	Legumina	144-145	Bromelina	53860028
IL	8802	-6.3	Provicilina	139-140 168-169 304-305 449-450	Gastrointestinal; Papaína; Ficina; Bromelina; Alcalasa	7019083

			Legumina	382-383	Ficina; Bromelina; Alcalasa	
QP	8532	-6.3	Provicilina	431-432	Papaína	11736661
			Legumina	25-26		
VE	8916	-6.3	Provicilina	56-57	Alcalasa	7009623
VN	8924	-6.3	Legumina	132-133 224-225	Quimotripsina; Gastrointestinal	7020201
VQ	8925	-6.3	Provicilina	340-341	Alcalasa	7016045
EG	8770	-6.1	Legumina	48-49 121-122 137-138	Papaína; Ficina; Bromelina	6427052
ES	8773	-6.1	Provicilina	244-245	Ficina; Alcalasa; Bromelina	6995653
			Legumina	116-117	Ficina; Bromelina	
HP	8520	-6	Legumina	477-478	Papaína	152322
VL	8922	-6	Provicilina	92-93 101-102 104-105 124-125 186-187	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Papaína; Ficina; Alcalasa	6993117
IN	8804	-5.9	Provicilina	378-379	Papaína	7016080
			Legumina	444-445	Quimotripsina; Gastrointestinal; Alcalasa	
KG	8810	-5.9	Provicilina	311-312	Papaína; Bromelina	7022320
			Legumina	248-249 387-388	Papaína; Bromelina	
PK	8858	-5.9	Provicilina	195-196	Tripsina; Gastrointestinal; Ficina	9209431
SL	8560	-5.9	Provicilina	6-7 61-62 128-129 291-292	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Papaína	7015694
			Legumina	8-9 78-79 364-365 426-427	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Papaína	

VI	8920	-5.9	Provicilina	217-218	Alcalasa	7010531
				37-38		
VS	8926	-5.9	Provicilina	67-68	Ficina; Alcalasa	6992640
				241-242		
			Legumina	162-163	Alcalasa	
IA	8525	-5.8	Provicilina	69-70		
				166-167	Bromelina	7009577
			Legumina	160-161		
				422-423		
VK	8921	-5.8	Legumina	245-246	Tripsina; Gastrointestinal; Ficina; Alcalasa	168058
				247-248		
VT	8927	-5.8	Provicilina	120-121	Alcalasa	9815826
			Legumina	345-346	Papaína	
GL	8561	-5.7	Provicilina	74-75	Quimotripsina; Pepsina; Gastrointestinal; Alcalasa	1548899
SK	8894	-5.7	Provicilina	230-231	Gastrointestinal	16122513
PG	8855	-5.6	Provicilina	409-410	Papaína; Ficina; Bromelina	6426709
			Legumina	105-106	Papaína; Ficina; Bromelina	
				463-464		
VG	8918	-5.5	Provicilina	317-318	Papaína; Ficina	6993110
MA	3173	-5.2	Legumina	1-2	Bromelina	7009581

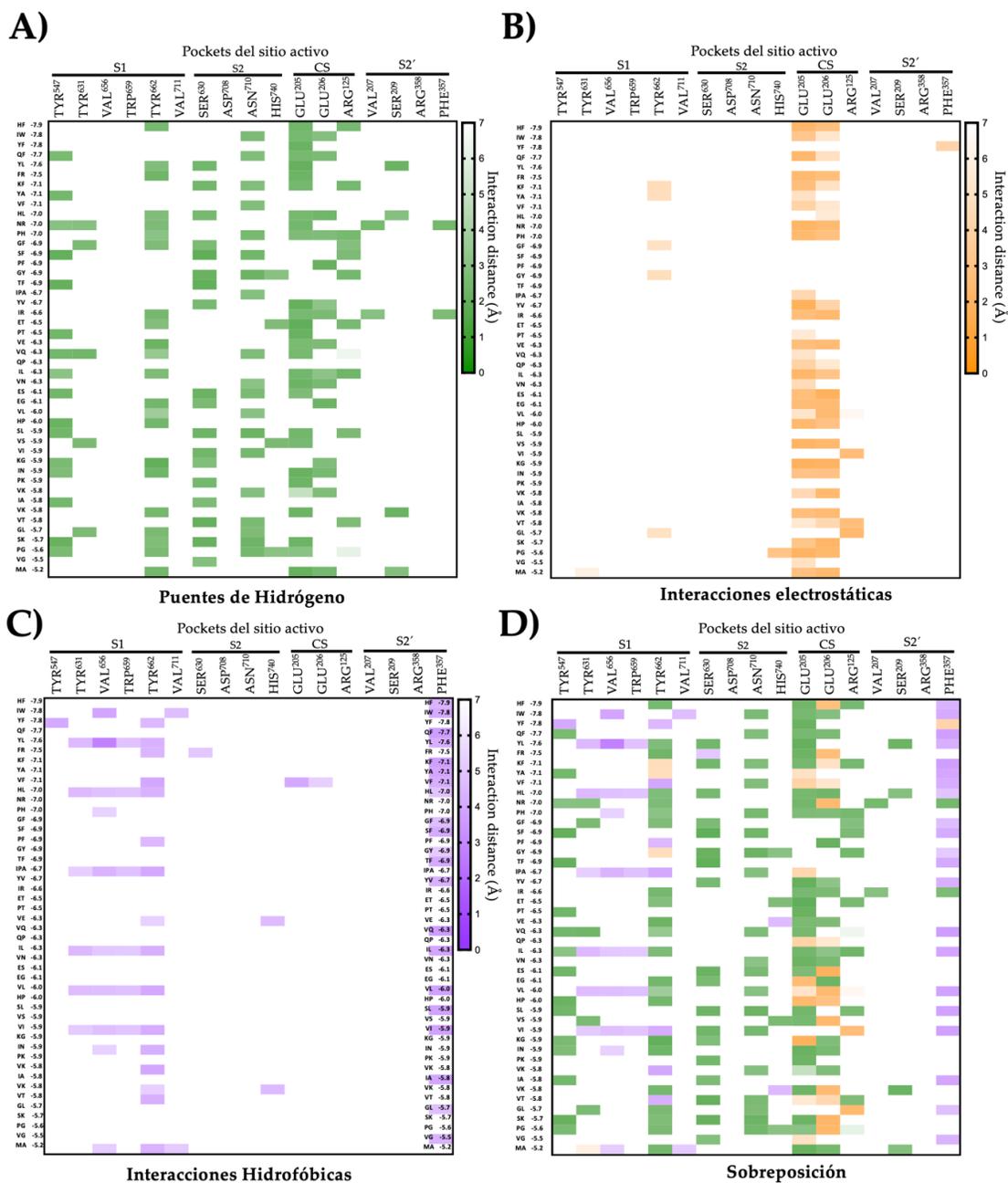


Figura 9. Interacciones entre los péptidos de garbanzo con los residuos de aminoácidos del sitio activo de la DPP-IV. (A) Puentes de hidrógeno; (B) Interacciones electrostáticas; (C) Interacciones hidrofóbicas; (D) Interacciones sobrepuestas.

En la figura 10A se muestra la posición y las interacciones del péptido con menor energía de unión predicha por el análisis de acoplamiento molecular (His-Phe, -7,9 kcal/mol) superpuesto con la posición del fármaco omarigliptina en la estructura cristalográfica de la DPP-IV. Se predijo en el análisis de acoplamiento molecular que el péptido His-Phe puede establecer cuatro interacciones electrostáticas con los residuos Glu²⁰⁵ y Glu²⁰⁶ del pocket S2 (Figura B). Además, el residuo His del péptido puede interactuar con los residuos Arg¹²⁵ y Tyr⁶⁶² del pocket S2 a través de puentes de hidrógeno fuertes (<3 Å) (Figura 10B). Por otro lado, el residuo Phe puede establecer interacciones hidrofóbicas con otros aminoácidos no polares, mejorando la estabilidad del complejo péptido/sitio activo de la DPP-IV.

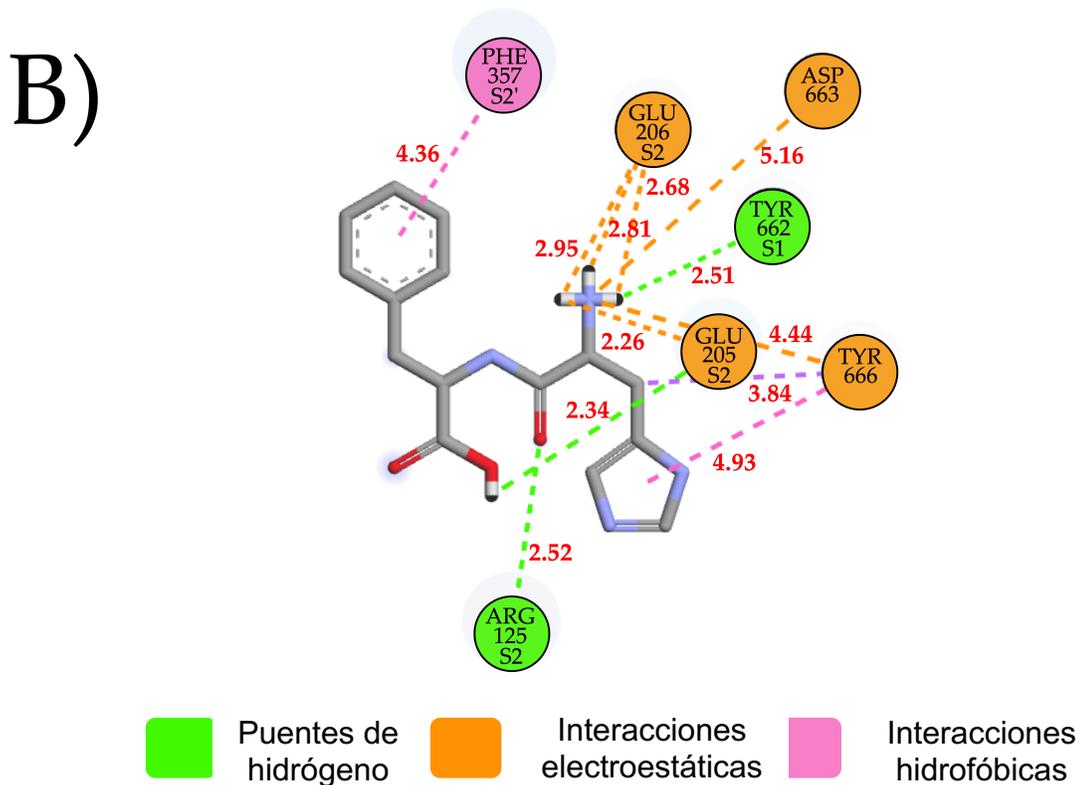
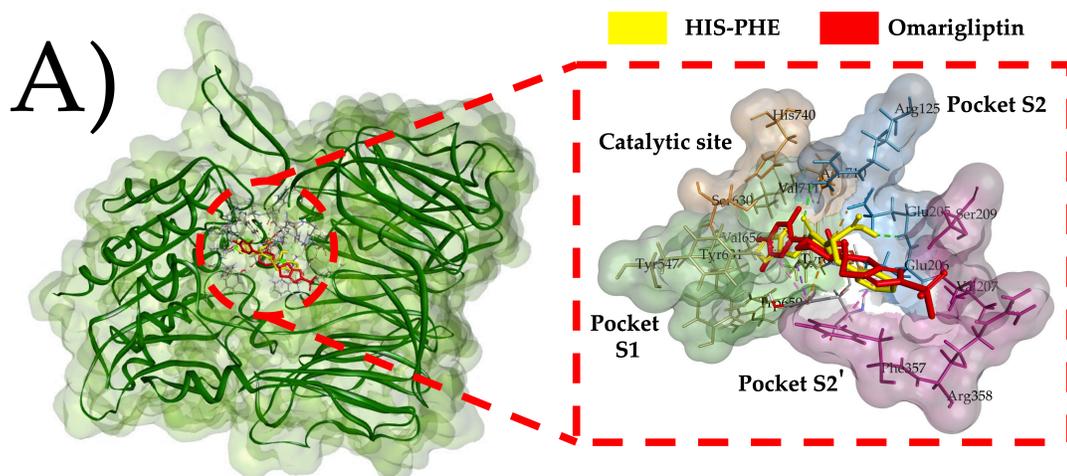


Figura 10. Acoplamiento molecular e interacciones del péptido His-Phe con la DPP-IV. A) Visualización 3D del acoplamiento molecular del péptido His-Phe y el fármaco de referencia omarigliptina en el sitio activo de la DPP-IV. B) Interacciones 2D del péptido His-Phe con el sitio activo de la DPP-IV.

6.3. Predicción de las propiedades farmacocinéticas ADMET de péptidos de garbanzo.

En la tabla 9 se muestran las predicciones de las propiedades farmacocinéticas de los péptidos de garbanzo inhibidores de la DPP-IV. En las primeras 3 filas se encuentran los principales fármacos utilizados para inhibir a la DPP-IV (omarigliptina, saxagliptina y vildagliptina), seguido de los 10 péptidos inhibidores de la DPP-IV con menor energía de unión. La predicción de las propiedades farmacocinéticas de los 46 péptidos con estructura en PubChem se muestra en el Anexo XVI.

Un total de 35 (76,09%) y 41 (89,13%) péptidos inhibidores de la DPP-IV del garbanzo mostraron valores óptimos de absorción intestinal humana y biodisponibilidad, respectivamente. Los 46 péptidos evaluados mostraron valores de distribución óptimos y probabilidad de vida media prolongada (>3 horas). Adicionalmente, se predijo que el 97,8%(n=45) de los péptidos tienen toxicidad nula (Anexo XVI).

Tabla 9. Propiedades farmacocinéticas ADMET de los fármacos gliptinas y péptidos inhibidores de DPP-IV derivados de garbanzos.

Péptido/fármaco	Regla de Lipinski	HIA	F 20%	F 30%	VD (L/kg)	T 1/2 (h)	ROAT
Omarigliptina	Aceptado	●	●	●	●	0.151	●
Saxagliptina	Aceptado	●	●	●	●	0.309	●
Vildagliptina	Aceptado	●	●	●	●	0.37	●
HF	Aceptado	●	●	●	●	0.92	●
IW	Aceptado	●	●	●	●	0.91	●
YF	Aceptado	●	●	●	●	0.921	●
QF	Aceptado	●	●	●	●	0.61	●
YL	Aceptado	●	●	●	●	0.909	●
FR	Aceptado	●	●	●	●	0.826	●
KF	Aceptado	●	●	●	●	0.835	●
VF	Aceptado	●	●	●	●	0.872	●
YA	Aceptado	●	●	●	●	0.894	●
HL	Aceptado	●	●	●	●	0.919	●
NR	Aceptado	●	●	●	●	0.422	●
PH	Aceptado	●	●	●	●	0.887	●

HIA: Absorción intestinal humana, F20%: Biodisponibilidad 20%, F30%: Biodisponibilidad 30%, VD: Volumen de Distribución , ROAT: Toxicidad aguda oral en ratas. Decisión empírica: Verde: Excelente, Amarillo: Medio, Rojo: Deficiente, T1/2: probabilidad de >3H (0–1,0).

6.4. Multi-bioactividad y estabilidad a la digestión gastrointestinal.

La diabetes y la hipertensión son enfermedades que a menudo coexisten en un mismo paciente. En este sentido, se ha informado que el 70% de las personas con diabetes también padecen hipertensión (Naha et al., 2015; Syed et al., 2023). Por lo tanto, resulta crucial buscar coadyuvantes para tratamientos duales.

Con este fin, se evaluaron los 46 péptidos utilizados en el análisis de acoplamiento molecular para determinar si poseían otras bioactividades (inhibición de la ECA-I y de la renina), además de la inhibición de la DPP-IV. De estos, 28 (60.86%) mostraron potencial inhibidor de la ECA-I, y 7 (15.21%) demostraron potencial para inhibir la renina.

Además, es indispensable evaluar la resistencia a la digestión gastrointestinal de los péptidos bioactivos para proponer vías de administración en futuros ensayos con modelos *in vivo*. Por lo tanto, los 46 péptidos se sometieron a una hidrólisis secuencial con pepsina, quimiotripsina y tripsina para evaluar su estabilidad durante la digestión gastrointestinal. De los 46 péptidos, 34 (73.9%) demostraron ser estables frente a la digestión gastrointestinal *In silico* (pepsina, tripsina y quimiotripsina). En particular, 24 de los 34 péptidos exhibieron multibioactividad, además de estabilidad frente a la digestión gastrointestinal *In silico*.

6.5. Determinación del porcentaje de inhibición *In vitro* de la DPP-IV por péptidos derivados del garbanzo.

Dados los resultados de los análisis *In silico*, que incluyen el perfil de péptidos liberados por la hidrólisis, la afinidad con el sitio activo de la DPP-IV, y la ausencia de toxicidad en las predicciones de las propiedades farmacocinéticas, y la falta de estudios *In vitro* con alcalasa para producir

hidrolizados proteicos de garbanzo con capacidad de inhibir a la DPP-IV, se decidió emplear la enzima alcalasa para los ensayos *In vitro*.

El porcentaje de inhibición de la DPP-IV *In vitro* se determinó empleando un kit de inhibición de Sigma-Aldrich (Código de catálogo: MAK203). Como ensayos preliminares, se llevaron a cabo pruebas para evaluar la interferencia del buffer donde fue suspendido el aislado proteico y se realizaron las hidrólisis, así como pruebas para determinar la dilución del hidrolizado para emplear en los ensayos de inhibición. El hidrolizado de garbanzo utilizado en el ensayo preliminar fue obtenido utilizando las condiciones de los puntos centrales del análisis de superficie de respuesta (Tiempo: 3h, temperatura: 50°C, concentración enzima/sustrato:0.3 U/g).

En general, se pudo observar un adecuado funcionamiento del Kit en las condiciones evaluadas, reflejado por la inhibición del 88.2% de la actividad de la DPP-IV inducido por el control de inhibición sitagliptina (incluido en el Kit). Además, se confirmó que el buffer Bis-Tris-Propano (20 mM, pH de 11) no interfiere en el correcto funcionamiento del kit, dado que por sí solo no mostro inhibición de la actividad de la DPP-IV. Por otro lado, todas las diluciones del hidrolizado (concentrado, 1:2, 1:4, 1:8) inhibieron la actividad de la DPP-IV (% de inhibición de 38.1–87.7%) (Figura 11). Dado que se observó una inhibición similar a la del control de inhibición utilizando el hidrolizado concentrado (88.2% vs 87.7%) y con el objetivo de poder identificar diferencias en el porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV entre los hidrolizados obtenidos por las diferentes condiciones, se optó por elegir la dilución 1:4 para posteriores ensayos.

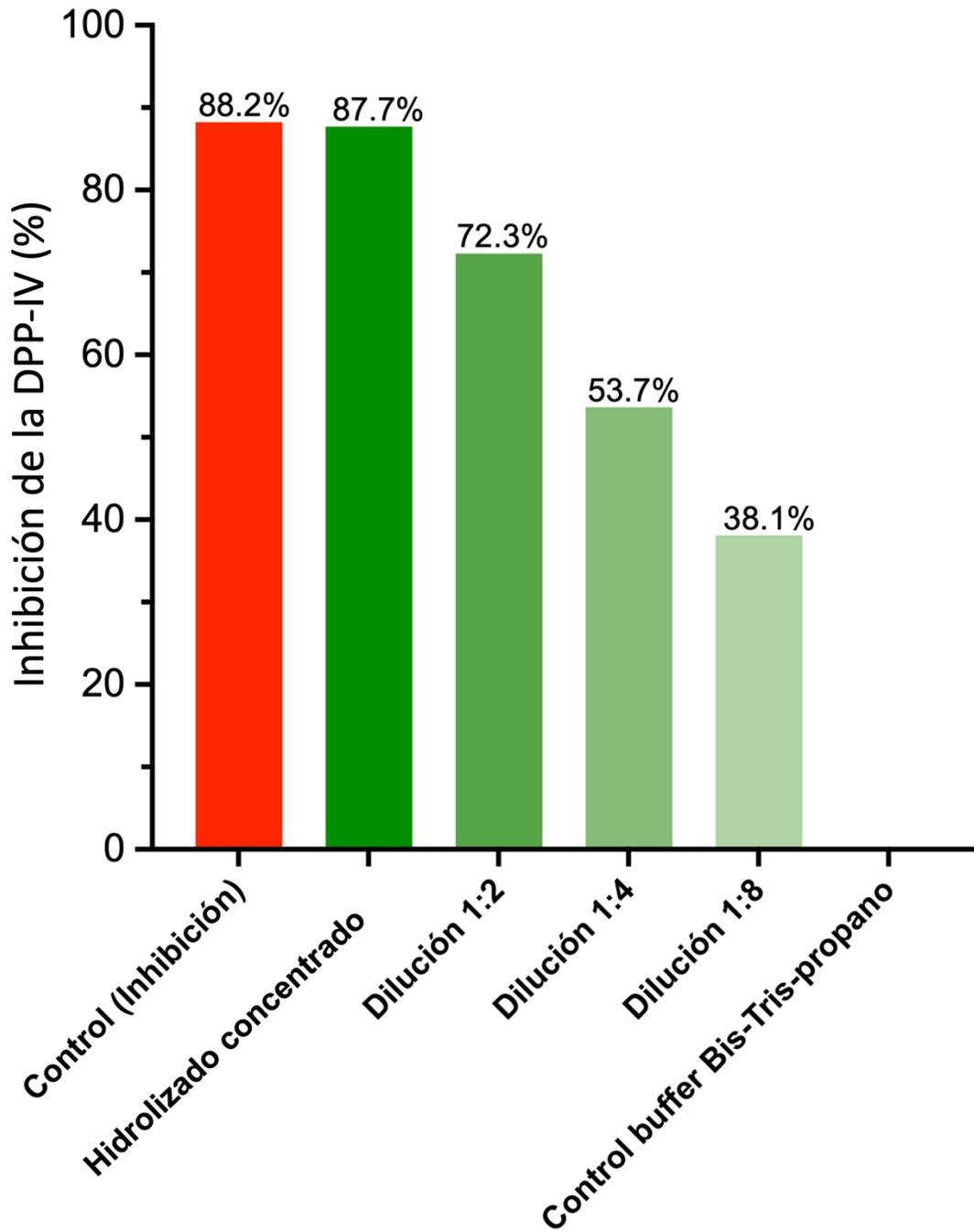


Figura 11. Ensayos preliminares del correcto funcionamiento del Kit de inhibición de la DPP-IV (Sigma-Aldrich: MAK203).

Posterior a los ensayos preliminares, se determinó el porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV de los 17 hidrolizados de garbanzo generados utilizando diferentes combinaciones de variables, siguiendo la hoja de trabajo generada por el software Design Expert 11.0 aplicando el modelo Box-Behnken. Se obtuvieron porcentajes de inhibición de la actividad de la DPP-IV que fueron desde 31.65% hasta 57.96% (Tabla 10). Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas en los experimentos, los resultados obtenidos no se ajustaron significativamente a ningún modelo que permita predecir la combinación de variables para potenciar la variable respuesta (%de inhibición de la DPP-IV).

Tabla 10. Porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV *In vitro* de los 17 experimentos del modelo Box-Behnken.

Experimento	Tiempo (H)	Temperatura (°C)	Concentración (enzima/sutrato) U/g	Inhibición de DPP-IV (%)
R1	2	40	0.3	53.32
R2	4	40	0.3	40.85
R3	2	60	0.3	52.04
R4	4	60	0.3	53.87
R5	2	50	0.2	48.28
R6	4	50	0.3	53.99
R7	2	50	0.4	56.82
R8	4	50	0.4	57.96
R9	3	40	0.2	49.81
R10	3	60	0.2	53.74
R11	3	40	0.4	55.11
R12	3	60	0.4	51.09
R13	3	50	0.3	31.65
R14	3	50	0.3	51.05
R15	3	50	0.3	53.82
R16	3	50	0.3	50.32
R17	3	50	0.3	55.60

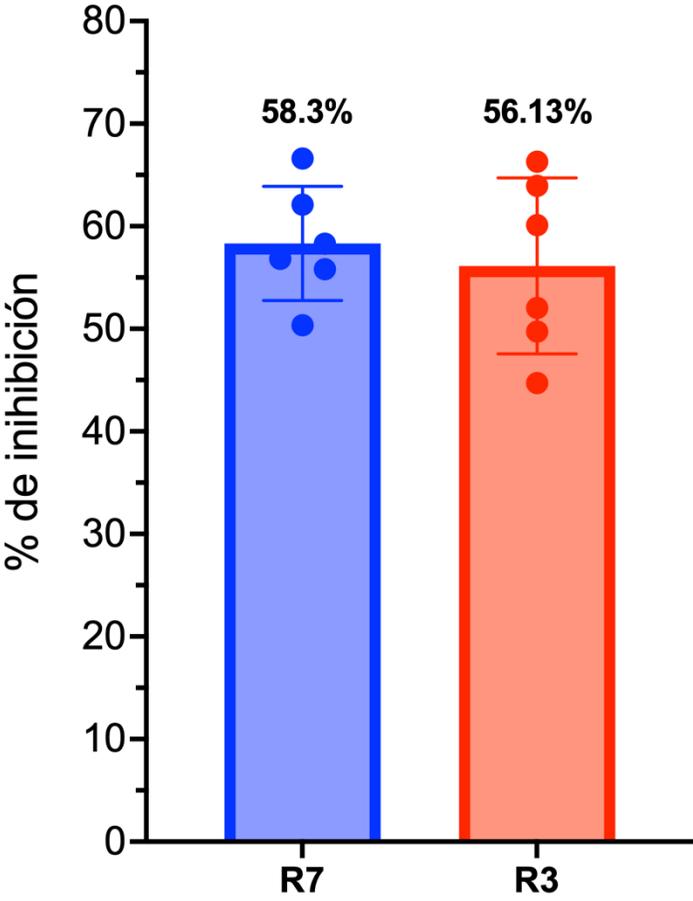
Considerando los resultados obtenidos en el análisis de superficie de respuesta y en la búsqueda de generar un hidrolizado de garbanzo con actividad inhibitoria de la DPP-IV repetible y estandarizado, seleccionamos dos hidrolizados de garbanzo obtenidos bajo las condiciones de hidrólisis convenientes para la producción a escala industrial, considerando un menor tiempo, temperatura y concentración de enzima/sustrato. Bajo estos parámetros, se seleccionaron las condiciones del experimento R7 y R3 (Tabla 10) para generar hidrolizados de garbanzo y se comparó el % de inhibición de la actividad de la DPP-IV.

En este sentido, se produjeron mediante 3 experimentos independientes los hidrolizados R7 y R3 y se evaluó por duplicado el % de inhibición de la actividad de la DPP-IV (Figura 12). Aunque no se encontraron diferencias significativas, el hidrolizado R7 presento un % de inhibición de la actividad de la DPP-IV superior al del hidrolizado R3 (58.3% vs 56.13%, $p>0.05$).

6.6. Determinación del IC₅₀.

Se determino la concentración media inhibitoria (IC₅₀) del hidrolizado de proteína de garbanzo con alcalasa de la combinación de factores que dio un mayor porcentaje de inhibición en menor tiempo de reacción, experimento R7 (tiempo: 2h, temperatura: 50 °C, concentración enzima/sustrato 0.4U/g). Se obtuvo un IC₅₀ de 0.6883 mg/mL (Figura 13).

Figura 12. Porcentaje de inhibición de la actividad de la DPP-IV de los hidrolizados de garbanzo R7 y R3.



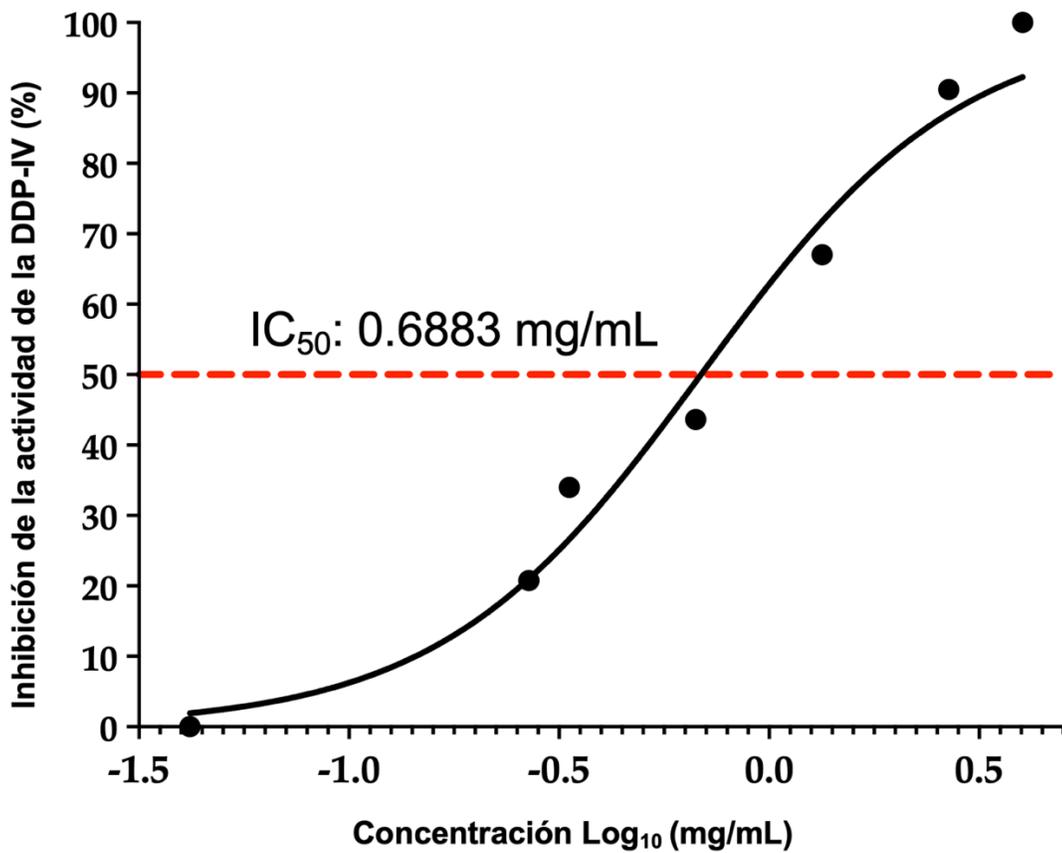


Figura 13. Determinación de la concentración media inhibitoria del hidrolizado de proteína de garbanzo con alcalasa (2h, 50°C, concentración enzima/sustrato 0.4U/g)

7. DISCUSIÓN

La liberación de péptidos bioactivos encriptados en las secuencias proteicas de los alimentos es un proceso necesario para poder ejercer su actividad biológica. Entre los métodos más utilizados se encuentra el uso de enzimas proteolíticas (Daliri et al., 2017b; Megrous et al., 2020). La gran variedad de proteasas disponibles a generado la producción de hidrolizados con una amplia diversidad de péptidos bioactivos y, consecuentemente, diferentes propiedades biológicas, como antihipertensivas, antidiabéticas, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras (Farias et al., 2022). En este contexto, la producción de hidrolizados proteicos con capacidad de inhibir a la DPP-IV es un área de creciente interés en la comunidad científica, atribuido a la necesidad de generar compuestos que coadyuven al tratamiento de la DM2 y no presenten propiedades toxicológicas.

La frecuencia (A) y potencia (B) de péptidos son parámetros *In silico* frecuentemente utilizados para evaluar el potencial de diversas fuentes alimentarias para generar péptidos con una determinada bioactividad (Arámburo-Gálvez et al., 2022). En este sentido, los valores A y B reportados para la provicilina (A: 0.6093, B: 0.0003526629028523) y legumina (A: 0.5847, B: 0.0002483186581999) están en línea con lo reportado por otros estudios *In silico*, donde además establecen puntos de corte para el valor de A donde igual o mayor a 0.500 se considera como una fuente potencial de péptidos bioactivos (Iwaniak et al., 2020), indicando así el potencial de las proteínas de garbanzo como fuente de péptidos inhibidores de la DPP-IV. No obstante, los péptidos encriptados en la secuencia de la proteína no tienen la capacidad de ejercer su efecto biológico y necesitan ser liberados de la matriz proteica (Daliri et al., 2017b). Por lo tanto, realizamos hidrólisis enzimáticas *In silico* con la finalidad de predecir el perfil de péptidos inhibidores de la DPP-IV en las proteínas de garbanzo.

El uso de enzimas de origen vegetal, microbiano y la digestión gastrointestinal simulada son frecuentemente empleadas para la generación de péptidos bioactivos con diversas propiedades biológicas (Farias et al., 2022). De todas las enzimas evaluadas, la bromelina demostró el valor de frecuencia (A_E) más alto sobre la provicilina al liberar una mayor cantidad de péptidos inhibidores de DPP-IV (0.0817) que exhibieron una potencia relativamente moderada ($6.0467750947608E^{-5}$). Sin embargo, el mejor valor de B_E ($0.068625336714504E^{-5}$) sobre la provicilina lo obtuvo la tripsina. Hasta el momento, existe una carencia de estudios que evalúen hidrolizados de garbanzo producidos con tripsina para inhibir a la DPP-IV. En el caso de la bromelina, se ha reportado que la hidrólisis de proteína de garbanzo con bromelina puede generar un hidrolizado con capacidad de inhibir a la DPP-IV relativamente alta, mostrando valores de IC_{50} de 790 $\mu\text{g/mL}$ (Chandrasekaran et al., 2020). Aunque los valores de la hidrólisis simulada con tripsina son prometedores, son necesarios análisis *In vitro* para determinar el potencial de los hidrolizados de garbanzo producidos con tripsina para inhibir a la DPP-IV. La alcalasa es una endopeptidasa que tiene especificidad por enlaces peptídicos adyacentes a residuos de aminoácidos hidrofóbicos (Azrin et al., 2022). Esta característica puede parcialmente explicar los valores de A_E (legumina: 0.0662, provicilina: 0.0383) de la alcalasa, ya que los inhibidores de la DPP-IV suelen contener en su estructura aminoácidos hidrofóbicos (Nongonierma & FitzGerald, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que la alcalasa tiene la capacidad de generar una gran cantidad de di y tri-péptidos (Morato et al., 2000). Estas características explican la amplia diversidad de péptidos inhibidores de la DPP-IV liberados a partir de la hidrólisis *In silico* con alcalasa sobre las principales proteínas del garbanzo.

A pesar de las limitantes implicadas en el análisis *In silico*, se ha reportado una alta correlación entre el potencial inhibitorio de la DPP-IV *In vitro* de hidrolizados de diferentes fuentes alimentarias con lo encontrado en los

análisis *In silico* en proteínas de dichas fuentes alimentarias (T.-Y. Wang et al., 2017). Por lo tanto, los análisis *In silico* nos proporcionan un punto de partida ideal para generar hidrolizados con mayor probabilidad de tener potencial inhibitorio de la DPP-IV.

En este sentido, las herramientas bioinformáticas permiten utilizar una diversidad de enzimas con diferentes especificidades para simular la hidrólisis de proteínas. Esto amplía significativamente la identificación de péptidos liberados en las hidrólisis y permite una evaluación exhaustiva del potencial bioactivo de los péptidos liberados mediante la comparación con base datos de péptidos con actividad biológica reportada, reduciendo el tiempo y los recursos empleados para la elección de la enzima de trabajo para los ensayos *In vitro* (Arámburo-Gálvez et al., 2022). En el presente estudio, se utilizaron 8 enzimas para realizar la hidrólisis enzimática simulada, liberando un total de 191 péptidos inhibidores de la DPP-IV en la legumina y 190 en la provicilina. No obstante, de estos 92 péptidos eran únicos. Esta amplia diversidad de péptidos liberados inhibidores de la DPP-IV se explica por la diferente especificidad de escisión de las enzimas utilizadas, estas se clasifican según su especificidad y sitio de acción en endopeptidasas y exopeptidasas. Las endopeptidasas actúan internamente, rompiendo enlaces peptídicos dentro de las cadenas polipeptídicas, mientras que las exopeptidasas actúan en los extremos de las cadenas, liberando aminoácidos o péptidos cortos (Mótyán et al., 2013).

Entre los 381 péptidos identificados con los ensayos *In silico*, 376 son dipéptidos y 5 tripéptidos. Algunos estudios han reportado que péptidos de hasta 10 aminoácidos pueden tener valores bajos de IC_{50} y baja energía de unión en el sitio activo de la DPP-IV (Ma et al., 2022; Xu et al., 2019). Sin embargo, péptidos de esa longitud pueden ser degradados por las proteasas del sistema digestivo, perdiendo potencialmente su bioactividad en un modelo *in vivo* (Ahmed et al., 2022). Por el contrario, los dipéptidos y tripéptidos son

generalmente más resistentes a la digestión gastrointestinal y más biodisponibles (Farias et al., 2022). El transporte de péptidos desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica se facilita mediante diversos mecanismos, incluyendo las rutas paracelular, transcelular, y a través del transportador de péptidos 1 (PepT1), estas rutas son capaces de transportar di y tri-péptidos (Amigo & Hernández-Ledesma, 2020). Dadas estas características, los di y tri-péptidos adquieren una importancia significativa en el desarrollo de hidrolizados proteicos con capacidad bioactiva.

Los análisis de acoplamiento molecular son una herramienta ampliamente utilizada en la búsqueda de péptidos terapéuticos, permitiendo estudiar las interacciones y la energía de unión de péptidos con el sitio activo de una enzima (Vidal-Limon et al., 2022). En este contexto, una baja energía de unión entre un ligando y un receptor es un indicador de una interacción molecular estable, siendo una propiedad deseable en la búsqueda de péptidos bioactivos con una mayor afinidad y unión con el sitio activo de la DPP-IV (Nongonierma & FitzGerald, 2014). En el presente estudio, los péptidos liberados a partir de la hidrólisis enzimática *In silico* oscilaron entre -5.2 kcal/mol y -7.9 kcal/mol, similar a lo reportado para péptidos de otras fuentes alimentarias, incluso alimentos de origen animal como la leche de vaca y el salmón (-6.57 a -8.037 kcal/mol) (Gao et al., 2020; Gu et al., 2021; Jin et al., 2020). Interesantemente, los valores de energía de unión de los péptidos del garbanzo con el sitio activo de la DPP-IV son comparables con la energía de unión reportada de algunos fármacos inhibidores de la DPP-IV como la saxagliptina (-8.4 kcal/mol) y la vildagliptina (-8.84 kcal/mol) (Gupta et al., 2018; Sneha & Doss, 2016). Estos resultados sugieren que los péptidos de garbanzo evaluados presentan una alta afinidad por el sitio activo de la DPP-IV y por lo tanto podrían ser inhibidores competitivos eficaces de esta enzima.

El sitio activo de la DPP-IV tiene cuatro pockets (S1, sitio catalítico, S2 y S2'): el pocket S1, contiene residuos hidrofóbicos (Tyr 547, Tyr 631, Val 656,

Trp 659, Tyr 662, Val 711), el sitio catalítico (CS) está conformado por (Ser 630, Asp 708, Asn 710, His 740), el pocket S2 se conforma por (Glu 205, Glu 206, Arg 125) y el pocket S2' por (Val 207, Ser 209, Arg 358, Phe 357) (Juillerat-Jeanneret, 2014). Nuestros resultados indican que más de la mitad de los péptidos (65.2%) de garbanzo formaron interacciones hidrofóbicas con el sitio activo de la DPP-IV. Particularmente, una gran proporción de estos péptidos contienen un aminoácido hidrofóbico o una tirosina en la posición N-terminal (45.65%) o C-terminal (36.96%). Esto último está en línea con lo reportado por otros quienes destacan que los péptidos inhibidores de la DPP-IV tienen un aminoácido hidrofóbico o aromático en el extremo N terminal generalmente (Ile, Leu, Val, Phe, Trp o Tyr) (Nongonierma & FitzGerald, 2014).

Los puentes de hidrógeno son una de las principales interacciones no covalentes que participan en mantener la estabilidad entre el complejo péptido/sitio activo de la DPP-IV (W. Wang et al., 2022). En el presente estudio, el 69.5% de los péptidos interactuaron con el sitio catalítico a través de puentes de hidrógeno. Por otra parte, una gran proporción de los péptidos del garbanzo interactuaron con los pockets S2 (76.08%) y S2' (45.6%) mediante interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, respectivamente. El pocket S1 se caracteriza por ser estrecho y tiende a interactuar con compuestos hidrofóbicos pequeños, mientras que el pocket S2 es capaz de interactuar con compuestos más grandes a través de interacciones electrostáticas (Nongonierma & FitzGerald, 2019). Estas características pueden explicar los valores similares de energía de unión entre los péptidos identificados en el presente estudio y los fármacos saxagliptina (-8.4 kcal/mol) y vildagliptina (-8.84 kcal/mol) (Gupta et al., 2018; Sneha & Doss, 2016).

El péptido HF presentó la mayor afinidad con el sitio activo de la DPP-IV, estableciendo interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con los residuos del sitio activo de la DPP-IV. Particularmente, la histidina interactuó con los residuos del sitio activo Arg 125 y Tyr 662 del

pocket S2 a través de puentes de hidrógeno con una distancia de $<3 \text{ \AA}$. Por otro lado, Phe mostró interacciones hidrofóbicas con otros aminoácidos no polares, mejorando la estabilidad del complejo péptido/sitio activo de la DPP-IV. Estas interacciones podrían explicar la baja energía de unión del complejo His-Phe/sitio activo de la DPP-IV (-7.9 kcal/mol).

Un fármaco o compuesto terapéutico ideal debe mostrar biodisponibilidad, capacidad de absorberse a nivel intestinal, tener una distribución adecuada, no eliminarse inmediatamente y no presentar toxicidad, por lo que la predicción de las propiedades ADMET de péptidos bioactivos es un área de interés creciente en la búsqueda de péptidos potencialmente terapéuticos, biodisponibles y no tóxicos (Xiong et al., 2021). Todos los péptidos evaluados cumplieron con la regla de Lipinski, lo que sugiere una alta probabilidad de que podrían alcanzar la circulación sistémica y ser biodisponibles (Walters, 2012). La absorción intestinal humana y la biodisponibilidad son factores cruciales en la evaluación y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Atkinson, 2007). En el presente estudio, la mayoría de los péptidos muestran alta probabilidad de absorberse a nivel intestinal (76.09%) y ser biodisponibles (89.13%).

Un volumen de distribución elevado sugiere que los péptidos son capaces de llegar a los tejidos diana, aumentando potencialmente su eficacia (Smith et al., 2015). En este contexto, los 46 péptidos evaluados mostraron valores de distribución óptimos. Adicionalmente, una gran proporción de los péptidos evaluados mostraron una alta probabilidad de tener una vida media prolongada ($>3 \text{ h}$). Por el contrario, la vildagliptina tiene una vida media de aproximadamente 90 min y la saxagliptina de 2,5 a 3 h. La omarigliptina tiene una vida media larga, principalmente debido a su fuerte afinidad por las proteínas plasmáticas como la albúmina (Dhillon & Weber, 2009; Galloway et al., 2017; Lauster et al., 2007).

Del total de péptidos evaluados, solamente el péptido IL mostro potencial para ser tóxico. Interesantemente, este péptido ha sido reportado en otros estudios como un potente inhibidor de la ECA-I y se ha catalogado como un péptido terapéutico potencial (Han et al., 2021; Michelke et al., 2017). No obstante, existe una carencia de estudios que evalúen su potencial antihipertensivo *in vivo*, así como sus propiedades toxicológicas. En este contexto, las predicciones de las propiedades farmacocinéticas proporcionan información preliminar que pueden servir como guía para diseñar estudios *In vitro* e *in vivo*, enfocados en la evaluación de las propiedades toxicológicas del compuesto, así como su potencial bioactivo.

Los péptidos inhibidores de DPP-IV y los inhibidores de ECA-I comparten algunas características entre sí, como un bajo peso molecular, y que generalmente contienen aminoácidos aromáticos y/o hidrofóbicos (Han et al., 2021; Michelke et al., 2017). En este contexto, 60.86% de los péptidos evaluados mostraron potencial para inhibir a la enzima convertidora de angiotensina-I y 15.21% mostraron potencial para inhibir a la renina. Este hallazgo cobra particular importancia considerando que aproximadamente el 70% de las personas diagnosticadas con diabetes también padecen hipertensión (Farias et al., 2022; Jin et al., 2020). Algunos autores han reportado la capacidad de hidrolizados proteicos de inhibir tanto a la ECA-I como a la DPP-IV (Bollati et al., 2022), resaltando la multibioactividad de los péptidos generados durante la hidrólisis enzimática y su potencial uso como tratamiento en pacientes con DM2 e hipertensión arterial. En el caso del garbanzo, se ha reportado que hidrolizados proteicos de garbanzo generados con alcalasa tienen la capacidad de inhibir a la ECA-I y reducir la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (Figuroa-Salcido et al., 2024). En el presente estudio, la hidrólisis con alcalasa generó un hidrolizado con capacidad de inhibir a la DPP-IV, resaltando que las proteínas de garbanzo son potencialmente fuente tanto de péptidos inhibidores de la DPP-IV como

de la ECA-I. En este contexto, son necesarios estudios que evalúen la multibioactividad de hidrolizados proteicos de garbanzo para inhibir a la ECA-I y la DPP-IV y, de esta forma, contribuir como adyuvante en el manejo de la DM2 y la hipertensión arterial.

En el presente estudio, la alcalasa fue una de las enzimas que libero una mayor cantidad de péptidos con capacidad de inhibir a la DPP-IV en las predicciones de hidrólisis enzimáticas, además, los péptidos liberados por esta enzima mostraron una potente afinidad con el sitio activo de la DPP-IV en los análisis de acoplamiento molecular. Aunado a esto, la alcalasa es una enzima muy utilizada a nivel industrial debido a su potente actividad y estabilidad a pH alcalinos, teniendo rangos amplios de trabajo en cuanto a temperatura (40 – 70°C) y pH (7 – 11) (Azrin et al., 2022; Tacias-Pascacio et al., 2020). Sin embargo, existe una carencia de estudios que evalúen el potencial de hidrolizados proteicos de garbanzo producidos con alcalasa con capacidad de inhibir a la DPP-IV. Por tal motivo, utilizamos la alcalasa como enzima para realizar la hidrólisis de proteínas de garbanzo y evaluar el potencial de las proteínas de garbanzo para inhibir a la DPP-IV.

Los análisis de superficie de respuesta son modelos estadísticos y matemáticos basados en el ajuste de ecuaciones de los datos experimentales, estos modelos se utilizan para optimizar procesos y encontrar las mejores condiciones operativas para obtener un resultado esperado (Bezerra et al., 2008). Estos análisis se han utilizado en el desarrollo de hidrolizados proteicos con capacidad bioactiva buscando la mejor combinación de las condiciones experimentales para obtener un máximo de inhibición (AL-Bukhaiti et al., 2022; Figueroa-Salcido et al., 2024; Jia et al., 2020; Ramírez-Torres et al., 2017). En este sentido, el modelo Box-Behnken es un diseño de segundo orden basado en diseños factoriales incompletos de 3 niveles. Esto mismo hace que el modelo Box-Behnken destaque por necesitar un menor número de experimentos y disminuir el costo en comparación con los diseños factoriales

completos. Otra ventaja de este modelo es que no considera combinaciones donde todos los factores estén simultáneamente en sus condiciones más altas o bajas, evitando así realizar experimentos en condiciones extremas que puedan elevar el costo del proceso (Ferreira et al., 2007). Por lo tanto, se decidió utilizar el modelo Box-Behnken para optimizar las condiciones de hidrólisis y buscar un máximo de inhibición. Sin embargo, los datos obtenidos en el ensayo experimental no se ajustaron a un modelo que pudiera predecir una combinación de factores óptimas, lo cual puede ser atribuido parcialmente a que las condiciones utilizadas para la región experimental no abarcan una región suficiente para estimar el efecto principal y de interacción de los factores utilizados. Otros autores han reportado que la temperatura y el tiempo de hidrólisis no contribuye significativamente en la inhibición de la DPP-IV en hidrolizados proteicos de garbanzo de la variedad Billy y Myles, pero si contribuyen de manera significativa en las variedades Sierra y Nash (Acevedo Martínez & Gonzalezde Mejia, 2021). Estos resultados indican que los factores pueden contribuir a una variable de respuesta de manera diferente para cada variedad, aún siendo la misma especie. En este sentido, establecer nuevos puntos centrales son estrategias ideales para poder modificar la región experimental y estimar el efecto principal de cada factor

Debido a que los datos no se ajustaron al modelo, se optó por utilizar las condiciones del experimento R7, con la cual se obtuvo un IC_{50} de 0.6883 mg/mL, a pesar de que no se pudo realizar una optimización de las condiciones de hidrólisis para obtener un máximo de inhibición, nuestro hidrolizado mostro un valor de IC_{50} similar e incluso más bajo que el de otras leguminosas. Los hidrolizados de proteínas de frijol bambara con alcalasa reportan valores de IC_{50} para la inhibición de la DPP-IV de 1.73 mg/mL (Mune Mune et al., 2018). En cuanto al frijol Caupi hidrolizado con alcalasa seguido de flavoenzima presenta un IC_{50} de 2.06 mg/mL para la inhibición de la DPP-IV (Castañeda-Pérez et al., 2019). También se ha reportado el IC_{50} de hidrolizados de proteína

de soja y chicharo para inhibir a la DPP-IV con valores de 1.15 mg/mL y 0.33 mg/mL respectivamente (Bollati et al., 2022).

Además, se ha reportado que los hidrolizados de proteínas de garbanzo con enzimas gastrointestinales (pepsina y pancreatina) y bromelina tienen IC_{50} de 0.245 mg/mL y 0.790 mg/mL, respectivamente (Chandrasekaran et al., 2020). Acevedo Martínez y colaboradores en 2021 realizaron la optimización de la hidrólisis de proteínas de garbanzo con bromelina para inhibir a la DPP-IV, para la optimización utilizaron 4 factores (Concentración enzima/sustrato, tiempo de hidrólisis, procesamiento termico y variedad de garbanzo y encontraron que el IC_{50} de hidrolizados de proteínas de garbanzo podía verse afectado por el estado de cocción del garbanzo y la variedad, reportando IC_{50} desde 0.17mg/mL hasta pruebas con 10mg/mL que no alcanzaron el IC_{50} (Acevedo Martínez & Gonzalezde Mejia, 2021). Estos resultados sugieren que el IC_{50} se ve afectado por las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción de hidrólisis. Además, el perfil de aminoácidos de las proteínas puede verse alterado por la variedad del grano, lo que genera una diversidad distinta de péptidos liberados a partir de un tratamiento enzimático cuando se trabaja con diferentes variedades del mismo grano.

El IC_{50} es un parámetro farmacológico utilizado para evaluar la potencia de un compuesto. Sin embargo, en el desarrollo de hidrolizados proteicos con capacidad bioactiva, se ha observado que no existe una relación directa entre el IC_{50} y el efecto farmacológico. En cuanto a la inhibición de la ECA-I, hidrolizados con un IC_{50} más alto han demostrado un mayor impacto sobre los niveles de presión arterial (Figueroa-Salcido et al., 2024; Lourenço da Costa et al., 2007; Ramírez-Torres et al., 2017). Esto también podría ocurrir con hidrolizados que tienen capacidad de inhibir la DPP-IV, por lo que es indispensable llevar a cabo ensayos en modelos *in vivo* para confirmar el efecto.

8. CONCLUSIONES

El garbanzo representa una fuente prometedora de péptidos inhibidores de la DPP-IV. La hidrólisis de sus principales proteínas, legumina y provicilina, con enzimas proteolíticas libera hasta 92 péptidos únicos, incluyendo dipéptidos y tripéptidos con propiedades farmacocinéticas favorables, como una absorción intestinal óptima, alta biodisponibilidad y bajo riesgo de toxicidad. Entre ellos, los péptidos HF e IW destacaron por su alta afinidad con el sitio activo de la DPP-IV, con energías de unión de -7.9 y -7.8, respectivamente. Además, 28 péptidos (60.86%) también inhiben la ECA-I, lo que sugiere su potencial como tratamiento dual.

Los hidrolizados de garbanzo con alcalasa mostraron porcentajes de inhibición de la DPP-IV que van desde 31.65% hasta 57.96%. El hidrolizado R7, con un tiempo de hidrólisis de 2 horas a 50°C y una relación enzima/sustrato de 0.4 U/g, logró el mayor porcentaje de inhibición (57.96%) y un IC_{50} de 0.6883 mg/mL, confirmando su capacidad inhibitoria de la DPP-IV *In vitro*.

Estos resultados sientan las bases para futuros estudios *in vivo* que permitan confirmar el efecto hipoglucemiante de los hidrolizados.

9. RECOMENDACIONES

Se sugiere llevar a cabo ensayos *in vivo* para confirmar el efecto del hidrolizado de proteínas de garbanzo tratado con alcalasa sobre biomarcadores relevantes de DM2 como los niveles de glucosa posprandial. Dicho hidrolizado puede ser administrado tanto de manera aguda como crónica. Estos ensayos permitirán una mejor comprensión de las implicaciones de la suplementación del hidrolizado en el manejo de la diabetes y servirán como base para futuros ensayos clínicos. Esto último sentaría las bases para su uso como terapia complementaria o ingrediente para el desarrollo de alimentos medicinales para el tratamiento de la DM2.

10. REFERENCIAS

- Abe, M., Okada, K., & Soma, M. (2011). Antidiabetic agents in patients with chronic kidney disease and end-stage renal disease on dialysis: Metabolism and clinical practice. *Current drug metabolism*, 12(1), 57-69.
- Acevedo Martínez, K. A., & Gonzalezde Mejia, E. (2021). Comparison of five chickpea varieties, optimization of hydrolysates production and evaluation of biomarkers for type 2 diabetes. *Food Research International*, 147, 110572. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110572>
- Agnihotry, S., Pathak, R. K., Srivastav, A., Shukla, P. K., & Gautam, B. (2020). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design. En D. B. Singh (Ed.), *Computer-Aided Drug Design* (pp. 115-131). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6815-2_6
- Ahmed, T., Sun, X., & Udenigwe, C. C. (2022). Role of structural properties of bioactive peptides in their stability during simulated gastrointestinal digestion: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 120, 265-273.
- AL-Bukhaiti, W. Q., Al-Dalali, S., Noman, A., Qiu, S., Abed, S. M., & Qiu, S.-X. (2022). Response Surface Modeling and Optimization of Enzymolysis Parameters for the In vitro Antidiabetic Activities of Peanut Protein Hydrolysates Prepared Using Two Proteases. *Foods*, 11(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/foods11203303>
- Ali, J., Haider, S. M. S., Ali, S. M., Haider, T., Anwar, A., Hashmi, A. A., Ali, J., Haider, S. M. S., Ali, S. M., Haider, D. T., Anwar, A., & Hashmi, A. A. (2023). Overall Clinical Features of Type 2 Diabetes Mellitus With Respect to Gender. *Cureus*, 15(3). <https://doi.org/10.7759/cureus.35771>
- Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. *Molecules*, 25(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/molecules25194479>
- Arámburo-Gálvez, J. G., Arvizu-Flores, A. A., Cárdenas-Torres, F. I., Cabrera-Chávez, F., Ramírez-Torres, G. I., Flores-Mendoza, L. K., Gastelum-Acosta, P. E., Figueroa-Salcido, O. G., & Ontiveros, N. (2022). Prediction of ACE-I Inhibitory Peptides Derived from Chickpea (*Cicer arietinum* L.): In silico Assessments Using Simulated Enzymatic Hydrolysis, Molecular Docking and ADMET Evaluation. *Foods*, 11(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods11111576>
- Artasensi, A., Pedretti, A., Vistoli, G., & Fumagalli, L. (2020). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*, 25(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/molecules25081987>
- Atkinson, A. J. (2007). CHAPTER 4—Drug Absorption and Bioavailability. En A. J. Atkinson, D. R. Abernethy, C. E. Daniels, R. L. Dedrick, & S. P.

- Markey (Eds.), *Principles of Clinical Pharmacology (Second Edition)* (pp. 37-49). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012369417-1/50044-4>
- Azrin, N. A. M., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Oslan, S. N., & Noor, N. D. M. (2022). Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(6), 2599-2616. <https://doi.org/10.1002/bab.2309>
- Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Moreno-Banda, G. L., Carnalla, M., Rivera, J. A., Romero-Martinez, M., Barquera, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2023). Prevalencia de prediabetes y diabetes en México: Ensanut 2022. *Salud Pública de México*, 65, s163-s168. <https://doi.org/10.21149/14832>
- Batchelor, D. J., & German, A. J. (2019). Polyphagia. En *BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology* (pp. 46-48). BSAVA Library. <https://www.bsavalibrary.com/content/chapter/10.22233/9781910443361-3e.chap7>
- Baynes, H. W. (2015). Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus. *J diabetes metab*, 6(5), 1-9.
- Bermúdez, V., Finol, F., Parra, N., Parra, M., Pérez, A., Peñaranda, L., Vílchez, D., Rojas, J., Arráiz, N., & Velasco, M. (2010). PPAR- γ Agonists and Their Role in Type 2 Diabetes Mellitus Management. *American Journal of Therapeutics*, 17(3), 274. <https://doi.org/10.1097/MJT.0b013e3181c08081>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bi, Y., Wang, T., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Lu, J., Zhu, X., & Ning, G. (2012). Advanced research on risk factors of type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 28(s2), 32-39. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2352>
- Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C., & Lemieux, S. (2001). Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes*, 50(7), 1612-1617.
- Boland, B. B., Rhodes, C. J., & Grimsby, J. S. (2017). The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Molecular Metabolism*, 6(9), 958-973. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.010>
- Bollati, C., Xu, R., Boschini, G., Bartolomei, M., Rivardo, F., Li, J., Arnoldi, A., & Lammi, C. (2022). Integrated Evaluation of the Multifunctional DPP-IV and ACE Inhibitory Effect of Soybean and Pea Protein Hydrolysates. *Nutrients*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/nu14122379>
- Butt, S. S., Badshah, Y., Shabbir, M., & Rafiq, M. (2020). Molecular Docking Using Chimera and Autodock Vina Software for Nonbioinformaticians. *JMIR Bioinformatics and Biotechnology*, 1(1), e14232. <https://doi.org/10.2196/14232>

- Campos, C. (2012). Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: Pathology and clinical sequelae. *Postgraduate medicine*, 124(6), 90-97.
- Care, D. (2020). Medical care in diabetes 2020. *Diabetes Care*, 43, S135.
- Castañeda-Pérez, E., Jiménez-Morales, K., Quintal-Novelo, C., Moo-Puc, R., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. (2019). Enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L bean with In vitro antidiabetic potential. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16(8), 1773-1781. <https://doi.org/10.1007/s13738-019-01651-0>
- Chandrasekaran, S., & de Mejia, E. G. (2022). Optimization, identification, and comparison of peptides from germinated chickpea (*Cicer arietinum*) protein hydrolysates using either papain or ficin and their relationship with markers of type 2 diabetes. *Food chemistry*, 374, 131717.
- Chandrasekaran, S., Luna-Vital, D., & de Mejia, E. G. (2020). Identification and Comparison of Peptides from Chickpea Protein Hydrolysates Using Either Bromelain or Gastrointestinal Enzymes and Their Relationship with Markers of Type 2 Diabetes and Bitterness. *Nutrients*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/nu12123843>
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *The Lancet*, 389(10085), 2239-2251. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
- Chaudhury, A., Duvoor, C., Reddy Dendi, V. S., Kraleti, S., Marco, A., & Musham, C. K. (2017). Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology*, 8, 224539.
- Chavan, J. K., Kadam, S. S., Salunkhe, D. K., & Beuchat, L. R. (1987). Biochemistry and technology of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25(2), 107-158. <https://doi.org/10.1080/10408398709527449>
- Chávez-Ontiveros, J., Reyes-Moreno, C., Ramírez-Torres, G. I., Figueroa-Salcido, O. G., Arámburo-Gálvez, J. G., Montoya-Rodríguez, A., Ontiveros, N., & Cuevas-Rodríguez, E. O. (2022). Extrusion Improves the Antihypertensive Potential of a Kabuli Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysate. *Foods*, 11(17), Article 17. <https://doi.org/10.3390/foods11172562>
- Chelliah, R., Wei, S., Daliri, E. B.-M., Elahi, F., Yeon, S.-J., Tyagi, A., Liu, S., Madar, I. H., Sultan, G., & Oh, D.-H. (2021). The Role of Bioactive Peptides in Diabetes and Obesity. *Foods*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods10092220>
- Cornell, S. (2020). A review of GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes: A focus on the mechanism of action of once-weekly agents. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(S1), 17-27. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13230>
- Costa, P. C. S., Evangelista, J. S., Leal, I., & Miranda, P. C. M. L. (2021). Chemical Graph Theory for Property Modeling in QSAR and QSPR—

- Charming QSAR & QSPR. *Mathematics*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/math9010060>
- Craddy, P., Palin, H.-J., & Johnson, K. I. (2014). Comparative Effectiveness of Dipeptidylpeptidase-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Mixed Treatment Comparison. *Diabetes Therapy*, 5(1), 1-41. <https://doi.org/10.1007/s13300-014-0061-3>
- Cumming, J. G., Davis, A. M., Muresan, S., Haeberlein, M., & Chen, H. (2013). Chemical predictive modelling to improve compound quality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrd4128>
- Dabelea, D., Pettitt, D. J., Jones, K. L., & Arslanian, S. A. (1999). Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents: An emerging problem. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 28(4), 709-729.
- Daliri, E. B.-M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017a). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Daliri, E. B.-M., Oh, D. H., & Lee, B. H. (2017b). Bioactive Peptides. *Foods*, 6(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- Dali-Youcef, N., Mecili, M., Ricci, R., & Andrès, E. (2013). Metabolic inflammation: Connecting obesity and insulin resistance. *Annals of medicine*, 45(3), 242-253.
- Dalla Man, C., Bock, G., Giesler, P. D., Serra, D. B., Ligueros Saylan, M., Foley, J. E., Camilleri, M., Toffolo, G., Cobelli, C., & Rizza, R. A. (2009). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by vildagliptin and the effect on insulin secretion and action in response to meal ingestion in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32(1), 14-18.
- Dalle, S., Quoyer, J., Varin, E., & Costes, S. (2011). Roles and Regulation of the Transcription Factor CREB in Pancreatic β -Cells. *Current Molecular Pharmacology*, 4(3), 187-195.
- Daroit, D. J., & Brandelli, A. (2021). *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides – a current review. *Current Opinion in Food Science*, 39, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.002>
- Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., Kernan, W. N., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tsapas, A., Wexler, D. J., & Buse, J. B. (2018). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care*, 41(12), 2669-2701.
- Deacon, C. F. (2020). Dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0399-8>
- Deacon, C. F., Nauck, M. A., Toft-Nielsen, M., Pridal, L., Willms, B., & Holst, J. J. (1995). Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in

- type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, 44(9), 1126-1131.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Hu, F. B., Kahn, C. R., Raz, I., Shulman, G. I., Simonson, D. C., Testa, M. A., & Weiss, R. (2015). Type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>
- DeFronzo, R. A., Norton, L., & Abdul-Ghani, M. (2017). Renal, metabolic and cardiovascular considerations of SGLT2 inhibition. *Nature Reviews Nephrology*, 13(1), 11-26.
- Del Prato, S., & Pulizzi, N. (2006). The place of sulfonylureas in the therapy for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 55, S20-S27. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.02.003>
- Deore, A. B., Dhumane, J. R., Wagh, R., & Sonawane, R. (2019). The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6), 62-67. <https://doi.org/10.22270/ajprd.v7i6.616>
- Dhillon, S., & Weber, J. (2009). Saxagliptin. *Drugs*, 69, 2103-2114.
- Durruty, P., Sanzana, M., & Sanhueza, L. (2019). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. En *Type 2 Diabetes-From Pathophysiology to Modern Management*. IntechOpen. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=yXH8DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA25&dq=DM2+is+characterized+by+insulin+resistance+and+in+advanced+stages+a+deficiency+in+its+production.&ots=C4xuDRiO7e&sig=VTEgEyr3L_MWVI1VR-n9bQOP0Bc
- Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: Different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), 349-362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>
- Erion, D. M., & Shulman, G. I. (2010). Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nature Medicine*, 16(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nm0410-400>
- Ezcurra, M., Reimann, F., Gribble, F. M., & Emery, E. (2013). Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 922-927. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.013>
- Farias, T. C., de Souza, T. S. P., Fai, A. E. C., & Koblitz, M. G. B. (2022). Critical Review for the Production of Antidiabetic Peptides by a Bibliometric Approach. *Nutrients*, 14(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/nu14204275>
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>

- Figueroa-Salcido, O. G., Arámburo-Gálvez, J. G., Mora-Melgem, J. A., Camacho-Cervantes, D. L., Gracia-Valenzuela, M. H., Cuevas-Rodríguez, E. O., & Ontiveros, N. (2024). Alcalase-Based Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Foods*, *13*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/foods13081216>
- Fletcher, B., Gulanick, M., & Lamendola, C. (2002). Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *Journal of Cardiovascular Nursing*, *16*(2), 17-23.
- Florentin, M., Kostapanos, M. S., & Papazafiropoulou, A. K. (2022). Role of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors in the new era of antidiabetic treatment. *World Journal of Diabetes*, *13*(2), 85-96. <https://doi.org/10.4239/wjd.v13.i2.85>
- Frayn, K. N., Arner, P., & Yki-Järvinen, H. (2006). Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays in Biochemistry*, *42*, 89-103. <https://doi.org/10.1042/bse0420089>
- Galloway, I., McKay, G., & Fisher, M. (2017). Omarigliptin. *Practical Diabetes*, *34*(2), 70-71.
- Gao, J., Gong, H., & Mao, X. (2020). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity and related molecular mechanism of bovine α -lactalbumin-derived peptides. *Molecules*, *25*(13), 3009.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook* (pp. 571-607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gilbert, M. P., & Pratley, R. E. (2020). GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. *Frontiers in Endocrinology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00178>
- Göller, A. H., Kuhnke, L., Montanari, F., Bonin, A., Schneckener, S., ter Laak, A., Wichard, J., Lobell, M., & Hillisch, A. (2020). Bayer's In silico ADMET platform: A journey of machine learning over the past two decades. *Drug Discovery Today*, *25*(9), 1702-1709. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.001>
- Gooßen, K., & Gräber, S. (2012). Longer term safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in patients with type 2 diabetes mellitus: Systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *14*(12), 1061-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01610.x>
- Gu, H., Gao, J., Shen, Q., Gao, D., Wang, Q., Tangyu, M., & Mao, X. (2021). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of millet protein peptides and the related mechanisms revealed by molecular docking. *LWT*, *138*, 110587. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110587>
- Gupta, A., Jacobson, G. A., Burgess, J. R., Jelinek, H. F., Nichols, D. S., Narkowicz, C. K., & Al-Aubaidy, H. A. (2018). Citrus bioflavonoids dipeptidyl peptidase-4 inhibition compared with gliptin antidiabetic

- medications. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(1), 21-25.
- Han, R., Hernández Álvarez, A. J., Maycock, J., Murray, B. S., & Boesch, C. (2021). Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates – Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. *Current Research in Food Science*, 4, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.001>
- Hirst, J. A., Farmer, A. J., Dyar, A., Lung, T. W. C., & Stevens, R. J. (2013). Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 56(5), 973-984. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2856-6>
- Hu, F. B. (2003). Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids*, 38(2), 103-108. <https://doi.org/10.1007/s11745-003-1038-4>
- Hummasti, S., & Hotamisligil, G. S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation research*, 107(5), 579-591.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Pliszka, M., Mogut, D., & Darewicz, M. (2020). Characteristics of Biopeptides Released In silico from Collagens Using Quantitative Parameters. *Foods*, 9(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods9070965>
- James, D. E., Stöckli, J., & Birnbaum, M. J. (2021). The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00390-6>
- Jia, C., Hussain, N., Joy Ujiroghene, O., Pang, X., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., & Lv, J. (2020). Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins. *Food Chemistry*, 318, 126333. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126333>
- Jiang, J., Cai, X., Pan, Y., Du, X., Zhu, H., Yang, X., Zheng, D., Gaisano, H., Wei, T., & He, Y. (2020). Relationship of obesity to adipose tissue insulin resistance. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 8(1), e000741. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-000741>
- Jin, R., Teng, X., Shang, J., Wang, D., & Liu, N. (2020). Identification of novel DPP-IV inhibitory peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Food Research International*, 133, 109161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109161>
- Juillerat-Jeanneret, L. (2014). Dipeptidyl peptidase IV and its inhibitors: Therapeutics for type 2 diabetes and what else? *Journal of medicinal chemistry*, 57(6), 2197-2212.
- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11-S26.
- Kaur, N., Kumar, V., Nayak, S. K., Wadhwa, P., Kaur, P., & Sahu, S. K. (2021). Alpha-amylase as molecular target for treatment of diabetes mellitus: A

- comprehensive review. *Chemical Biology & Drug Design*, 98(4), 539-560. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13909>
- Kjems, L. L., Holst, J. J., Vølund, A., & Madsbad, S. (2003). The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: Effects on β -cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 52(2), 380-386.
- Krssak, M., Brehm, A., Bernroider, E., Anderwald, C., Nowotny, P., Man, C. D., Cobelli, C., Cline, G. W., Shulman, G. I., & Waldhäusl, W. (2004). Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53(12), 3048-3056.
- Kshirsagar, A. D., Aggarwal, A. S., Harle, U. N., & Deshpande, A. D. (2011). DPP IV inhibitors: Successes, failures and future prospects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 5(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2012.02.017>
- LaMoia, T. E., & Shulman, G. I. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocrine Reviews*, 42(1), 77-96. <https://doi.org/10.1210/edrev/bnaa023>
- Lau ChingChing, L. C., Noorlidah Abdullah, N. A., & Adawiyah Suriza Shuib, A. S. S. (2013). *Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, Pleurotus cystidiosus OK Miller identified by LC-MS/MS*. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20133417562>
- Lauster, C. D., McKaveney, T. P., & Muench, S. V. (2007). Vildagliptin: A novel oral therapy for type 2 diabetes mellitus. *American journal of health-system pharmacy*, 64(12), 1265-1273.
- Lee, K. A., Jin, H. Y., Kim, Y. J., Kim, S. S., Cho, E.-H., & Park, T. S. (2022). Real-world comparison of mono and dual combination therapies of metformin, sulfonylurea, and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors using a common data model: A retrospective observational study. *Medicine*, 101(8), e28823.
- Lee, S.-H., Park, S.-Y., & Choi, C. S. (2021). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, 46(1), 15-37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
- Lionetti, L., Mollica, M. P., Lombardi, A., Cavaliere, G., Gifuni, G., & Barletta, A. (2009). From chronic overnutrition to insulin resistance: The role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 19(2), 146-152.
- Lounkine, E., Batista, J., & Bajorath, J. (2008). Random molecular fragment methods in computational medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry*, 15(21), 2108-2121.
- Lourenço da Costa, E., Antonio da Rocha Gontijo, J., & Netto, F. M. (2007). Effect of heat and enzymatic treatment on the antihypertensive activity of whey protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 17(6), 632-640. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.003>

- Ma, C., Liu, D., Hao, H., & Wu, X. (2022). Identification of the DPP-IV Inhibitory Peptides from Donkey Blood and Regulatory Effect on the Gut Microbiota of Type 2 Diabetic Mice. *Foods*, 11(14), 2148.
- Magliano, D. J., Boyko, E. J., & IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. (2021). *IDF DIABETES ATLAS* (10th ed.). International Diabetes Federation. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK581934/>
- Marín-Peñalver, J. J., Martín-Timón, I., Sevillano-Collantes, C., & del Cañizo-Gómez, F. J. (2016). Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes*, 7(17), 354-395. <https://doi.org/10.4239/wjd.v7.i17.354>
- McCreight, L. J., Mari, A., Coppin, L., Jackson, N., Umpleby, A. M., & Pearson, E. R. (2020). Metformin increases fasting glucose clearance and endogenous glucose production in non-diabetic individuals. *Diabetologia*, 63(2), 444-447. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-05042-1>
- Megrous, S., Al-Dalali, S., Zhao, X., Chen, C., Cao, Y., Bourouis, I., Mekkaoui, A., Yang, Z., & Yang, Z. (2020). Evaluation of Antidiabetic Activities of Casein Hydrolysates by a Bacillus Metalloendopeptidase. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(4), 2519-2527. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10045-3>
- Merga, B., & Haji, J. (2019). Economic importance of chickpea: Production, value, and world trade. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1615718. <https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1615718>
- Michelke, L., Deussen, A., Dieterich, P., & Martin, M. (2017). Effects of bioactive peptides encrypted in whey-, soy- and rice protein on local and systemic angiotensin-converting enzyme activity. *Journal of Functional Foods*, 28, 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.026>
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91(4), 965-980.
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5978.
- Mojica, L., & Mejía, E. G. de. (2016). Optimization of enzymatic production of anti-diabetic peptides from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins, their characterization and biological potential. *Food & Function*, 7(2), 713-727. <https://doi.org/10.1039/C5FO01204J>
- Morato, A. F., Carreira, R. L., Junqueira, R. G., & Silvestre, M. P. C. (2000). Optimization of Casein Hydrolysis for Obtaining High Contents of Small Peptides: Use of Subtilisin and Trypsin. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(5), 843-857. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0912>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of*

- Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
<https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/biom3040923>
- Mune Mune, M. A., Minka, S. R., & Henle, T. (2018). Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 250, 162-169.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.001>
- Naha, S., Gardner, M. J., Khangura, D., Kurukulasuriya, L. R., & Sowers, J. R. (2015). *Hypertension in diabetes*.
- Naqvi, A. A. T., Mohammad, T., Hasan, G. M., & Hassan, Md. I. (2018). Advancements in Docking and Molecular Dynamics Simulations Towards Ligand-receptor Interactions and Structure-function Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(20), 1755-1768. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025114157>
- Nauck, M. A., & Müller, T. D. (2023). Incretin hormones and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 66(10), 1780-1795. <https://doi.org/10.1007/s00125-023-05956-x>
- Nauck, M. A., Wefers, J., & Meier, J. J. (2021). Treatment of type 2 diabetes: Challenges, hopes, and anticipated successes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(8), 525-544. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00113-3)
- Newsholme, E. A., & Dimitriadis, G. (2001). Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109(Suppl 2), S122-S134.
<https://doi.org/10.1055/s-2001-18575>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2014). An In silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 165, 489-498.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.090>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2019). Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12451.
- Norton, L., Shannon, C., Gastaldelli, A., & DeFronzo, R. A. (2022). Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism*, 129, 155142.
- Oseguera-Toledo, M. E., Gonzalez de Mejia, E., & Amaya-Llano, S. L. (2015). 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*, 76, 839-851.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.046>
- Pabreja, K., Mohd, M. A., Koole, C., Wootten, D., & Furness, S. G. B. (2014). Molecular mechanisms underlying physiological and receptor pleiotropic

- effects mediated by GLP-1R activation. *British Journal of Pharmacology*, 171(5), 1114-1128. <https://doi.org/10.1111/bph.12313>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 9(2), 91-102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Paul Gleeson, M., Hersey, A., & Hannongbua, S. (2011). *In-Silico ADME Models: A General Assessment of their Utility in Drug Discovery Applications* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/156802611794480927>
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: The pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrd3078>
- Peredo-Lovillo, A., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., & Romero-Luna, H. E. (2022). Conventional and In silico approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. *Food Chemistry: X*, 13, 100183. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100183>
- Qiao, L., Li, B., Chen, Y., Li, L., Chen, X., Wang, L., Lu, F., Luo, G., Li, G., & Zhang, Y. (2016). Discovery of Anti-Hypertensive Oligopeptides from Adlay Based on In silico Proteolysis and Virtual Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms17122099>
- Qureshi, S. S., Amer, W., Farooq, M., Butt, N., Shoaib, Z., & Firdous, S. (2017). Clinical presentations of type II diabetes. *Pakistan J Med Health Sci*, 11, 108-110.
- Ramírez Fuentes, L., Richard, C., & Chen, L. (2021). Sequential alcalase and flavourzyme treatment for preparation of α -amylase, α -glucosidase, and dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitory peptides from oat protein. *Journal of Functional Foods*, 87, 104829. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104829>
- Ramírez-Torres, G., Ontiveros, N., Lopez-Teros, V., Ibarra-Diarte, J. A., Reyes-Moreno, C., Cuevas-Rodríguez, E. O., & Cabrera-Chávez, F. (2017). Amaranth Protein Hydrolysates Efficiently Reduce Systolic Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Molecules*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/molecules22111905>
- Razavi-Nematollahi, L., & Ismail-Beigi, F. (2019). Adverse Effects of Glycemia-Lowering Medications in Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(11), 132. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1266-7>
- Rizza, R. A. (2010). Pathogenesis of fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes: Implications for therapy. *Diabetes*, 59(11), 2697-2707.
- Rocha, M., Diaz-Morales, N., Rovira-Llopis, S., Escribano-Lopez, I., Bañuls, C., Hernandez-Mijares, A., Diamanti-Kandarakis, E., & M Victor, V. (2016). Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in diabetes. *Current pharmaceutical design*, 22(18), 2640-2649.

- Roche, D. B., Brackenridge, D. A., & McGuffin, L. J. (2015). Proteins and Their Interacting Partners: An Introduction to Protein–Ligand Binding Site Prediction Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijms161226202>
- Roppongi, S., Suzuki, Y., Tateoka, C., Fujimoto, M., Morisawa, S., Iizuka, I., Nakamura, A., Honma, N., Shida, Y., Ogasawara, W., Tanaka, N., Sakamoto, Y., & Nonaka, T. (2018). Crystal structures of a bacterial dipeptidyl peptidase IV reveal a novel substrate recognition mechanism distinct from that of mammalian orthologues. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21056-y>
- Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. *Physiological reviews*, 98(1), 117-214.
- Rosak, C. & Mertes. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: Patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 357. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S28340>
- Schellenberg, E. S., Dryden, D. M., Vandermeer, B., Ha, C., & Korownyk, C. (2013). Lifestyle Interventions for Patients With and at Risk for Type 2 Diabetes. *Annals of Internal Medicine*, 159(8), 543-551. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-159-8-201310150-00007>
- Schubert, K. M., Scheid, M. P., & Duronio, V. (2000). Ceramide Inhibits Protein Kinase B/Akt by Promoting Dephosphorylation of Serine 473 *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13330-13335. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.18.13330>
- Seino, Y., Miyata, Y., Hiroi, S., Hirayama, M., & Kaku, K. (2012). Efficacy and safety of alogliptin added to metformin in Japanese patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial with an open-label, long-term extension study. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(10), 927-936. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2012.01620.x>
- Selick, H. E., Beresford, A. P., & Tarbit, M. H. (2002). The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 7(2), 109-116. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02100-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02100-6)
- Selvin, E., Steffes, M. W., Zhu, H., Matsushita, K., Wagenknecht, L., Pankow, J., Coresh, J., & Brancati, F. L. (2010). Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. *New England Journal of Medicine*, 362(9), 800-811. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908359>
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C., & Na, D. (2021). In silico methods and tools for drug discovery. *Computers in Biology and Medicine*, 137, 104851. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104851>
- Shuli, Z., Linlin, L., Li, G., Yinghu, Z., Nan, S., Haibin, W., & Hongyu, X. (2022). Bioinformatics and Computer Simulation Approaches to the Discovery and Analysis of Bioactive Peptides. *Current Pharmaceutical*

- Biotechnology*, 23(13), 1541-1555.
<https://doi.org/10.2174/1389201023666220106161016>
- Simoneau, J.-A., Veerkamp, J. H., Turcotte, L. P., & Kelley, D. E. (1999). Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: Relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *The FASEB Journal*, 13(14), 2051-2060.
- Sinha, R., Fisch, G., Teague, B., Tamborlane, W. V., Banyas, B., Allen, K., Savoye, M., Rieger, V., Taksali, S., Barbetta, G., Sherwin, R. S., & Caprio, S. (2002). Prevalence of Impaired Glucose Tolerance among Children and Adolescents with Marked Obesity. *New England Journal of Medicine*, 346(11), 802-810. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012578>
- Śledź, P., & Cafilisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: From docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 48, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.010>
- Smith, D. A., Beaumont, K., Maurer, T. S., & Di, L. (2015). Volume of Distribution in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(15), 5691-5698. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00201>
- Sneha, P., & Doss, C. G. P. (2016). Gliptins in managing diabetes-Reviewing computational strategy. *Life Sciences*, 166, 108-120.
- Sterrett, J. J., Bragg, S., & Weart, C. W. (2016). Type 2 diabetes medication review. *The American journal of the medical sciences*, 351(4), 342-355.
- Syed, H., Naha, S., Khangura, D., Gardner, M., Kurukulasuriya, L. R., & Sowers, J. R. (2023). Diabetes and Hypertension. En *The Diabetes Textbook: Clinical Principles, Patient Management and Public Health Issues* (pp. 627-643). Springer.
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.-H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143-2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Tanchuk, V. Y., Tanin, V. O., Vovk, A. I., & Poda, G. (2016). A New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Chemical Biology & Drug Design*, 87(4), 618-625. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12697>
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., & Chen, X. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 33-45. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>
- Taratula, O., Hill, P. A., Khan, N. S., Carroll, P. J., & Dmochowski, I. J. (2010). Crystallographic observation of «induced fit» in a cryptophane host-guest model system. *Nature Communications*, 1(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms1151>
- Tentolouris, A., Vlachakis, P., Tzeravini, E., Eleftheriadou, I., & Tentolouris, N. (2019). SGLT2 Inhibitors: A Review of Their Antidiabetic and Cardioprotective Effects. *International Journal of Environmental*

- Research and Public Health*, 16(16), Article 16.
<https://doi.org/10.3390/ijerph16162965>
- Theodorakis, M. J., Carlson, O., Michopoulos, S., Doyle, M. E., Juhaszova, M., Petraki, K., & Egan, J. M. (2006). Human duodenal enteroendocrine cells: Source of both incretin peptides, GLP-1 and GIP. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(3), E550-E559. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00326.2004>
- Timmers, S., Schrauwen, P., & de Vogel, J. (2008). Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology & Behavior*, 94(2), 242-251. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.12.002>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tu, M., Cheng, S., Lu, W., & Du, M. (2018). Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>
- Valaiyapathi, B., Gower, B., & Ashraf, A. P. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes in children and adolescents. *Current diabetes reviews*, 16(3), 220-229.
- van de Waterbeemd, H., & Gifford, E. (2003). ADMET In silico modelling: Towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrd1032>
- van de Weijer, T., Schrauwen-Hinderling, V. B., & Schrauwen, P. (2011). Lipotoxicity in type 2 diabetic cardiomyopathy. *Cardiovascular Research*, 92(1), 10-18. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr212>
- Vella, A. (2012). Mechanism of Action of DPP-4 Inhibitors—New Insights. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97(8), 2626-2628. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2396>
- Vidal-Limon, A., Aguilar-Toalá, J. E., & Liceaga, A. M. (2022). Integration of Molecular Docking Analysis and Molecular Dynamics Simulations for Studying Food Proteins and Bioactive Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(4), 934-943. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06110>
- Villaró, S., Jiménez-Márquez, S., Musari, E., Bermejo, R., & Lafarga, T. (2023). Production of enzymatic hydrolysates with In vitro antioxidant, antihypertensive, and antidiabetic properties from proteins derived from *Arthrospira platensis*. *Food Research International*, 163, 112270.
- Vilsbøll, T., Knop, F. K., Krarup, T., Johansen, A., Madsbad, S., Larsen, S., Hansen, T., Pedersen, O., & Holst, J. J. (2003). The pathophysiology of diabetes involves a defective amplification of the late-phase insulin response to glucose by glucose-dependent insulinotropic polypeptide—Regardless of etiology and phenotype. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), 4897-4903.

- Walters, W. P. (2012). Going further than Lipinski's rule in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(2), 99-107. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.648612>
- Wang, T.-Y., Hsieh, C.-H., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Lin, P.-Y., Hsieh, Y.-L., & Hsu, K.-C. (2017). A study to evaluate the potential of an In silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity In vitro of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 234, 431-438.
- Wang, W., Liu, X., Li, Y., You, H., Yu, Z., Wang, L., Liu, X., & Ding, L. (2022). Identification and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from oat proteins. *Foods*, 11(10), 1406.
- Xiao, N., Wang, Z., Huang, Y., Daneshgari, F., & Liu, G. (2013). Roles of Polyuria and Hyperglycemia in Bladder Dysfunction in Diabetes. *The Journal of Urology*, 189(3), 1130-1136. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.222>
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W5-W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Xu, F., Yao, Y., Xu, X., Wang, M., Pan, M., Ji, S., Wu, J., Jiang, D., Ju, X., & Wang, L. (2019). Identification and quantification of DPP-IV-inhibitory peptides from hydrolyzed-rapeseed-protein-derived napin with analysis of the interactions between key residues and protein domains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(13), 3679-3690.
- Yin, R., Xu, Y., Wang, X., Yang, L., & Zhao, D. (2022). Role of Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors in Antidiabetic Treatment. *Molecules*, 27(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/molecules27103055>
- Yokota, N., Miyakoshi, T., Sato, Y., Nakasone, Y., Yamashita, K., Imai, T., Hirabayashi, K., Koike, H., Yamauchi, K., & Aizawa, T. (2017). Predictive models for conversion of prediabetes to diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, 31(8), 1266-1271. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.01.005>
- Zan, R., Wu, Q., Chen, Y., Wu, G., Zhang, H., & Zhu, L. (2023). Identification of Novel Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Peptides in Chickpea Protein Hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(21), 8211-8219. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00603>
- Zhou, X., Ling, M., Lin, Q., Tang, S., Wu, J., & Hu, H. (2023). Effectiveness Analysis of Multiple Initial States Simulated Annealing Algorithm, A Case Study on the Molecular Docking Tool AutoDock Vina. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/10285617/>
- Zurita-Cruz, J. N., Manuel-Apolinar, L., Arellano-Flores, M. L., Gutierrez-Gonzalez, A., Najera-Ahumada, A. G., & Cisneros-González, N. (2018). Health and quality of life outcomes impairment of quality of life in type 2

diabetes mellitus: A cross-sectional study. *Health and Quality of Life Outcomes*, 16(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12955-018-0906-y>

Anexo I. Artículo publicado con resultados del proyecto de tesis.



Article

Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides from Chickpea Proteins (*Cicer arietinum* L.): Pharmacokinetics, Molecular Interactions, and Multi-Bioactivities

José Antonio Mora-Melgem ¹, Jesús Gilberto Arámburo-Gálvez ¹, Feliznando Isidro Cárdenas-Torres ¹, Jhonatan Gonzalez-Santamaria ^{1,2}, Giovanni Isai Ramírez-Torres ^{1,3}, Aldo Alejandro Arvizu-Flores ⁴, Oscar Gerardo Figueroa-Salcido ^{1,5,*} and Noé Ontiveros ^{6,*}

- ¹ Nutrition Sciences Postgraduate Program, Faculty of Nutrition Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan 80010, Mexico; joseantoniomoramelgem@gmail.com (J.A.M.-M.); gilberto.aramburo@uas.edu.mx (J.G.A.-G.); feliznando@uas.edu.mx (F.I.C.-T.); jgonzalez@utp.edu.co (J.G.-S.); giovanni.ramirez@uas.edu.mx (G.I.R.-T.)
- ² Faculty of Health and Sports Sciences, University Foundation of the Andean Area, Pereira 66001, Colombia
- ³ Faculty of Physical Education and Sports, Autonomous University of Sinaloa, Culiacan 80013, Mexico
- ⁴ Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Biological and Health Sciences, University of Sonora, Hermosillo 83000, Mexico; aldo.arvizu@unison.mx
- ⁵ Integral Postgraduate Program in Biotechnology, Faculty of Chemical and Biological Sciences, Autonomous University of Sinaloa, Ciudad Universitaria, Culiacan 80010, Mexico
- ⁶ Clinical and Research Laboratory (LACIUS, CN), Department of Chemical, Biological, and Agricultural Sciences (DCQBA), Faculty of Biological and Health Sciences, University of Sonora, Navojoa 85880, Mexico
- * Correspondence: oscar.figueroa@uas.edu.mx (O.G.F.-S.); noe.ontiveros@unison.mx (N.O.)



Citation: Mora-Melgem, J.A.; Arámburo-Gálvez, J.G.; Cárdenas-Torres, F.I.; Gonzalez-Santamaria, J.; Ramírez-Torres, G.I.; Arvizu-Flores, A.A.; Figueroa-Salcido, O.G.; Ontiveros, N. Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides from Chickpea Proteins (*Cicer arietinum* L.): Pharmacokinetics, Molecular Interactions, and Multi-Bioactivities. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1109. <https://doi.org/10.3390/ph16081109>

Academic Editors: Roberta Rocca, Hasan Demirci, Halil Ibrahim Ciftci and Belgin Sever

Received: 10 July 2023

Revised: 1 August 2023

Accepted: 1 August 2023

Published: 4 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Chickpea (*Cicer arietinum* L.) peptides can inhibit dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), an important type 2 diabetes mellitus therapeutic target. The molecular interactions between the inhibitory peptides and the active site of DPP-IV have not been thoroughly examined, nor have their pharmacokinetic properties. Therefore, the predictions of legumin- and provicilin-derived DPP-IV inhibitory peptides, their molecular interactions with the active site of DPP-IV, and their pharmacokinetic properties were carried out. Ninety-two unique DPP-IV inhibitory peptides were identified. Papan and trypsin were the enzymes with the highest A_E (0.0927) and lowest B_E (6.8625×10^{-7}) values, respectively. Peptide binding energy values ranged from -5.2 to -7.9 kcal/mol. HIS-PHE was the most potent DPP-IV inhibitory peptide and interacts with residues of the active sites S1 (TYR662) and S2 (GLU205/ARG125 (hydrogen bonds: <3.0 Å)), S2 (GLU205/GLU206 (electrostatic interactions: <3.0 Å)), and S2' pocket (PHE357 (hydrophobic interaction: 4.36 Å)). Most peptides showed optimal absorption (76.09%), bioavailability (89.13%), and were non-toxic (97.8%) stable for gastrointestinal digestion (73.9%). Some peptides (60.86%) could also inhibit ACE-I. Chickpea is a source of non-toxic and bioavailable DPP-IV-inhibitory peptides with dual bioactivity. Studies addressing the potential of chickpea peptides as therapeutic or adjunct agents for treating type 2 diabetes are warranted.

Keywords: chickpea; bioactive peptides; DPP-IV inhibitors; in silico; molecular docking; ADMET

1. Introduction

Insufficient production of and resistance to insulin are characteristics of type 2 diabetes mellitus (DM2) [1]. There are therapeutic agents available for treating approximately 537 million adults with DM2 (around 10.5% of the adult population aged 20 to 79 years) [2], but their long-term usage could develop adverse effects such as headaches, urinary tract infections, arthralgia, hypersensitivity to gliptins, and pancreatitis [3,4]. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) is a ubiquitous proteolytic enzyme involved in the degradation of incretin hormones such as glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) [5]. These hormones assist in diverse biological processes,

Anexo II. Participación en el “I Congreso Internacional de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias Biológicas y de la Salud”.



I Congreso Internacional de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias Biológicas y de la Salud
CIBYS

La Universidad de Sonora a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas y el Posgrado en Ciencias de la Salud

otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Mora J.A., Ontiveros N., Arámburo J.G., Figueroa O.G., Arvizu A.A., Ramirez G.I., Cardenas F.I.

Por la ponencia titulada “*Predicción de Péptidos de Garbanzo (Cicer Arietinum L.) Inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa IV*”, impartida en la modalidad Cartel el día Miércoles 12 de octubre de 2022, dentro del eje temático de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos / Biotechnology and Food Science en el I Congreso Internacional de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias Biológicas y de la Salud, realizado del 12 al 14 de octubre del 2022 en Hermosillo, Sonora.


Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

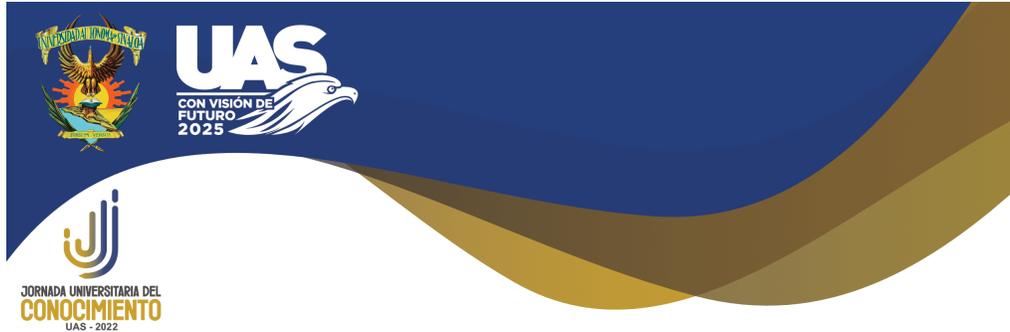

Dr. Enrique Bolado Martínez
Jefe del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas


Dra. Verónica López Teros
Coordinador de Posgrado en Ciencias de la Salud





Anexo III. Participación como ponente en la demostración de laboratorio “Determinación de la respuesta glucémica a alimentos en un modelo murino” en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2022”.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA
**DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO**
OTORGA LA PRESENTE

Constancia

LN. José Antonio Mora Melgem

A: _____

Por su destacada participación en la demostración de laboratorio "Determinación de la respuesta glucémica a alimentos en un modelo murino" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2022, llevada a cabo del 27 de Octubre al 19 de Noviembre de 2022.

"Sursum Versus"

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'MNS', is written over a horizontal line.

DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Anexo IV. Participación como ponente del taller “Uso de base de datos de compuestos bioactivos derivados de alimentos en la investigación” en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023”.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

José Antonio Mora Melgem

A: _____

Por su importante participación como instructor del taller "Taller: Uso de base de datos de compuestos bioactivos derivados de alimentos en la Investigación" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023, llevada a cabo del 16 de Octubre al 19 de Noviembre de 2023.

“Sursum Versus”



DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Anexo V. Participación como ponente del taller “Aplicación del acoplamiento molecular en la búsqueda de compuestos bioactivos de alimentos” en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023”.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

José Antonio Mora Melgem

A: _____

Por su importante participación como instructor del taller "Taller: Aplicación del acoplamiento molecular en la búsqueda de compuestos bioactivos de alimentos" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023, llevada a cabo del 16 de Octubre al 19 de Noviembre de 2023.

“Sursum Versus”

DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Anexo VI. Participación como ponente del taller “Determinación de la respuesta glucémica a alimentos en un modelo murino” en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

A TRAVÉS DE LA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

José Antonio Mora Melgem

A: _____

Por su importante participación como instructor del taller "Taller – Determinación de la respuesta glucémica a alimentos en un modelo murino" en el marco de la Jornada Universitaria del Conocimiento UAS 2023, llevada a cabo del 16 de Octubre al 19 de Noviembre de 2023.

“Sursum Versus”



DR. MARIO NIEVES SOTO
DIRECTOR GENERAL INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



Anexo VII. Participación como ponente en conmemoración del “Día Mundial de la Diabetes”.



Anexo VIII. Péptidos liberados de la hidrólisis con tripsina sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μM
Provicilina	8769	DR	[203-204]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8780	FR	[135-136]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	321.3650	0
Provicilina	8806	IR	[442-443]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	287.3480	0
Provicilina	8858	PK	[195-196]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	243.2910	0
Legumina	8921	VK	[247-248]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.3070	0

Anexo IX. Péptidos liberados de la hidrólisis con pepsina sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μM
Provicilna	8782	GF	[63-64]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilna	8782	GF	[377-378]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilna	8561	GL	[74-75]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	188.2120	2615.03
Legumina	8791	HF	[473-474]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Provicilna	8557	HL	[72-73]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	268.3020	143.19
Provicilna	8891	SF	[176-177]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Legumina	8891	SF	[10-11]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Provicilna	8560	SL	[6-7]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilna	8560	SL	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[8-9]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilna	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Legumina	8940	YL	[182-183]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	294.3300	0

Anexo X. Péptidos liberados de la hidrólisis con quimiotripsina sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μM
Provicilina	8782	GF	[63-64]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8782	GF	[375-376]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Legumina	8782	GF	[312-313]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8561	GL	[74-75]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	188.2120	2615.03
Legumina	8788	GY	[98-99]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	238.2220	0
Legumina	8804	IN	[444-445]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.2640	0
Provicilina	8854	PF	[362-363]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	262.2940	0
Provicilina	8856	PH	[295-296]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2590	0
Provicilina	8891	SF	[176-177]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Legumina	8891	SF	[10-11]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Provicilina	8560	SL	[6-7]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8560	SL	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[8-9]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[78-79]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8917	VF	[103-104]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Provicilina	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Legumina	8924	VN	[224-225]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	231.2370	0

Anexo XI. Péptidos liberados de la hidrólisis con digestión gástrica simulada sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μ M
Provicilina	8769	DR	[203-204]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8769	DR	[440-441]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Provicilina	8782	GF	[63-64]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8782	GF	[375-376]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Legumina	8782	GF	[312-313]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8561	GL	[74-75]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	188.2120	2615.03
Legumina	8788	GY	[98-99]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	238.2220	0
Provicilina	8802	IL	[139-140]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Legumina	8804	IN	[444-445]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.2640	0
Provicilina	8806	IR	[442-443]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	287.3480	0
Provicilina	8854	PF	[362-363]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	262.2940	0
Provicilina	8856	PH	[295-296]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2590	0
Provicilina	8858	PK	[195-196]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	243.2910	0
Provicilina	8870	QF	[153-154]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Legumina	8870	QF	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Provicilina	8891	SF	[176-177]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Legumina	8891	SF	[10-11]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Provicilina	8894	SK	[230-231]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	233.2540	0
Provicilina	8560	SL	[6-7]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8560	SL	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8560	SL	[128-129]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[8-9]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08

Legumina	8560	SL	[78-79]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[426-427]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8900	TF	[110-111]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	266.2820	0
Legumina	8917	VF	[103-104]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Legumina	8921	VK	[247-248]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.3070	0
Provicilina	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[186-187]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Legumina	8924	VN	[132-133]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	231.2370	0
Legumina	8924	VN	[224-225]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	231.2370	0

Anexo XII. Tabla... Péptidos liberados de la hidrólisis con papaína sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μ M
Legumina	8770	EG	[121-122]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8770	EG	[137-138]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8791	HF	[473-474]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Provicilina	8557	HL	[72-73]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	268.3020	143.19
Legumina	8520	HP	[477-478]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2590	2820
Provicilina	8802	IL	[139-140]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8804	IN	[378-379]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.2640	0
Provicilina	8810	KG	[311-312]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	203.2260	0
Legumina	8810	KG	[387-388]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	203.2260	0
Provicilina	8849	NR	[162-163]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	288.2920	0
Provicilina	8855	PG	[409-410]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[105-106]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[463-464]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Provicilina	8870	QF	[153-154]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Legumina	8870	QF	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Provicilina	8532	QP	[431-432]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	243.2480	0
Legumina	8532	QP	[25-26]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	243.2480	0
Provicilina	8891	SF	[176-177]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Legumina	8891	SF	[10-11]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Legumina	8891	SF	[347-348]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2570	0
Provicilina	8560	SL	[6-7]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8560	SL	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08

Provicilina	8560	SL	[291-292]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[8-9]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Legumina	8560	SL	[364-365]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2400	2517.08
Provicilina	8917	VF	[122-123]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Provicilina	8918	VG	[317-318]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	174.1850	0
Provicilina	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[186-187]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Legumina	8927	VT	[345-346]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2380	0
Legumina	8935	YF	[99-100]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	328.3470	0
Legumina	8940	YL	[182-183]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	294.3300	0

Anexo XIII. Péptidos liberados de la hidrólisis con alcalasa sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μ M
Provicilina	8773	ES	[244-245]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	234.1960	0
Legumina	8782	GF	[212-213]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8782	GF	[63-64]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8782	GF	[375-376]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	222.2290	0
Provicilina	8561	GL	[74-75]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	188.2120	2615.03
Legumina	8791	HF	[473-474]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Provicilina	8791	HF	[426-427]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Provicilina	8557	HL	[72-73]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	268.3020	143.19
Legumina	8802	IL	[382-383]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8802	IL	[449-450]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Legumina	8804	IN	[444-445]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.2640	0
Legumina	8807	IW	[457-458]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	317.3730	0
Legumina	8809	KF	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3510	0
Provicilina	8916	VE	[56-57]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	246.2490	0
Legumina	8917	VF	[103-104]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Legumina	8917	VF	[148-149]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Legumina	8917	VF	[403-404]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Provicilina	8917	VF	[58-59]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Provicilina	8917	VF	[122-123]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0
Provicilina	8920	VI	[217-218]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	0
Legumina	8921	VK	[245-246]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.3070	0
Provicilina	8922	VL	[92-93]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74

Provicilina	8922	VL	[101-102]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[104-105]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[186-187]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8925	VQ	[340-341]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.2640	0
Legumina	8926	VS	[162-163]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0
Provicilina	8926	VS	[37-38]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0
Provicilina	8926	VS	[67-68]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0
Provicilina	8926	VS	[241-242]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0
Provicilina	8927	VT	[120-121]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	218.2380	0

Anexo XIV. Péptidos liberados de la hidrólisis con ficina sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μ M
Provicilina	8769	DR	[203-204]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8769	DR	[429-430]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8770	EG	[48-49]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8770	EG	[121-122]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8770	EG	[137-138]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Provicilina	8773	ES	[244-245]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	234.1960	0
Legumina	8773	ES	[116-117]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	234.1960	0
Provicilina	8802	IL	[139-140]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8802	IL	[449-450]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Legumina	8802	IL	[382-383]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8806	IR	[442-443]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	287.3480	0
Provicilina	8849	NR	[162-163]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	288.2920	0
Provicilina	8854	PF	[362-363]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	262.2940	0
Provicilina	8855	PG	[409-410]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[105-106]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[463-464]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Provicilina	8856	PH	[295-296]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2590	0
Provicilina	8858	PK	[195-196]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	243.2910	0
Provicilina	8870	QF	[153-154]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Legumina	8870	QF	[61-62]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3080	0
Provicilina	8900	TF	[110-111]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	266.2820	0
Legumina	8917	VF	[403-404]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	264.3100	0

Provicilina	8918	VG	[317-318]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	174.1850	0
Legumina	8921	VK	[247-248]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	245.3070	0
Provicilina	8922	VL	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8922	VL	[186-187]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	230.2930	74
Provicilina	8926	VS	[37-38]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0
Provicilina	8926	VS	[241-242]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.2130	0

Anexo XV. Péptidos liberados de la hidrólisis con bromelina sobre la legumina y provicilina del garbanzo.

Proteína	Péptido ID	Secuencia	Locación	Actividad	Peso molecular	EC50 μ M
Provicilina	8769	DR	[416-417]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8769	DR	[429-430]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	289.2770	0
Legumina	8770	EG	[48-49]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8770	EG	[121-122]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Legumina	8770	EG	[137-138]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	204.1680	0
Provicilina	8773	ES	[244-245]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	234.1960	0
Legumina	8773	ES	[116-117]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	234.1960	0
Legumina	8774	ET	[109-110]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	248.2210	0
Provicilina	8791	HF	[426-427]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Legumina	8791	HF	[473-474]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	302.3190	0
Provicilina	8557	HL	[72-73]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	268.3020	143.19
Provicilina	8525	IA	[69-70]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	202.2390	0
Provicilina	8525	IA	[166-167]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	202.2390	0
Legumina	8525	IA	[160-161]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	202.2390	0
Legumina	8525	IA	[422-423]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	202.2390	0
Provicilina	8802	IL	[139-140]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8802	IL	[168-169]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8802	IL	[304-305]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8802	IL	[449-450]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Legumina	8802	IL	[382-383]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	244.3200	0
Provicilina	8304	IPA	[357-359]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	299.3560	49
Legumina	8809	KF	[124-125]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	293.3510	0

Provicilina	8810	KG	[311-312]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	203.2260	0
Legumina	8810	KG	[248-249]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	203.2260	0
Legumina	8810	KG	[387-388]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	203.2260	0
Legumina	3173	MA	[1-2]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	220.2770	0
Provicilina	8849	NR	[162-163]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	288.2920	0
Legumina	8849	NR	[133-134]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	288.2920	0
Legumina	8849	NR	[225-226]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	288.2920	0
Legumina	8854	PF	[471-472]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	262.2940	0
Provicilina	8855	PG	[409-410]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[105-106]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8855	PG	[463-464]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	172.1690	0
Legumina	8863	PT	[144-145]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	216.2220	0
Legumina	8932	YA	[384-385]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2490	0
Legumina	8932	YA	[394-395]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	252.2490	0
Provicilina	8935	YF	[95-96]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	328.3470	0
Legumina	8935	YF	[99-100]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	328.3470	0
Legumina	8940	YL	[182-183]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	294.3300	0
Legumina	8946	YV	[433-434]	Inhibidor de la dipeptidil peptidasa IV	280.3030	0

Anexo XVI. ADMET

Péptido Fármaco	Regla de Lipinski	HIA	F 20%	F 30%	VD (L/kg)	T 1/2 (h)	ROAT (mg/kg)
	MW<=500; logP<=5; Hacc<=10; Hdon<=5	HIA<30% = + ; HIA>30% = -	≥20%: F20-; <20%: F20+	≥30%: F30-; <30%: F30+	0.04-20	0.5	> 500
Omarigliptin a	Aceptado	(---)	(---)	(---)	1.324	0.151	(-)
Saxagliptina	Aceptado	(---)	(---)	(---)	1.261	0.309	(+++)
Vildagliptina	Aceptado	(---)	(---)	(---)	1.063	0.37	(+++)
DR	Aceptado	(+++)	(++)	(-)	0.819	0.542	(---)
EG	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.279	0.8	(---)
ES	Aceptado	(-)	(---)	(-)	0.453	0.884	(---)
ET	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.302	0.929	(---)
FR	Aceptado	(+)	(--)	(++)	0.35	0.826	(--)
GF	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.284	0.886	(---)
GL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.446	0.874	(---)
GY	Aceptado	(---)	(--)	(---)	0.357	0.895	(---)
HF	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.323	0.92	(--)
HL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.402	0.919	(--)
HP	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.384	0.907	(---)
IA	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.35	0.849	(---)
IL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.39	0.851	(-)
IN	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.333	0.52	(---)
IPA	Aceptado	(+)	(---)	(---)	0.336	0.854	(---)
IR	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.532	0.384	(--)
IW	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.255	0.91	(++)
KF	Aceptado	(++)	(---)	(---)	0.415	0.835	(--)
KG	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.619	0.709	(---)
MA	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.368	0.886	(---)
NR	Aceptado	(+)	(+++)	(++)	0.788	0.422	(---)
PF	Aceptado	(-)	(+)	(+++)	0.461	0.823	(-)

PG	Aceptado	(+)	(--)	(-)	0.609	0.766	(---)
PH	Aceptado	(---)	(+)	(+++)	0.5	0.887	(--)
PK	Aceptado	(++)	(-)	(++)	0.723	0.739	(---)
PT	Aceptado	(---)	(--)	(---)	0.596	0.881	(---)
QF	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.249	0.61	(---)
QP	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.32	0.491	(---)
SF	Aceptado	(+)	(---)	(---)	0.683	0.805	(---)
SK	Aceptado	(++)	(---)	(--)	0.558	0.829	(---)
SL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.368	0.871	(---)
TF	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.419	0.803	(---)
VE	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.279	0.825	(---)
VF	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.254	0.872	(-)
VG	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.304	0.775	(---)
VI	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.428	0.865	(-)
VK	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.599	0.732	(---)
VL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.39	0.836	(--)
VN	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.309	0.498	(---)
VQ	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.332	0.506	(---)
VS	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.674	0.817	(---)
VT	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.559	0.893	(---)
YA	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.277	0.894	(---)
YF	Aceptado	(--)	(---)	(---)	0.181	0.921	(-)
YL	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.299	0.909	(--)
YV	Aceptado	(---)	(---)	(---)	0.294	0.91	(--)

ANEXO XVII. Constancia de Actividad de Retribución social



Otorga la presente

Folio: 00096

CONSTANCIA



Jornada Integral de Salud UAS 2023-2024

A: José Antonio Mora Melgem

Por haber apoyado en la Jornada Integral de Salud UAS 2023-2024 durante el periodo del 16 de octubre al 16 de noviembre de 2023 en el marco del Día Internacional de Lucha contra el Cáncer de Mama. Con su colaboración se logró beneficiar a la comunidad universitaria, así como a la sociedad sinaloense, promoviendo una cultura de la prevención y fomentando una salud integral para todos.

Atentamente
"Sursum Versus"
Culiacán, Sinaloa a 16 de noviembre de 2023



MC. Sofia Angulo Olivas
Directora de la Unidad de Bienestar Universitario