

Artículo original

# Proteínas lácteas como fuente dietaria de biopéptidos antidiabéticos: estudio de la nutraceutica de los lácteos en la diabetes *mellitus* desde la biología computacional

Jorge Andrés Barrero <sup>1</sup>, Angélica María González Clavijo <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

**Cómo citar:** Barrero JA, González-Clavijo AM. Proteínas lácteas como fuente dietaria de biopéptidos antidiabéticos: estudio de la nutraceutica de los lácteos en la diabetes mellitus desde la biología computacional. Rev Colomb Endocrinol Diabet Metab. 2022;9(2):e701. <https://doi.org/10.53853/encr.9.2.701>

Recibido: 9/Noviembre/2021

Aceptado: 24/Marzo/2022

Publicado: 31/Marzo/2022

## Resumen

**Contexto:** el consumo de lácteos se ha asociado con un menor riesgo de desarrollar diabetes *mellitus* tipo 2. Si bien los mecanismos subyacentes no se conocen en su totalidad, estudios recientes sugieren que este papel protector está en relación con las propiedades biológicas de las proteínas lácteas.

**Objetivo:** determinar la viabilidad de los lácteos como fuente dietaria de biopéptidos con propiedades antidiabéticas.

**Metodología:** se analizaron las proteínas lácteas de mayor concentración en la leche de cinco especies: bovino, oveja, cabra, búfalo y humano. Estas fueron sometidas a digestión simulada en BIOPEP-UWM y, posteriormente, a un análisis *in silico* del porcentaje de absorción gastrointestinal, excreción renal y concentración efectiva media (EC50).

**Resultados:** se obtuvo un total de 51 dipéptidos y tripéptidos bioactivos inhibidores de la dipeptidil peptidasa-IV (iDPP-IV). Los 13 biopéptidos con mayor perfil de absorción gastrointestinal fueron aquellos dipéptidos con residuos de leucina y triptófano en la posición C-terminal, siendo estos los aminoácidos más frecuentes en los compuestos iDPP-IV. Asimismo, seis de los trece biopéptidos altamente absorbibles mostraron ser producto de la digestión de proteínas presentes en la leche de las cinco especies. El análisis del perfil bioactivo reveló 12 blancos moleculares de alta afinidad, de los cuales dos, DPP-IV y calpaína-I, se encuentran involucrados en la fisiopatología de la diabetes.

**Conclusiones:** este estudio describe parámetros como absorción gastrointestinal, excreción renal teórica y EC50 de inhibición de DPP-IV para los biopéptidos con acción antidiabética, aportando nuevo conocimiento a las propiedades nutraceuticas de los lácteos en la diabetes y postulando, como mecanismo subyacente, la liberación de biopéptidos iDPP-IV durante la digestión gastrointestinal.

**Palabras clave:** péptidos bioactivos, productos lácteos, inhibidores de la dipeptidil-peptidasa IV, suplementos dietéticos, diabetes *mellitus* tipo 2.

## Destacados

- La proteólisis *in silico* de las caseínas y las proteínas del suero de los lácteos simula la digestión gastrointestinal a partir de la cual se evidencia la liberación de biopéptidos inhibidores de DPP-IV.
- Frente a la sitagliptina, los biopéptidos antidiabéticos con mayor probabilidad de absorción gastrointestinal exhiben valores menores de concentración efectiva media (EC50) y menor tasa de aclaramiento renal; sin embargo, estos también muestran alta afinidad por la DPP-IV y, algunos, por la calpaína-I.
- La potenciación del efecto incretina asociada a la inhibición de DPP-IV por acción de los biopéptidos puede hacer parte de los mecanismos moleculares subyacentes a las propiedades antidiabéticas de los lácteos.

 **Correspondencia:** Jorge Andrés Barrero. Av. carrera 30 #45-03, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Correo-e: [jobarreroc@unal.edu.co](mailto:jobarreroc@unal.edu.co)

# Dairy proteins as a dietary source of anti-diabetic biopeptides: A computational biology study of the nutraceutical properties of dairy products in diabetes mellitus

## Abstract

**Background:** Dietary dairy intake has been associated with a lower risk of developing type 2 diabetes mellitus. While the underlying mechanisms are not fully understood, recent studies suggest that this protective role is linked to the biological properties of dairy proteins.

**Objective:** Determine the viability of dairy as a dietary source of biopeptides with anti-diabetic properties.

**Methodology:** We analyzed the dairy proteins with the highest concentration in the milk of five species: bovine, sheep, goat, buffalo, and human. These were later subjected to simulated digestion in the BIOPEP-UWM platform, and subsequently to an *in silico* analysis of the percentage of gastrointestinal absorption, renal excretion, and mean effective concentration (EC50).

**Results:** A total of 51 di- and tripeptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory bioactivity (iDPP-IV) were obtained. The 13 biopeptides with the highest gastrointestinal absorption probability were those dipeptides with leucine and tryptophan residues in the C-terminal position, being these the most frequent amino acids in the iDPP-IV compounds. Moreover, six of the thirteen highly absorbable biopeptides appeared to derive from the digestion of proteins present in the milk of the five species. The bioactive profile analysis revealed 12 high-affinity molecular targets, of which two, DPP-IV and calpain-I, are involved in diabetes pathophysiology.

**Conclusions:** This study outlines parameters such as the gastrointestinal absorption, theoretical renal excretion, and anti-diabetic biopeptides' EC50 of DPP-IV inhibition thereby contributing new insights into the nutraceutical properties of dairy products and stating the release of iDPP-IV biopeptides during gastrointestinal digestion as an underlying mechanism of dairy intake reduction of type 2 diabetes mellitus risk.

**Keywords:** Bioactive peptides; Dairy products; Dipeptidyl-peptidase IV inhibitors; Dietary supplements; Type 2 diabetes mellitus

## Highlights

- *In silico* proteolysis of caseins and dairy whey proteins simulates gastrointestinal digestion from which the release of DPP-IV inhibitory biopeptides is evidenced.
- Compared to sitagliptin, the antidiabetic biopeptides with higher probability of gastrointestinal absorption exhibit lower mean effective concentration (EC50) values and lower renal clearance rate; however, these also show high affinity for DPP-IV and, some, for calpain-I.
- The potentiation of the incretin effect associated with the inhibition of DPP-IV by the action of biopeptides may be part of the molecular mechanisms underlying the antidiabetic properties of dairy products.

## Introducción

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es una enfermedad metabólica no transmisible que actualmente constituye un problema de salud pública a nivel mundial. Dentro de las estrategias terapéuticas más importantes para su prevención se incluyen las intervenciones nutricionales que involucran cambios significativos en la alimentación (1). El consumo dietario de lácteos en la DM2 fue estudiado por Gao *et al.* (2) en un metaanálisis de 16 investigaciones publicadas entre el 2005 y el 2013, con 526 998 pacientes adultos entre los 20 y los 70 años, de los cuales 29 789 eran diabéticos. En este, los autores reportaron una asociación lineal inversa entre el

consumo de productos lácteos totales y el riesgo de padecer de DM2 (RR: 0,94; 95% CI 0,91–0,97) (2).

Más recientemente, Fan *et al.* (3) desarrollaron un metaanálisis en el cual, en concordancia con los hallazgos de Gao *et al.* (2), se encontró una relación inversa entre la ingesta de proteínas lácteas en la dieta y el riesgo de DM2. De acuerdo con su investigación, publicada en la revista *Nutrients* en el año 2019, a partir de 60 estudios con 2 623 984 sujetos, de los cuales 141 471 eran diabéticos, se determinó que un consumo diario de 200 g de leche reduce el riesgo de DM2 en un 9%, mientras que se constata una reducción del 17% cuando la ingesta de yogurt es mayor de 60 g/día. En la actualidad,

se postula que el papel antidiabético de los lácteos es atribuible en gran medida a las propiedades biológicas en la regulación glicémica de las proteínas lácteas (4). No obstante, los mecanismos bioquímicos por los cuales estas logran reducir los niveles de glucosa posprandial no se han dilucidado en su totalidad (4).

La presente investigación desarrolla un estudio *in silico* de las propiedades antidiabéticas de los lácteos a partir del análisis de los biopéptidos, derivados de la digestión de las proteínas lácteas, profundizando en parámetros como la absorción gastrointestinal, la excreción renal, la concentración efectiva media y los potenciales blancos de acción moleculares.

La aplicación de técnicas de biología computacional provee evidencia de la bioquímica inherente a las propiedades nutracéuticas de los lácteos y busca aproximarse al escenario de mayor similitud con la fisiología humana con la finalidad de estudiar el posible mecanismo subyacente al papel protector de la leche frente al desarrollo DM2. Los resultados derivados de este estudio permitirían explorar nuevas fronteras en la nutrición del paciente con desordenes metabólicos.

## Materiales y métodos

El análisis de los macronutrientes lácteos se centró en los principales componentes de la fracción sólida no-grasa de la leche: caseínas y proteínas del suero. Los constituyentes proteicos de la leche con mayor porcentaje de concentración fueron seleccionados, para un total de cuatro proteínas de tipo caseína ( $\alpha$ S1-caseína,  $\alpha$ S2-caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína) y dos proteínas del suero ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina). A su vez, se analizaron las isoformas de las proteínas correspondientes a cinco organismos mamíferos, de los cuales el consumo de leche es común: bovino (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*), búfalo (*Bubalus bubalis*) y humano (*Homo sapiens*).

Las proteínas lácteas fueron sometidas a proteólisis *in silico* en la plataforma Biopep-UWM (5). La simulación computacional de las digestiones gástrica y pancreática se llevó a cabo a

partir de la utilización de las principales proteasas presentes en el tracto gastrointestinal humano: pepsina (pH 1,3), quimotripsina y tripsina. Los productos derivados del clivaje proteolítico fueron analizados y filtrados según la clasificación dada por la plataforma Biopep-UWM, la cual determina que un compuesto es bioactivo con base en estudios *in vitro*, donde se reporta la acción biológica, en este caso antidiabética, de dichos biopéptidos. Se recopiló el número total, el valor de la concentración efectiva media (EC50) y la secuencia de péptidos bioactivos obtenidos del sustrato analizado.

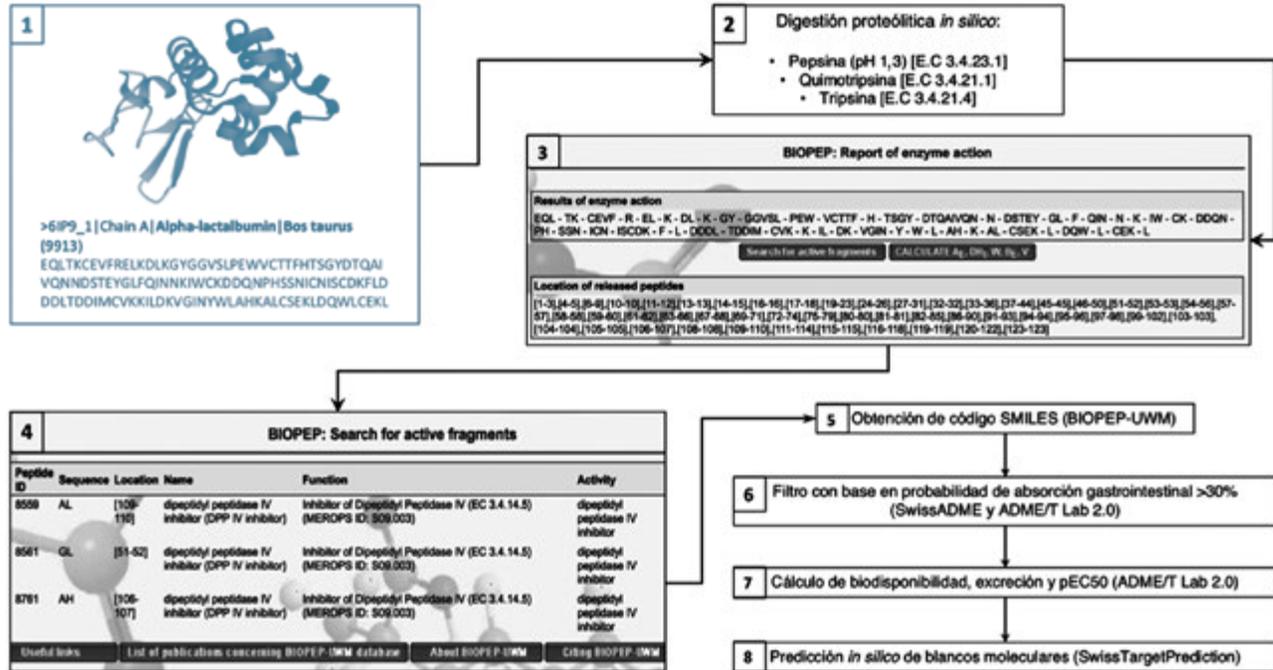
Posteriormente, se obtuvo el código de especificación de introducción lineal molecular simplificada (Smiles) para los biopéptidos antidiabéticos, permitiendo el cálculo estimado de parámetros como la absorción gastrointestinal, biodisponibilidad, tasa de aclaramiento renal e identificación de posibles blancos moleculares, mediante plataformas de biología computacional.

Por medio del estudio de la absorción gastrointestinal, se realizó la selección de los biopéptidos antidiabéticos con mayor probabilidad de alcanzar la circulación sistémica luego de su ingesta en la dieta. El análisis de la probabilidad de absorción se realizó a partir de dos filtros (SwissADME y ADME/T Lab 2.0). Inicialmente, los biopéptidos antidiabéticos obtenidos de la digestión de proteínas lácteas fueron sometidos a un análisis de probabilidad de absorción en la plataforma SwissADME (6), donde fueron clasificados como moléculas de "alta" o "baja" absorción. Consiguientemente, para aquellos biopéptidos clasificados como "altamente absorbibles", se determinó la probabilidad de alcanzar una absorción gastrointestinal mayor al 30% mediante la plataforma ADME/T Lab 2.0 (7). El análisis posterior se realizó únicamente para los biopéptidos "altamente absorbibles" y con una probabilidad > 98% de alcanzar una absorción gastrointestinal superior al 30%.

En la plataforma ADME/T Lab 2.0 se realizó el cálculo estimado de la probabilidad del compuesto de alcanzar valores de biodisponibilidad superiores al 30% y se estudió la excreción a partir de la estimación de la tasa de aclaramiento renal. Finalmente, se abordó el

perfil bioactivo multifuncional de los biopéptidos mediante la determinación de los posibles blancos moleculares a partir del análisis en la plataforma SwissTargetPrediction (8).

El abordaje general empleado para el estudio de los péptidos bioactivos se ilustra en la figura 1.



**Figura 1.** Flujograma del análisis computacional de liberación de péptidos bioactivos. Ejemplo de la  $\alpha$ -lactoalbúmina que no ilustra la totalidad de los biopéptidos resultantes

**Notas aclaratorias:** [1] obtención de la secuencia de aminoácidos constituyentes de la proteína. Aminoácidos representados en nomenclatura de una sola letra. Los dipéptidos con acción inhibitoria de DPP-IV se presentan resaltados en rojo. [2] Digestión *in silico* catalizada por pepsina, tripsina y quimotripsina. [3] Puntos de clivaje y productos derivados de la digestión proteolítica. [4] Reporte de la actividad y localización en la secuencia de los biopéptidos resultantes. [5] Obtención de código de especificación de introducción lineal molecular simplificada (Smiles). [6] Análisis de la probabilidad de alcanzar una absorción gastrointestinal > 30%. [7] Cálculo de la biodisponibilidad y excreción estimada y reporte de la concentración efectiva media (EC50). [8] Evaluación de posibles blancos moleculares por análisis de afinidad.

**Fuente:** elaboración propia.

## Resultados

Los péptidos resultantes de la digestión de las proteínas lácteas reportaron actividades biológicas diversas. En concordancia con el objetivo de este estudio, se seleccionaron aquellos péptidos bioactivos con acciones biológicas involucradas

en la fisiopatología de la DM2. Así, se obtuvo un total 51 péptidos bioactivos inhibidores de la DPP-IV (iDPP-IV). En la tabla 1 se presenta la secuencia de los biopéptidos obtenidos de las isoformas de las caseínas y seroproteínas de la leche de las cinco especies estudiadas.

**Tabla 1.** Biopéptidos iDPP-IV resultantes de la digestión enzimática de caseínas y seroproteínas

Proteínas lácteas	Secuencia de los biopéptidos inhibidores de DPP-IV				
	Bovino	Oveja	Cabra	Búfalo	Humano
$\alpha$ S1-caseína	EK, VPL, AY, GY, IL, PK, QF, QL, SK, VN, PL	AY, GY, IL, PK, QF, QL, SK, PL, IN	GL, AY, GY, IL, PK, QF, QL, SK, PL, IN	VPL, AY, GY, IL, PK, QF, QL, PL	EK, IL, PK, QL, PL, QW, PY, QY, EY, QN, SH
$\alpha$ S2-caseína	AL, VR, QF, SK, TK, EH, PW, QH, QY, TM	EK, AL, VR, QF, SK, TK, EH, PW, QY, AW, TN	EK, AL, VR, QF, SK, PY, TK, EH, PW, QY, AW, TN	AL, VR, QF, SK, TK, EH, PW, QY, TM, TN, TW	-
$\beta$ -caseína	AL, SL, VL, IL, PK, PL, IN, IH, PF, TL, VK, VY, TK	AL, SL, VL, IL, PK, PL, IN, IH, PF, TL, VK, VY, TK	SL, VL, IL, PK, PL, IN, IH, PF, TL, VK, VY, TK	AL, SL, VL, IL, PK, PL, IN, IH, PF, TL, VK, VY, TK	AL, VL, IL, PL, PF, VK, TK, VM, GF
$\kappa$ -caseína	AL, VL, IPIQY, QF, IN, PF, TL, PH, QW, SF, PY	AL, VL, IPI, QF, IN, PF, TL, PH, QW, SF, PY, PN	AL, VL, IPI, QF, IN, PF, TL, PH, QW, SF, PY, PN	AL, VL, IPIQY, QF, IN, PF, TL, PH, QW, SF, PY, PN, TR	AL, PF, TL, PH, SF, PY, PN
$\beta$ -lactoglobulina	EK, GL, AL, SL, VL, VR, IPAVF, VY, TK, IR, PM	EK, GL, AL, SL, VL, VR, IPAVF, VY, TK, IR, PM, AF	EK, GL, AL, SL, VL, VR, IPAVF, VY, TK, IR, PM, AF	EK, GL, AL, SL, VL, VR, IPAVF, VY, SF, TK, IR, PM	-
$\alpha$ -lactoalbúmina	GL, AL, GY, IL, PH, SF, AH, IW, TK	GL, AL, IL, PH, SF, AH, IW, TK	GL, AL, IL, PH, SF, AH, IW, TK	GL, AL, IL, PH, SF, AH, IW, TK	VPL, GL, AL, IL, QF, AH, TK

**Notas aclaratorias:** Bovino: *Bos taurus*; Oveja: *Ovis aries*; Cabra: *Capra hircus*; Búfalo: *Bubalus bubalis*; Humano: *Homo sapiens*. Abreviaciones: E: glutamato; A: alanina; R: arginina; N: asparagina; Q: glutamina; G: glicina; H: histidina; I: isoleucina; L: leucina; K: lisina; M: metionina; F: fenilalanina; P: prolina; S: serina; T: treonina; W: triptófano; Y: tirosina; V: valina. (-): Ausencia de datos referentes a la secuencia.

**Fuente:** elaboración propia.

Al evaluar los productos derivados de la digestión *in silico* se observó que no parecen existir diferencias nutricionales en términos de cantidad de péptidos bioactivos liberados, cuando se comparan los cinco tipos de leche. La ausencia de datos referentes a la secuencia de la  $\alpha$ 2-caseína y la  $\beta$ -lactoglobulina de la leche materna dificulta la comparación cuantitativa frente a las demás isoformas, sin embargo, respecto a las proteínas lácteas analizadas, la leche materna no parece variar de los demás tipos de leche en términos de liberación de biopéptidos iDPP-IV.

Posteriormente, el análisis de probabilidad de absorción gastrointestinal resultó en 13 biopéptidos clasificados como "altamente absorbibles" en la plataforma SwissADME, y con una probabilidad mayor al 98% de alcanzar una absorción gastrointestinal > 30% según ADME/T Lab 2.0. La tabla 2 muestra las proteínas precursoras y los valores reportados de la concentración efectiva media (EC50) de inhibición de DPP-IV, biodisponibilidad y excreción de los biopéptidos absorbibles.

**Tabla 2.** Concentración efectiva media de inhibición, fuente dietaria, valores estimados de biodisponibilidad y excreción de los biopéptidos iDPP-IV

Biopéptido	pEC50	F ( $\geq$ 30%)	Excreción (cm <sup>3</sup> ·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	Fuente dietaria	Referencia
GL	2,58	99,90%	3770	$\alpha$ S1-caseína[c] $\beta$ -lactoglobulina [v, o, c, b] $\alpha$ -lactoalbúmina [v, o, c, b, h]	(9)
AL	3,05	99,90%	4252	$\alpha$ S2-caseína [v, o, c, b] $\beta$ -caseína [v, o, b, h] $\kappa$ -caseína [v, o, c, b, h] $\beta$ -lactoglobulina [v, o, c, b] $\alpha$ -lactoalbúmina [v, o, c, b, h]	(9)
SL	2,60	99,90%	4227	$\alpha$ S1-caseína[h] $\beta$ -caseína [v, o, c, b] $\beta$ -lactoglobulina [v, o, c, b]	(9)
VL	4,13	99,90%	5082	$\beta$ -caseína [v, o, c, b, h] $\kappa$ -caseína [v, o, c, b] $\beta$ -lactoglobulina [v, o, c, b]	(10)
AY	-	99,90%	3698	$\alpha$ S1-caseína [v, o, c, b]	(10)

IL	-	99,90%	5179	$\alpha$ S1-caseína [v, o, c, b, h] $\beta$ -caseína [v, o, c, b, h] $\alpha$ -lactoalbúmina [v, o, c, b, h]	(10)
IH	-	99,90%	3538	$\beta$ -caseína [v, o, c, b]	(10)
VY	-	99,70%	6962	$\beta$ -caseína [v, o, c, b] $\beta$ -lactoglobulina [v, o, c, b]	(10)
AH	-	99,90%	2467	$\alpha$ -lactoalbúmina [v, o, c, b, h]	(10)
IW	-	99,80%	3978	$\alpha$ -lactoalbúmina [v, o, c, b]	(10)
AW	-	99,80%	3172	$\alpha$ S2-caseína [o, c]	(11)
TW	4,08	99,80%	6102	$\alpha$ S2-caseína[b]	(10)
VM	-	99,90%	4453	$\beta$ -caseína[h]	(10)

**Notas aclaratorias:** superíndice [] indica la especie de la proteína precursora de la cual se obtiene el biopéptido: [v]: bovino; [o]: oveja; [c]: cabra; [b]: búfalo; [h]: humano. pEC50: -Log de la concentración efectiva media de inhibición de DPP-IV; F( $\geq$  30%): probabilidad de biodisponibilidad mayor al 30%.

**Abreviaciones:** G: glicina; L: leucina; A: alanina; S: serina; V: valina; Y: tirosina; I: isoleucina; H: histidina; W: triptófano; T: treonina. (-): Ausencia de datos referentes al valor de pEC50.

**Fuente:** elaboración propia.

Los resultados obtenidos revelan que los péptidos bioactivos iDPP-IV tienen una probabilidad promedio de  $99\,860 \pm 0,002\%$  de alcanzar un valor de biodisponibilidad superior al 30%. La excreción, evaluada a partir del cálculo estimado de la tasa de aclaramiento renal, reporta un valor promedio de  $4375 \pm 0,336 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

De los biopéptidos iDPP-IV con mayor probabilidad de absorción gastrointestinal, seis muestran ser producto de la digestión de proteínas presentes en la leche de las cinco especies. Por su parte, los biopéptidos AY (Ala-Tyr), IH (Ile-His), VY (Val-Tyr) e IW (Ile-Trp) se obtienen de las proteínas en la leche de todos los organismos, exceptuando la leche materna. Por otro lado, el dipéptido VM (Val-Met) se produce

de forma exclusiva a partir de la digestión de la isoforma de la  $\beta$ -caseína de la especie humana. El biopéptido AW (Ala-Trp) muestra ser producto de la digestión de la isoforma de la  $\alpha$ S2-caseína de la oveja y la cabra únicamente, mientras que la liberación del biopéptido TW (Thr-Trp) se da de forma exclusiva a partir de la isoforma presente en la leche de búfalo.

Finalmente, el análisis *in silico* de los blancos moleculares y el porcentaje de inhibición de proteasas se presenta en la tabla 3. Como se ilustra, el porcentaje de inhibición de proteasas representa la afinidad de los biopéptidos por enzimas con acción específica de hidrólisis de enlaces peptídicos. El valor promedio reportado por los trece biopéptidos iDPP-IV fue de  $50,81 \pm 0,03\%$ .

**Tabla 3.** Blancos moleculares y porcentaje de inhibición de proteasas

Biopéptido	*Blancos moleculares de mayor afinidad			Porcentaje de inhibición de proteasas ( 0,05)
	Proteína 1	Proteína 2	Proteína 3	
GL	COX-2	HLA-A3	DPP-IV	46,75%
AL	COX-2	DPP-IV	Neprilisina	53,30%
SL	COX-2	DPP-IV	ACE	46,70%
VL	Calpaína-I	ACE	DPP-IV	66,75%
AY	ACE	Neprilisina	Calpaína-I	40,05%
IL	ACE	Calpaína-I	DPP-IV	60,00%
IH	ATII-R	Aminopeptidasa	Carboxipeptidasa B2	60,05%
VY	ACE	Calpaína-I	Neprilisina	56,70%
AH	Carboxipeptidasa B2	ATII-R	Enzima degradadora de insulina	46,75%
IW	ACE	ET-B	DPP-IV	56,75%
AW	ACE	Calpaína-I	DPP-IV	53,30%
TW	ACE	DPP-IV	ET-A	40,05%
VM	HLA-A3	Neprilisina	Calpaína-I	33,35%

**Notas aclaratorias:** abreviaciones: G: glicina; L: leucina; A: alanina; S: serina; V: valina; Y: tirosina; I: isoleucina; H: histidina; W: triptófano; T: treonina; COX-2: ciclooxigenasa-2; HLA-A3: antígeno leucocitario humano-A3; DPP-IV: dipeptidil peptidasa-IV; ACE: enzima convertidora de angiotensina; ATII-R: receptor de angiotensina II; ET-B: receptor de endotelina B; ET-A: receptor de endotelina A.

\*Blancos moleculares organizados de mayor a menor afinidad.

**Fuente:** elaboración propia.

Los resultados permitieron evidenciar 12 blancos moleculares de alta afinidad, de los cuales dos, DPP-IV y calpaína-I, se encuentran involucrados en la fisiopatología de la DM2. Los

hallazgos adicionales revelaron una afinidad considerable por proteínas involucradas en la hipertensión, la digestión proteica y la inflamación.

## Discusión

Las propiedades terapéuticas de los alimentos, comúnmente conocidas como propiedades nutraceuticas (12), han sido blanco de extensos estudios debido a sus beneficiosos efectos en el manejo de enfermedades metabólicas (13). Acquah *et al.* (14) postulan que los productos de la digestión de macronutrientes proteicos en la dieta son los responsables de las propiedades antidiabéticas de los alimentos; sin embargo, los estudios que indagan en la absorción, la excreción y el mecanismo de acción de dichos nutraceuticos son limitados e imperativos para establecer la potencial aplicación de estos nutrientes en la prevención de la DM2. La determinación de propiedades farmacológicas para los componentes bioactivos de los alimentos requiere del diseño de ensayos in vivo que suponen elevadas inversiones económicas. En consecuencia, las investigaciones en biología computacional, conocidas como experimentación in silico, surgen como una estrategia prometedora para el estudio de moléculas con potencial terapéutico (15).

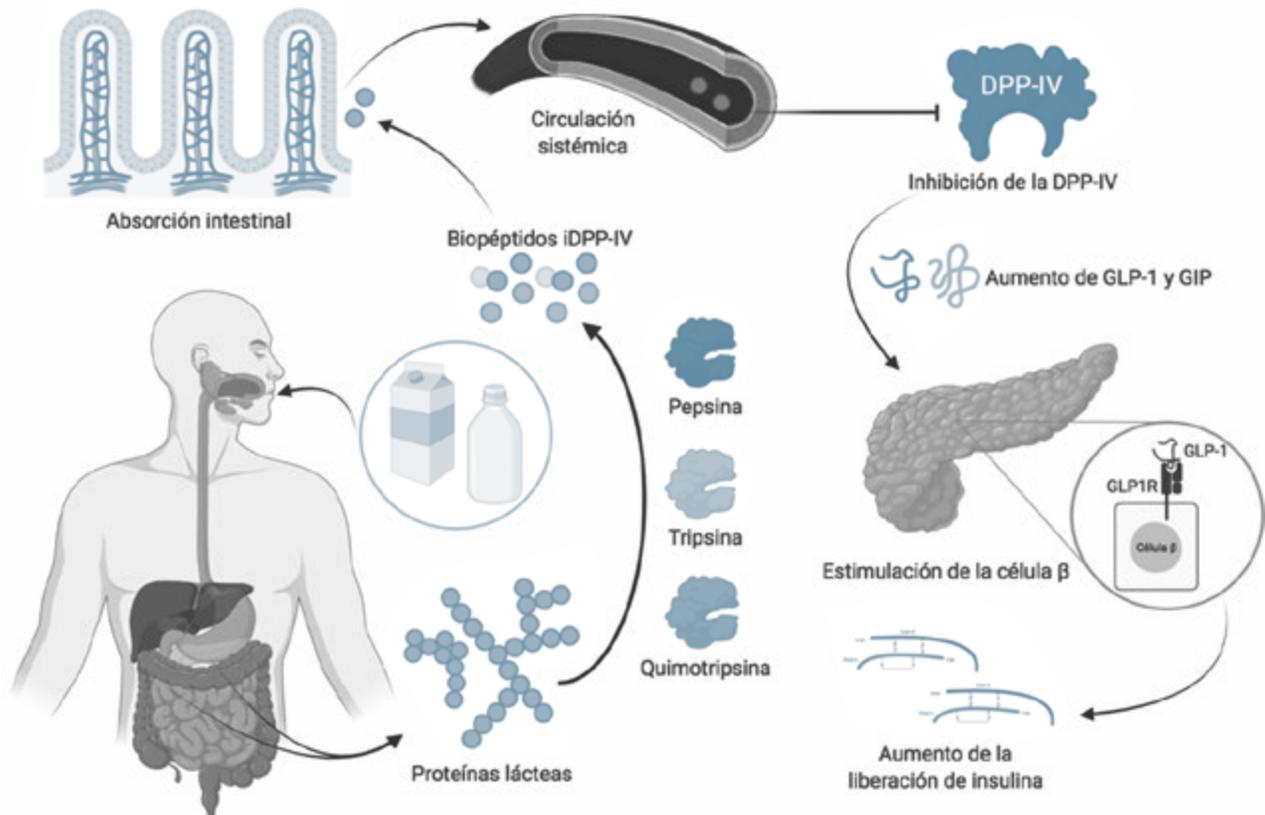
Los péptidos bioactivos, o biopéptidos, son oligopéptidos liberados de la hidrólisis enzimática durante la digestión gastrointestinal de las proteínas que proporcionan beneficios adicionales para la salud, además del valor nutricional básico inherente a los alimentos (16-18). Dentro de los mecanismos antidiabéticos descritos para algunos biopéptidos se incluyen la protección de las células  $\beta$  pancreáticas, el incremento de la secreción de insulina estimulada por glucosa y la inhibición de la dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) y, por lo tanto, de la degradación del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y del péptido insulinoatrópico dependiente de glucosa (GIP) (14, 19). En concordancia, y como se presenta en la figura 2, los resultados de la presente investigación sugieren que la absorción gastrointestinal de biopéptidos iDPP-IV y la subsecuente potenciación del efecto incretina son importantes mecanismos subyacentes a las propiedades antidiabéticas de las proteínas lácteas.

De acuerdo con Hidayat *et al.* (4), las propiedades protectoras de la leche en el desarrollo de DM2 se presentan en una relación

dosis-respuesta, de forma tal que, a mayor consumo de leche, menor riesgo. Así, conocer la variación en los valores de la concentración efectiva media (EC50) de inhibición de DPP-IV que exhiben los biopéptidos permitiría aproximarse a la relación directa entre la cantidad de leche consumida y la reducción del riesgo de DM2. Los hallazgos reportados en estudios previos ponen en evidencia el perfil bioactivo de las proteínas lácteas (20), no obstante, carecen de una descripción de la potencia de inhibición de DPP-IV y de las características de absorción y excreción que facilitan la comparación con medicamentos empleados en la farmacoterapia actual. Keller *et al.* (21) determinaron para la sitagliptina un efecto terapéutico con un pEC50 cercano a 7,52, a partir del cual se infiere que los biopéptidos, al exhibir valores de pEC50 considerablemente menores, carecen de la potencia inhibitoria de los fármacos iDPP-IV.

Resulta relevante destacar que los compuestos iDPP-IV derivados de la digestión de las proteínas lácteas son en su mayoría dipéptidos y, dada la limitada capacidad de los enterocitos para transportar péptidos de longitud superior a tres aminoácidos (18), propiedades como el tamaño molecular y la secuencia de aminoácidos constituyentes permiten pensar que la absorción de los biopéptidos en el tracto gastrointestinal es una vía factible de administración de dichos nutraceuticos. Por otro lado, las secuencias de los dipéptidos iDPP-IV resultan ser inespecíficas y potencialmente comunes a más de un tipo de alimento proteico y, aunque la frecuencia de liberación y la cantidad de biopéptidos varía de una proteína a otra (17), es válido pensar que algunos de los biopéptidos iDPP-IV estudiados podrían ser también producto de la digestión de alguna otra proteína dietaria que no fuese de origen lácteo.

De acuerdo con los resultados hallados en el presente estudio, los biopéptidos iDPP-IV exhiben una elevada probabilidad de alcanzar una biodisponibilidad superior al 30%, sin embargo se desconoce si estos lograsen aproximarse al valor de la sitagliptina, para la cual se ha determinado una biodisponibilidad cercana al 87% tras la administración oral (22). Evaluar la fracción exacta de los biopéptidos que alcanzan



**Figura 2.** Obtención dietaria y actividad biológica de los biopéptidos inhibidores de DPP-IV como mecanismo subyacente a las propiedades antidiabéticas de los lácteos

**Notas aclaratorias:** Abreviaciones: iDPP-IV: inhibidor de la dipeptidil-peptidasa IV; GLP-1: péptido similar al glucagón tipo 1; GLP1R: receptor del péptido similar al glucagón tipo 1; GIP: péptido insulínico dependiente de glucosa.

**Fuente:** elaboración propia.

la circulación sistémica luego de una ingesta oral requiere de estudios más extensos. Por otra parte, la tasa de aclaramiento renal reportada para la sitagliptina corresponde a un valor aproximado de  $5052 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  (23), de forma que posee una tasa de excreción similar, no obstante mayor, al promedio de aclaramiento de los péptidos bioactivos iDPP-IV ( $4375 \pm 0,336 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

Los estudios que evalúan las propiedades nutrácéticas de los macronutrientes proteicos han permitido evidenciar que los péptidos bioactivos exhiben una indudable afinidad por un amplio espectro de proteínas involucradas en diversas vías de señalización celular (24). La evaluación de los posibles blancos moleculares resulta, por lo

tanto, pertinente para analizar el perfil bioactivo de los productos derivados de la digestión de las proteínas lácteas. En nuestro estudio, seis de los biopéptidos con alta probabilidad de absorción gastrointestinal reportaron una importante afinidad de inhibición por la calpaína-I. Esta enzima citosólica pertenece a la familia de las proteasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes que están involucradas en la regulación de numerosos procesos como la exocitosis vesicular, la proliferación y la muerte celular (25). A su vez, la calpaína-I desencadena una proteólisis exacerbada en respuesta a las alteraciones homeostáticas del calcio que tienen lugar en la DM2 (25), conduciendo a fenómenos de degradación intracelular de proteínas que se han evidenciado, por ejemplo, en la nefropatía

diabética (26). Pese a que estos hallazgos resultan de un abordaje netamente *in silico*, dicha afinidad sugiere un mecanismo adicional mediante el cual los biopéptidos ejercen sus acciones antidiabéticas en vista de que se han propuesto inhibidores de calpaína-I como agentes terapéuticos para el manejo de la DM2 (27).

Aun cuando el abordaje metodológico del presente estudio es en esencia teórico, la experimentación *in silico* ha probado tener una eficacia elevada para predecir el potencial de liberación de biopéptidos iDPP-IV a partir de proteínas ingeridas en la dieta (28, 29). Asimismo, la simulación computacional de los procesos de digestión gástrica y pancreática permiten una aproximación al potencial antidiabético de las proteínas lácteas, pues se ha observado en estudios *in vitro* un incremento significativo en la potencia inhibitoria de DPP-IV posterior a la hidrólisis por enzimas digestivas (30). Concretamente, Uchida *et al.* (31) evidenciaron que la  $\beta$ -lactoglobulina tratada con tripsina disminuyó significativamente los niveles de glicemia tras una prueba de tolerancia a oral a la glucosa (PTOG) en modelos murinos, posiblemente, a través de la inhibición de la DPP-IV. La  $\beta$ -lactoglobulina no tratada con tripsina no mostró efecto significativo alguno. Pese a que los estudios *in vivo* son escasos, los reportes existentes proveen evidencia de que los péptidos bioactivos iDPP-IV logran regular de forma importante los valores de glucosa sérica posterior a una PTOG en roedores (32); sin embargo, dilucidar el efecto de los biopéptidos iDPP-IV en la regulación glicémica y su aplicación como potenciales suplementos dietéticos para la prevención de la DM2 en el humano permanece aún sujeto a futuras investigaciones.

## Conclusión

La liberación de dipéptidos y tripéptidos bioactivos a partir de la digestión gastrointestinal de las proteínas lácteas ingeridas en la dieta puede constituir un mecanismo subyacente a las propiedades antidiabéticas de los lácteos. Por acción de las principales enzimas digestivas, las proteínas lácteas liberan dipéptidos iDPP-IV que no parecen variar en cantidad entre las proteínas de las especies estudiadas. La inhibición de la

DPP-IV potenciaría el efecto incretina y sería uno de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la glicemia posprandial mediada por el consumo de proteínas lácteas. A pesar de que los biopéptidos iDPP-IV exhiben valores menores de pEC50 en comparación a la sitagliptina, estos muestran una alta probabilidad de absorción gastrointestinal, lo que sugiere un posible efecto terapéutico que permanece aún sujeto a estudio en futuras investigaciones.

## Contribución de los autores

JAB: metodología, curación de datos y análisis formal; AMGC: supervisión, validación y visualización; ambos autores contribuyeron de forma equitativa al planteamiento de la investigación, al desarrollo de la conceptualización y a la redacción del proyecto.

## Declaración de fuentes de financiación

Este artículo no cuenta con financiamiento.

## Conflictos de interés

Los autores no declaran conflicto de interés alguno.

## Referencias

- [1] Liu Y, Wang K, Maisonet M, Wang L, Zheng S. Associations of lifestyle factors (smoking, alcohol consumption, diet and physical activity) with type 2 diabetes among American adults from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005–2014. *J Diabetes*. 2017;9(9):846–54. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12492>
- [2] Gao D, Ning N, Wang C, Wang Y, Li Q, Meng Z, *et al.* Dairy products consumption and risk of type 2 diabetes: Systematic review and dose–response meta–analysis. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e73965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073965>
- [3] Fan M, Li Y, Wang C, Mao Z, Zhou W, Zhang L, *et al.* Dietary protein consumption

<http://revistaendocrino.org/index.php/rcedm>

- and the risk of type 2 diabetes: A dose-response meta-analysis of prospective studies. *Nutrients*. 2019;11(11):2783. <https://doi.org/10.3390/nu11112783>
- [4] Hidayat K, Du X, Shi B. Milk in the prevention and management of type 2 diabetes: The potential role of milk proteins. *Diabetes Metab Res Rev*. 2019;35(8). <https://doi.org/10.1002/dmrr.3187>
- [5] Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: Current opportunities. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- [6] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017;7(1):42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- [7] Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, *et al.* ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W5-14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- [8] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W357-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>
- [9] Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, FitzGerald RJ. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. *Food Chem*. 2013 nov.;141(1):644-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.115>
- [10] Lan VT, Ito K, Ohno M, Motoyama T, Ito S, Kawarasaki Y. Analyzing a dipeptide library to identify human dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Food Chem*. 2015;175:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.131>
- [11] Nongonierma AB, Mooney C, Shields DC, FitzGerald RJ. In silico approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Peptides*. 2014;57:43-51. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.018>
- [12] Sachdeva V, Roy A, Bharadvaja N. Current prospects of nutraceuticals: A review. *CPB*. 2020;21(10):884-96. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200130113441>
- [13] Premi M, Bansal V. Nutraceuticals for management of metabolic disorders. En: Hussain A, Behl S, editores. *Treating endocrine and metabolic disorders with herbal medicines*. Pensilvania, Estados Unidos: IGI Global; 2021. p. 298-320. <https://doi.org/10.4018/978-1-7998-4808-0.ch013>
- [14] Acquah C, Dzuovor CK, Tosh S, Agyei D. Anti-diabetic effects of bioactive peptides: recent advances and clinical implications. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;1-14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851168>
- [15] Andrade EL, Bento AF, Cavalli J, Oliveira SK, Freitas CS, Marcon R, *et al.* Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Braz J Med Biol Res*. 2016;49(11):e5644. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165644>
- [16] Acquah C, Chan YW, Pan S, Agyei D, Udenigwe CC. Structure-informed separation of bioactive peptides. *J Food Biochem*. 2019;43(1):e12765. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12765>
- [17] Agyei D, Pan S, Acquah C, Danquah MK. Bioactivity profiling of peptides from food proteins. En: Grumezescu AM, Holban AM, editores. *Handbook of Food Bioengineering, soft chemistry and food fermentation*. Estados Unidos: Academic Press; 2017. p. 49-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00003-5>
- [18] Sun X, Udenigwe CC. Chemistry and biofunctional significance of bioactive

- peptide interactions with food and gut components. *J Agric Food Chem.* 2020;68(46):12972–7. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07559>
- [19] Patil P, Mandal S, Tomar SK, Anand S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *Eur J Nutr.* 2015;54(6):863–80. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0974-2>
- [20] Barrero JA, Cruz CM, Casallas J, Vásquez JS. Evaluación in silico de péptidos bioactivos derivados de la digestión de proteínas presentes en la leche de bovino (*B.taurus*), oveja (*O.aries*), cabra (*C.hircus*) y búfalo (*B.bubalis*). *Tecnológicas.* 2020;50(24). <https://doi.org/10.22430/22565337.1731>
- [21] Keller F, Hartmann B, Czock D. Time of effect duration and administration interval for sitagliptin in patients with kidney failure. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;39(2):77–85. <https://doi.org/10.1007/s13318-013-0164-7>
- [22] Richter B. Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. *VHRM.* 2008;4:753–68. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S1707>
- [23] Herman G, Stevens C, Vandyck K, Bergman A, Yi B, De Smet M, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: Results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(6):675–88. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2005.09.002>
- [24] Iwaniak A, Minkiewicz P, Darewicz M, Hryniewicz M. Food protein-originating peptides as tastants – Physiological, technological, sensory, and bioinformatic approaches. *Food Res Int.* 2016;89:27–38. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.010>
- [25] Wan TT, Li X, Sun YM, Li YB, Su Y. Role of the calpain on the development of diabetes *mellitus* and its chronic complications. *Biomed Pharmacother.* 2015;74:187–90. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.008>
- [26] Covington MD, Schnellmann RG. Chronic high glucose downregulates mitochondrial calpain 10 and contributes to renal cell death and diabetes-induced renal injury. *Kidney Int* 2012;81(4):391–400. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.356>
- [27] Dókus LE, Yousef M, Bánóczy Z. Modulators of calpain activity: inhibitors and activators as potential drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2020;15(4):471–86. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1722638>
- [28] Wang TY, Hsieh CH, Hung CC, Jao CL, Lin PY, Hsieh YL, *et al.* A study to evaluate the potential of an in silico approach for predicting dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity in vitro of protein hydrolysates. *Food Chem.* 2017;234:431–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.035>
- [29] Hsieh CH, Wang TY, Hung CC, Jao CL, Hsieh YL, Wu SX, *et al.* In silico, in vitro and in vivo analyses of dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity and the antidiabetic effect of sodium caseinate hydrolysate. *Food Funct.* 2016;7(2):1122–8. <https://doi.org/10.1039/C5FO01324K>
- [30] Nongonierma AB, Lalmahomed M, Paoletta S, FitzGerald RJ. Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chem.* 2017;231:202–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.123>
- [31] Uchida M, Ohshiba Y, Mogami O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from  $\beta$ -lactoglobulin. *J Pharmacol Sci.* 2011;117(1):63–6. <https://doi.org/10.1254/jphs.11089SC>
- [32] Uenishi H, Kabuki T, Seto Y, Serizawa A, Nakajima H. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *Int Dairy J.* 2012;22(1):24–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>