



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Caracterización de los oligopéptidos derivados de la hidrólisis enzimática de las globulinas
de amaranto
(*Amaranthus hypochondriacus*)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q.A. MIGUEL ÁNGEL OLMEDO SUÁREZ

TUTOR: DR. MANUEL SORIANO GARCÍA, INSTITUTO DE QUÍMICA
MÉXICO, D. F. MAYO, 2015

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal: Dr. Carlos Kubli Garfias
Vocal: Dra. Amelia Farrés González-Saravia
Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero
Secretario: Dr. José Federico del Río Portilla

Lugares donde se realizó la tesis:
Laboratorio 2 de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, UNAM
Asimismo en el Laboratorio de Enzimología, Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, IPN

TUTOR DE TESIS: Dr. MANUEL SORIANO GARCÍA

ALUMNO: Q.A. OLMEDO SUÁREZ MIGUEL ANGEL

El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

- XXVII Congreso de Investigación Modular de la Licenciatura en Medicina y Primer Congreso de Investigación en Salud
Lugar: Distrito Federal (UAM Xochimilco)
Título: Evaluación citotóxica *in vitro* de oligopéptidos derivados de la hidrólisis enzimática de las globulinas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).
Modalidad: Presentación Oral
Diciembre 2014

- Simposio Interno del Instituto de Química de la UNAM 2014
Lugar: Distrito Federal (Instituto de Química)
Título: Caracterización de los oligopéptidos derivados de la hidrólisis enzimática de las globulinas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*).
Modalidad: Cartel
Enero 2014

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, nuestra máxima casa de estudios así como al Instituto de Química por darme la oportunidad de brindarme el conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de manutención otorgada con el número 289105.

Al Dr. Manuel Soriano García por haberme dado la oportunidad de formar parte en su equipo de trabajo, por su confianza, paciencia y apoyo en la realización de este trabajo así como por su motivación para seguir adelante.

Quiero expresar mi más grande agradecimiento a la Dra. Alba Laura Vargas Ramírez que sin su ayuda hubiera sido imposible culminar este trabajo, fui muy afortunado al conocer a una excelente amiga y una extraordinaria científica.

Las palabras no me son suficientes para agradecer a mis padres, Miguel Olmedo Castañón y Martha Suárez Estrada por todo el apoyo que me dieron.

A todos mis compañeros de trabajo del laboratorio 2 de Química de Biomacromoléculas por sus consejos y su valiosa amistad.

Al Programa de Maestría en Ciencias Químicas de la UNAM así como a mis profesores y compañeros Jesús Lira, Lucero Martínez, Carmen Martínez y Jessica Valdés por amistad y conocimientos compartidos.

Al Laboratorio de Enzimología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas así como a la Dra. Lorena Rodríguez Páez. A las amistades que hice en el IPN; a Sara Sosa, Rocío Neri, Araceli Posadas y Montserrat Hernández Guadarrama.

“Sólo quiero ser capaz de jugar y hacer que la gente se sienta bien con lo que hago. Cuando usted está pensando de esa manera, cualquier cosa puede suceder. Y, por lo general, lo que pasa es bueno”.

MARK KNOPFLER

ÍNDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	I
INDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	
2.1 Amaranto	2
2.1.1 Reseña histórica: Origen del amaranto	2
2.1.2 Descripción botánica y condiciones de desarrollo de la planta de amaranto	4
2.1.2.1. Tamaño y estructura de las semillas	5
2.1.3 Distribución y producción	6
2.1.4 Composición de las semillas de amaranto	7
2.1.4.1 Proteínas de reserva del amaranto	9
2.1.4.2 péptidos y aminoácidos de amaranto	10
2.1.4.3 Compuestos nutraceuticos presentes en las semillas de amaranto	12
2.1.5 Usos y aplicaciones de la planta y semillas del amaranto	12
2.2 Cáncer	13
2.2.1 Estadísticas del cáncer en México	14
2.3 Péptidos bioactivos	15
2.3.1 Métodos de producción de péptidos bioactivos	16
2.3.2 Péptidos anticancerígenos	18
2.3.2.1 Aspectos comerciales de péptidos anticancerígenos	22
2.3.2.2 Lunasina	24
2.4 Papaína	26
2.4.1 Propiedades, estructura y características de la papaína	27

2.4.2 Mecanismo del funcionamiento de la papaína	28
2.4.3 Usos de la papaína	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo General	30
3.2 Objetivos Particulares	30
4 HIPOTESIS	31
5 JUSTIFICACIÓN	32
6 METODOLOGÍA	33
6.1 Proceso de obtención de la bebida de amaranto	34
6.2 Obtención del hidrolizado	36
6.3 Análisis electroforético	36
6.4 Fraccionamiento del hidrolizado	37
6.5 Cultivo celular	37
6.5.1 Montado de placas y exposición del hidrolizado	38
6.5.2 Método de rojo neutro	39
6.6 Análisis estadístico	39
7 RESULTADOS	40
7.1 Predicción de hidrolisis de la globulina 11s del amaranto con la papaína	40
7.2 Análisis electroforético	41
7.3 Ensayos de citotoxicidad	42
7.3.1 Efecto del tamaño del péptido en la viabilidad celular	43
7.3.2 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular	45
7.3.2.1 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea Ca Ski	46

7.3.2.2 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea Hep G2	49
7.3.2.3 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea MCF7	51
7.3.2.4 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea VERO	54
8 CONCLUSIONES	58
9 PERSPECTIVAS	59
10 BIBLIOGRAFÍA	60
11 ANEXOS	73

A. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación botánica del amaranto	6
Tabla 2. Comparación de la composición proximal de los granos de amaranto y algunos cereales	8
Tabla 3. Composición aproximada de varias especies de granos de amaranto	8
Tabla 4. Composición de aminoácidos de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	11
Tabla 5. Péptidos biológicamente activos y su efecto en el organismo	16
Tabla 6. Ejemplos de péptidos con actividad anticancerígena derivados de fuentes vegetales	20
Tabla 7. Diseño experimental para los ensayos de citotoxicidad	38
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular en función de la concentración de fracción A	44
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular en función de la concentración de fracción B	45
Tabla 10. Estándares para la curva de calibración de albúmina para el método BCA	73
Tabla 11. Composición de la bebida de amaranto por cada 100 gramos	75

B. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>)	4
Figura 2. Semillas de Amaranto	5
Figura 3. Los hábitats nativos del grano de amaranto	7
Figura 4. Estructuras químicas de péptidos comerciales con potencial anticarcinogénico	23
Figura 5. Secuencia de residuos de aminoácidos de la Lunasina	25
Figura 6. Actividad de los diferentes fragmentos de la Lunasina	26
Figura 7. Sitio preferencial de corte de la papaína	27
Figura 8. Representación de listón de la estructura de la papaína	28
Figura 9. Metodología general de investigación	33
Figura 10. Predicción de hidrólisis con papaína en la secuencia de la globulina 11s de <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	40
Figura 11. Perfil electroforético del extracto de globulinas y del hidrolizado	42
Figura 12. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Ca Ski en la fracción A	47
Figura 13. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Ca Ski en la fracción B	48
Figura 14. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Hep G2 en la fracción A	49
Figura 15. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Hep G2 en la fracción B	50
Figura 16. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular MCF7 en la fracción A	52
Figura 17. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular MCF7 en la fracción B	53
Figura 18. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular VERO en la fracción A	55
Figura 19. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular VERO en la fracción B	56

RESUMEN

En los últimos años el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales (aquellos que favorecen a la salud) y nutracéuticos (presentación farmacéutica) ha experimentado un gran incremento, tanto por su valor terapéutico, como por su gran interés para la industria alimentaria (Santini *et al.*, 2013).

Los péptidos bioactivos son fragmentos de proteínas específicas que influyen en las funciones del cuerpo y por tanto mejoran la salud debido a sus efectos antihipertensivos, antioxidantes, antiobesidad, antidiabético, hipocolesterolémico y anticancerígeno.

Uno de los principales problemas de salud a nivel mundial es el cáncer. El cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa de enorme variabilidad etiológica. Éste se origina por el crecimiento de células anormales en diversos tejidos del organismo. Existen muchas razones que sustentan la importancia de la nutrición en la etiología del cáncer y las propiedades biológicas de algunos nutrientes. En México, la tercera causa de muerte para ambos sexos son los tumores malignos, después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus.

Se ha reportado que diferentes proteínas de reserva de fuentes vegetales, han sido utilizadas como materia prima para la obtención de péptidos anticancerígenos y se han obtenido buenos resultados (Silva *et al.*, 2008; Kannan *et al.*, 2010; Robles-Ramirez *et al.*, 2012; Quiroga *et al.*, 2015)

En el amaranto se han descrito péptidos producidos por hidrólisis enzimática *in vitro* con actividades antioxidante, antimicrobiana, antifúngica y antihipertensiva.

Este estudio aporta información acerca del uso de los péptidos producidos por la hidrólisis enzimática de las globulinas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) con posible actividad citotóxica en varias líneas celulares de cáncer.

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares Ca Ski (cáncer cervicouterino), Hep G2 (hepatocarcinoma), MCF7 (cáncer de seno) y VERO (células sanas, de epitelio de riñón de mono verde). Se determinó la influencia de la concentración de los péptidos, del peso molecular y el tiempo de exposición en la viabilidad celular. El resultado más importante fue que a 1000 ppm y 72 horas de exposición de la fracción del hidrolizado menor a 1 KDa disminuyó la viabilidad de

las células Ca Ski en un 81 % y no disminuyó el crecimiento del control de células sanas (VERO)

ABSTRACT

In recent years, interest in the study and development of functional foods and nutraceuticals has experienced a large increase, both because their apparent therapeutic value and the great interest expressed by the food industry (Santini *et al.*, 2013).

Bioactive peptides are fragments of proteins that influence specific body functions and thus improve health in patients with antihypertensive, antioxidant, anti-obesity, antidiabetic, hypocholesterolemic and anti-cancer effects.

One of the main death problems worldwide is cancer. Cancer is a chronic degenerative disease of major etiological variability. This is caused by the growth of abnormal cells in various body tissues. There are many reasons that support the important role of nutrition in cancer etiology and biological properties of some nutrients. In Mexico, the third leading cause of death for both sexes is malignant tumors, after heart disease and diabetes mellitus.

Different storage proteins from plant sources are found in seeds, they have been used as feedstock for the production of anticancer peptides with excellent results.

From amaranth seeds several peptides have been produced by enzymatic hydrolysis with antioxidant, antimicrobial, antifungal and antihypertensive activities.

This study provides scientific information about using peptides produced by enzymatic hydrolysis of globulins amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) with possible cytotoxic activity in several cancer cell lines.

For cytotoxicity assays Ca Ski cell lines (cervical cancer), Hep G2 (hepatocellular carcinoma), MCF7 (breast cancer) and VERO (healthy cells, epithelium green monkey kidney) were used. The influence of the concentration of the peptides, molecular weight and the exposure time in the cell viability was determined.

We found that 1000 ppm of the fraction below of 1KDa of the hydrolysate and 72 h of exposure killed 81% of Ca Ski cells and these conditions doesn't affect normal cells (VERO).

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el interés por el estudio y el desarrollo de alimentos funcionales y nutracéuticos ha experimentado un gran incremento, tanto por su valor terapéutico como por su gran interés para la industria alimentaria, dada la gran repercusión económica que supone la comercialización de este tipo de alimentos y de los productos que los contengan (Santini *et al.*, 2013). Los alimentos funcionales se definen como los alimentos y componentes alimentarios que, tomados como parte de la dieta, proporcionan beneficios más allá de sus valores nutricionales tradicionales, bien sea mejorando una función del organismo o reduciendo el riesgo de enfermedad. En tanto que los nutracéuticos serían los componentes de los alimentos que aportan un beneficio añadido para la salud de carácter médico, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Las proteínas funcionales y los péptidos bioactivos, además de su valor nutricional por ser fuente de aminoácidos, tienen capacidad de ejercer efectos biológicos específicos (De Gobba *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). La mayoría de los péptidos bioactivos son generados espontáneamente durante la digestión *in vivo* a partir de proteínas de diversos orígenes que los contienen. De hecho, la existencia de péptidos bioactivos encriptados como parte de la secuencia de aminoácidos en proteínas alimentarias se conoce desde hace más de 25 años. No obstante, también se han obtenido nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática *in vitro*, empleando enzimas proteolíticas de origen vegetal y/o microbiano (Dei Piu *et al.*, 2014; Esteve *et al.*, 2014).

2. ANTECEDENTES

2.1 Amaranto

El amaranto es una planta dicotiledónea de la familia de las amarantáceas, dotado con varias ventajas con respecto a las características de su cultivo ya que crece rápido y es resistente a la sequía. Además presenta propiedades nutricionales importantes ya que las proteínas de almacenamiento de semillas poseen un excelente balance de aminoácidos esenciales (Gorinstein *et al.*, 2002).

El amaranto es denominado pseudocereal porque sus semillas son como las de los cereales, ricos en materiales harinosos y aptos para la panificación, pero pertenecen a las dicotiledóneas, que son plantas con hojas embrionarias o cotiledones en sus semillas; son distintas a las gramíneas monocotiledoneas (llamadas cereales verdaderos) como el arroz, el sorgo, el maíz y el trigo. Como estas dicotiledóneas no contienen gluten, son fácilmente digeribles, lo que ha provocado un auge en el consumo de estos alimentos en los últimos años, sobre todo en países europeos donde es mayor la incidencia de la enfermedad celíaca (intolerancia al gluten) (De la Cruz Torres *et al.*, 2008).

2.1.1 Reseña histórica: Origen del amaranto

El amaranto fue cultivado en América desde hace 5000 a 7000 años por las civilizaciones Inca, Maya y Azteca, donde fue utilizado como un alimento básico y junto con el maíz y el frijol, fue un cultivo fundamental para las civilizaciones Mesoamericanas y Sudamericanas. Además de su importancia como fuente de alimento, el grano era muy apreciado por estas civilizaciones, quienes lo consideraban más valioso que el oro (Silva, 2007; Rivillas, 2008; Asociación Mexicana del Amaranto, 2012)

Los mayas lo nombraban “xtes”, apreciaban principalmente su valor alimenticio y probablemente fueron los primeros en utilizarlo como un cultivo de alto

rendimiento. Los aztecas lo conocían como “huautli” y lo ligaban con sus ritos religiosos. Por su parte los Incas lo denominaron “kiwicha” (pequeño gigante) y lo respetaban principalmente por sus poderes curativos. A la llegada de los españoles se le denominó amaranto, que proviene del latín y significa “flor que nunca muere” o “vida eterna” (Silva, 2007; Rivillas, 2008; Asociación Mexicana del amaranto; 2012).

El amaranto fue un cultivo ampliamente distribuido en la cultura Azteca jugando un papel importante en su economía. Este grano se otorgaba como tributo al rey azteca y cada año se percibían por este concepto alrededor de 20000 toneladas, provenientes de 17 provincias dominadas por Tenochtitlan (Silva, 2007). En la alimentación lo empleaban en preparación de alimentos como atole, tamales, pinole y tortillas; y las hojas eran consumidas como verduras. Con la semilla de amaranto se preparaba una harina que era mezclada con miel o melazas para preparar una masa llamada “tzoalli”, con la cual se elaboraban figurillas e ídolos (en algunas referencias se dice que también se mezclaba sangre de niños y adultos sacrificados). Estas figurillas eran empleadas para tradiciones religiosas donde los grandes sacerdotes lo utilizaban como fuente de fuerza e iluminación mística. A la llegada de los españoles y debido a las costumbres religiosas, los sacerdotes de aquella época ordenaron la exterminación del cultivo debido a que consideraban que era una forma de perversión de la “comuni3n cristiana” (Becerra, 2000; Silva, 2007).

De esta manera casi se logra el exterminio del cultivo. Solo pocas personas conservaron la tradici3n del cultivo de amaranto en peque1as parcelas y para consumo familiar (Silva, 2007). Recientemente, un mayor inter3s en amaranto apareci3 en la d3cada de 1980, esto debido la investigaci3n que realiz3 la Academia Nacional de Ciencias en Estados Unidos sobre el grano describiendo su alto valor nutritivo y potencial agron3mico (Monteros *et al.*, 1998; Ulbricht *et al.*, 2009).

2.1.2 Descripción botánica y condiciones de desarrollo de la planta de amaranto

El amaranto (Figura 1) es una planta C4 y una de las pocas dicotiledóneas en las cuales el primer producto de fotosíntesis es un producto de cuatro carbonos. La combinación de características anatómicas y el metabolismo C4, da como resultado un incremento de la eficiencia del uso del CO₂ bajo una amplia variación de temperaturas y humedad que le permiten una mejor adaptación, considerándose un cultivo alternativo en lugares donde cereales y otros cultivos de interés comercial no pueden crecer. (Silva, 2007). Este cultivo se puede aprovechar de manera más eficiente puesto que ofrece tanto granos y hojas comestibles con alta calidad nutricional.

Figura 1. Planta de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)*



*Tomada de Annie´s annuals and perennials, 2015

El significado de la palabra amaranto es vida eterna y es debido a que crece en tierra poco fértil y con una mínima cantidad de agua. Se le considera como un cultivo alternativo para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias y donde incluso se presentan problemas de abasto de alimentos, también porque una sola planta puede producir varios cientos de miles de semillas que pueden conservar sus propiedades por más de 40 años. A pesar de que las semillas sólo tienen cerca de 1 mm de diámetro, se obtienen en cantidades exageradas, aun por técnicas de recolección primitivas (Sauer, 1967; Rivillas, 2007).

2.1.2.1 Tamaño y estructura de las semillas

El tamaño de la semilla varía de 1.1 a 1.4 mm de largo por 1.0 a 1.3 mm de ancho, tamaño que es muy pequeño comparado con el del frijol o trigo (Figura 2) (Silva, 2007). Según Saunders (1984) y Arent *et al.* (2013), 1000 semillas pesan 0,5-1,2 g; alternativamente, 1 g puede contener 850 a 1700 semillas. Se producen en grandes cantidades, a veces más de 50 000 semillas por planta, y el color puede variar crema, oro, rosa, negro, marrón, amarillo o blanco.

Figura 2.- Semillas de Amaranto



*Tomada de Achtli, 2015

2.1.3 Distribución y producción

La familia *Amaranthaceae* reúne cerca de 60 géneros y más de 800 especies cuyas características cambian notablemente, dependiendo del ambiente en el que crecen, lo que dificulta la identificación de la planta. En la Tabla 1 se muestra la clasificación botánica del amaranto.

Tabla 1 .- Clasificación botánica del amaranto*

Clasificación	Amaranto
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Caryophyllidae</i>
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Amaranthaceae</i>
Genero	<i>Amaranthus</i>
Especie	Al menos 60 species, e.g.
	<i>A.caudatus</i>
	<i>A.cruentus</i>
	<i>A. hypochondriacus</i>

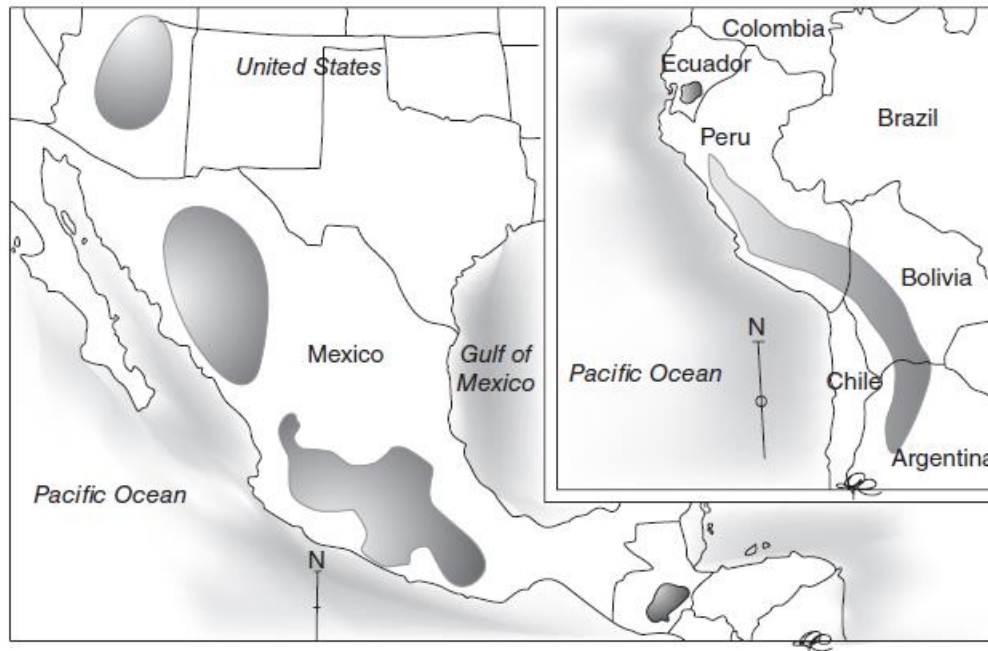
* Tomada de Arent *et al.*, 2013

Existen tres especies de amaranto que son cultivadas para la producción de semillas comestibles y son las más apreciadas:

- a) *Amaranthus caudatus*: se origina en la región de los Andes y se comercializa como planta de ornato principalmente en Europa y Norteamérica.
- b) *Amaranthus cruentus*: es originaria de México y Centroamérica, donde se cultiva principalmente para obtener grano. También se consume como vegetal.
- c) *Amaranthus hypochondriacus* : procedente de la parte central de México, se cultiva para obtener grano. Es la especie a la que se refiere este trabajo.

En la Figura 3 se muestran las áreas donde se cultiva el amaranto. En México se cultiva en los estados de Puebla, Veracruz, Morelos, Tlaxcala, Distrito Federal y el Estado de México (Rivillas, 2008).

Figura 3. Los hábitats nativos del grano de amaranto. Las áreas más oscuras indican zonas donde se concentra el cultivo de amaranto.*



*Tomado de Arent, *et al*, 2013.

2.1.4 Composición de las semillas de amaranto

En general, el amaranto de grano se caracteriza por tener relativamente mayores niveles de proteínas y lípidos y niveles inferiores en almidón a los principales cereales (maíz, arroz y trigo). Una comparación de la composición química media de amaranto (*A. hypochondriacus*) y el maíz, el arroz y el trigo se muestra en la Tabla 2. El análisis de la composición química media de los granos de varias especies de amaranto indica que hay algunas variaciones entre y dentro de especies (Tabla 3).

Tabla 2. Comparación de la composición proximal de los granos de amaranto y algunos cereales (% basado en peso seco)

Composición	Amaranto^a	Trigo	Maíz	Arroz
Carbohidratos	59.2	66.9	67.7	75.4
Proteína cruda	16.6 ^b	14.0 ^c	10.3 ^d	8.5
Grasa	7.5	2.1	4.5	2.1
Fibra Cruda	4.1	2.6	2.3	0.9
Cenizas	3.3	1.9	1.4	1.4
Humedad	9.6	12.5	13.8	11.7

^a Valores promedio de harinas de diferentes especies de amaranto (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*).

^b N x 5.85. ^c N x 5.7. ^d N x 6.25 (son los factores de conversión de nitrógeno a proteínas)

Fuente: Cai, *et al*, 2004

Tabla 3. Composición aproximada de varias especies de granos de amaranto

Componente	<i>A.caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A.hybridus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
Carbohidratos	59.6 - 62.8	60.7 - 62.6	58.6	57.0
Proteína cruda	17.6 - 18.4	13.2 - 18.2	14.0	17.9
Grasas	6.9 - 8.1	6.3 - 8.1	6.7	7.7
Fibra cruda	3.2 - 5.8	3.6 - 4.4	6.6	2.2
Cenizas	3.1 - 4.4	2.8 - 3.9	3.6	4.1
Humedad	0.5 - 11.6	6.2 - 8.8	10.5	11.1

^a N x 5.85

Fuente: Cai *et al.*, 2004

2.1.4.1 Proteínas de reserva del amaranto

Durante el desarrollo de la planta, las semillas sintetizan relativamente grandes cantidades de reservas de alimento, las cuales son atrapadas en tejidos específicos como son los cotiledones y el endospermo. Estas reservas son movilizadas en el momento de la germinación y sus catabolitos son utilizados para mantener el crecimiento de la semilla, hasta que ésta pueda establecerse por sí sola como planta fotosintética autotrófica. La mayoría de las reservas son depositadas en estructuras discretas llamadas organelos de almacenamiento; proteínas en cuerpos proteínicos, lípidos en cuerpos lipídicos, almidón en gránulos de almidón (amiloplastos). Las proteínas almacenadas en estos cuerpos proteínicos son denominadas proteínas de reserva (Bewley, 1990; Silva, 2007)

Como se indicó en la tabla, el amaranto contiene 16-18% de proteína, en comparación con valores de 14% o menos en el trigo y otros cereales. La composición de la proteína del amaranto está cerca de la proteína ideal propuesta para cubrir los requisitos de los adultos por la FAO. La proteína tiene puntuaciones más altas que otras semillas (por ejemplo, trigo, cebada, soya y maíz).

Existen varios tipos de clasificaciones para las proteínas de reserva de semillas. En general la más usada es la propuesta por Osborne en 1924 (Silva, 2007), de acuerdo a la cual las proteínas de reserva se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo con su solubilidad. Los cuatro grupos son: a) albúminas que son solubles en agua, en amortiguadores diluidos a pH's neutros; b) globulinas solubles en disoluciones salinas, pero insolubles en agua; c) prolaminas que solubilizan en disoluciones alcohólicas entre (70-90 %); d) glutelinas son proteínas solubles en álcalis o ácidos diluidos. Las proteínas más abundantes en los cereales son las prolaminas y glutelinas, mientras que en leguminosas son las globulinas (Bewley *et al.*, 1990; Silva, 2007)

Se ha estudiado el perfil de proteínas y la composición de aminoácidos de 11 especies de poblaciones silvestres de amaranto (*A. viridis*, *A. powellii*, *A. muricatus*, *A. deflexus*, *A. blitoides*, *A. graecizans*, *A. retroflexus*, *A. albus*, *A. blitum*, *A. cruentus*, y *A. hypochondriacus*) mediante cromatografía de filtración en gel y electroforesis, y se encontró que los perfiles eran similares en todas las especies, con pequeñas variaciones en los pesos moleculares y cantidades de las proteínas, principales en la semilla (Juan *et al.*, 2007). En este estudio se observaron seis fracciones mayoritarias de alrededor de 300, 180 y 120 kDa, entre 40 a 50, 20, 30 kDa, y por debajo de 10 kDa, mientras que el análisis electroforético mostró proteínas que fueron agrupadas en 3 fracciones principales: entre 50 y 64 kDa, 33 y 37 kDa y 18 y 25 kDa (Juan *et al.*, 2007; Venskutonis *et al.*, 2013).

2.1.4.2 Péptidos y aminoácidos del amaranto

Las proteínas de amaranto contienen altas cantidades de aminoácidos esenciales; sin embargo, su contenido depende de las especies de plantas y cultivo (Juan *et al.*, 2007). Se ha demostrado que el perfil de composición de aminoácidos del amaranto es más parecido al de las leguminosas que a los granos de cereales, a excepción de los aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína), que está presente en mayor cantidad en el amaranto que en legumbres (Venskutonis *et al.*, 2013). El contenido relativamente alto de aminoácidos esenciales en el grano de amaranto es favorable para su uso como sustituto de la carne en la alimentación (Tabla 4) (Pisarikova *et al.*, 2005).

Tabla 4.-Composición de aminoácidos de *Amaranthus hypochondriacus**

Aminoácido	g/100g de proteína	Requerimientos de aminoácidos esenciales (mg/g proteína) propuestos por la FAO
Ácido Glutámico + Glutamina	18.1	
Ácido Aspartico + Asparagina	12.9	
Glicina	11.4	
Serina	10.7	
Arginina ^a	8.5	
Leucina ^a	6.4	6.6
Lisina ^a	5.0	5.8
Alanina	4.3	
Treonina ^a	4.2	3.4
Valina	3.6	3.5
Fenilalanina ^a	3.5	
Isoleucina ^a	2.8	2.8
Triptófano ^a	2.7	1.1
Tirosina	2.3	6.3
Histidina ^a	1.8	1.9
Cisteína	1.3	
Metionina ^a	0.4	

Elaborado a partir de Juan *et al.*, 2007

El extracto total soluble en agua de semillas de amaranto, mostró contener cuatro nuevos péptidos antifúngicos, cuya concentración mínima inhibitoria es de 5 mg péptidos/ml inhibe un gran número de hongos especies aislados de panaderías. Se confirmó la actividad inhibidora durante el almacenamiento a largo plazo de harina libre de gluten y panes de trigo en condiciones de planta piloto (Rizzello *et al.*, 2009).

Los péptidos presentes en las fracciones solubles en buffer de fosfato de aislados proteicos, fracciones de proteínas, hidrolizados con alcalasa y las fracciones de proteínas muestran actividad antioxidante (Tironi *et al.*, 2010). En otro estudio, se demostró que el aislado de proteína y el hidrolizado con alcalasa de *A. mantegazzianus* neutralizó los radicales libres después de la digestión

gastrointestinal, haciéndolos ingredientes prometedores para el desarrollo de alimentos funcionales (Delgado *et al.*, 2011).

2.1.4.3 Compuestos nutracéuticos presentes en las semillas de amaranto

En los últimos años se han evaluado en estudios clínicos las propiedades de amaranto en la reducción del colesterol, como un agente anti-oxidante, anticancerígeno, anti-alérgico, agente antihipertensivo y como un alimento para los pacientes con enfermedad celíaca e inmunodeficiencias (Silva, 2007).

La mayoría de estas propiedades se explican por la presencia de sustancias tales como la Lunasina, un péptido con efectos antitumorales, o sustancias con potencial antihiperlipidémico, antidiabético, y antihelmíntico que se encuentran en los extractos metanólicos, así como de aquellas sustancias con propiedades antidiarreicas, antifúngicas y antipalúdicos presentes en los extractos acuosos de las semillas (Huerta-Ocampo *et al.*, 2011). Flavonoides específicos, como la rutina ,y algunos ácidos fenólicos, como el ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico y el ácido vanílico con efectos antioxidantes también están presentes en semillas de amaranto y sus brotes (Pasko *et al.*, 2008).

2.1.5 Usos y aplicaciones de la planta y semillas del amaranto

La planta de amaranto es un producto que se puede aprovechar integralmente ya que ofrece tanto granos como hojas comestibles. Hasta donde se conoce, cualquier semilla de amaranto es comestible simplemente con tostarlo o molerlo, su sabor es muy parecido al de un cereal (Rivillas, 2008).

El grano se procesa de diversas maneras para el consumo, siendo la forma de grano reventado quizás la más popular. Al ser reventado por calor provee un cereal que puede ser utilizado para la preparación de alimentos conocidos como las “alegrías”, mazapanes, cereal reventado y harinas de amaranto. También se

logran a través del amaranto productos industrializados como cereales enriquecidos para suplementación de dietas, harinas, concentrados, extruidos, almidones, aceites y colorantes derivados del amaranto. Éstos sirven como insumos para otras industrias de alimentos y bebidas, cosmetología, farmacéutica, etc. Se utilizan las proteínas de amaranto como sustitutos de proteína animal en la alimentación de pollos, cerdos de engorda y desarrollo de nuevos productos (Silva, 2007, Asociación Mexicana de Amaranto, 2012). El amaranto puede ser incorporado no sólo en la dieta de individuos normales, sino también a la de los pacientes celíacos y de personas alérgicas a los cereales.

2.2 Cáncer

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud debido a su frecuencia y patología. El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por crecimiento celular no regulado, invasión y diseminación de las células desde su sitio de origen, o sitio primario a otros sitios en el cuerpo (Pecorino, 2005). Además participan diversos factores relacionados con la regulación, apoptosis y el crecimiento celular. Se caracteriza por la multiplicación desordenada de células anormales que no reciben las señales de control de inhibición por contacto de las demás células normales del organismo (Pereira, 2000; Vargas, 2010).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años (OMS, 2015).

Si bien existen una variedad de tratamientos que tienen como fin eliminar los tumores, la mayoría de los tratamientos son sumamente tóxicos para el organismo, atacando no solamente a las células neoplásicas sino también a las células sanas (Alonso – Castro *et al.*, 2011)

La quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos convencionales para el cáncer utilizado hoy en día, son caros y causan muchos efectos secundarios, tales como vómitos, alopecia, diarrea, estreñimiento, así como la mielosupresión, efectos neurológicos, cardíacos, pulmonares y la toxicidad renal. Todos estos efectos secundarios reducen la calidad de vida y desalientan a los pacientes a continuar con la medicación, decisión que luego conduce a la progresión del cáncer y complicaciones asociadas. Además, muchos de estos tratamientos presentan actividad anticancerígena limitada (Mans *et al.*, 2000, Alonso-Castro *et al.*, 2011). La cirugía de resección causa deficiencias funcionales o malestar estético. Por lo tanto, hay una necesidad de descubrir nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer, más selectivos y menos tóxicos que los actualmente se usan (Alonso-Castro *et al.*, 2011).

2.2.1 Estadísticas del cáncer en México

En México, las campañas de información sobre la valoración, protección, intervención y de los tratamientos para cáncer son cada vez más efectivas, pero es innegable que todavía mucha gente fallece por este mal. En 2012, la principal causa de defunciones por tumores malignos en habitantes de 20 años y más fue el de órganos digestivos (33.18 cada 100), seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100), órganos respiratorios e intratorácicos (10.72 por cada 100); y en mama (8.13 por cada 100). Por género el comportamiento es diferente, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la primer causa de muerte, fallecen 15.38 de cada 100 (INEGI, 2012).

2.3 Péptidos bioactivos

Las proteínas son el principal componente de las células y los tejidos, siendo necesarias para el crecimiento corporal, para el mantenimiento y reparación de tejidos, por su acción catalítica y como constituyentes esenciales de ciertas hormonas. Estudios recientes han demostrado que las proteínas y los péptidos derivados de ellas, exhiben una serie de actividades biológicas con efecto directo sobre los procesos biológicos del organismo, más allá de su aporte nutricional (Iwaniak *et al.*, 2007; Segura-Campos *et al.*, 2011). Las proteínas pueden considerarse como una fuente de péptidos nutracéuticos que pueden ejercer las funciones biológicas para promover la salud y prevenir enfermedades, incluyendo el cáncer. Se sabe que los péptidos bioactivos han sido parte de la dieta humana durante varios años. Recientemente, se ha incrementado el número de estudios sobre los péptidos bioactivos a partir de fuentes animal y vegetal (Ortiz-Martinez *et al.*, 2014)

Los péptidos bioactivos se definen como secuencias de aminoácidos inactivas en el interior de la proteína precursora, pero que ejercen propiedades biológicas al liberarse por procesos de hidrólisis enzimática *in vitro* o *in vivo* o por procesos fermentativos aunque también se pueden generar durante la digestión gastrointestinal (Manninen, 2004; Segura-Campos *et al.*, 2011). Estas secuencias de aminoácidos tienen la capacidad de regular diversos procesos fisiológicos como los mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Péptidos bioactivos y su efecto en el organismo.

Péptidos	Efecto en el organismo
Inmunomoduladores	Estimulan la respuesta inmune
Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina-I	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e hipertensión
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito gastrointestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de proliferación	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos

*Tomado (Iwaniak *et al*, 2007; Segura-Campos *et al*, 2011)

2.3.1 Métodos de producción de péptidos bioactivos

Existen tres estrategias o enfoques que pueden ser utilizados para producir péptidos bioactivos:

1.- Aislamiento a partir de digeridos enzimáticos *in vitro* de proteínas. En este enfoque, las enzimas (por lo general de agentes microbianos o de origen vegetal, por ejemplo, alcalasa, papaína, ficina, termolisina, pronasa, y neutrasa) se utilizan individualmente o como una combinación de dos o más enzimas para producir pequeños péptidos. Durante la hidrólisis, enlaces peptídicos se escinden y hay un aumento en la densidad de carga así como disminución de masa molecular, ambas características contribuyen al aumento de la solubilidad de los productos peptídicos. Por lo tanto, los péptidos son más solubles que la proteína nativa y la centrifugación

clarificará la mezcla de reacción; el precipitado contiene material no digerido mientras que el sobrenadante contiene los péptidos solubles. El sobrenadante es separado, liofilizado y/o usado para su posterior procesamiento tal como ultrafiltración. Este método es de los más utilizados en la producción de péptidos bioactivos sobre todo porque es conveniente, barato, y se puede realizar fácilmente en prácticamente cualquier laboratorio, ya que no requiere instrumentación costosa (Aluko, 2012).

2.- Aislamiento real o *in vivo*.

Es posible mediante la digestión de las proteínas por el tracto gastrointestinal, pero rara vez se utiliza para producir péptidos bioactivos, ya que requiere la eliminación de material intestinal procedente de animales vivos que han sido alimentados con una dieta rica en proteínas. Sin embargo, esta digestión puede ser simulada *in vitro*, en primer lugar tratando la proteína con pepsina durante 1-2 h para simular la digestión en el estómago. A continuación, el digerido de pepsina, se ajusta a un valor pH alrededor de la neutralidad (generalmente pH 6.8 a 7.5), y se lleva a cabo la digestión intestinal simulada usando pancreatina (un extracto de páncreas que contiene las enzimas digestivas que se encuentran comúnmente en el intestino) o una combinación de tripsina y quimotripsina (los dos proteasas digestivas más abundantes en el intestino). Este método es útil para estimar los péptidos bioactivos potenciales que pueden ser liberados de una proteína alimentaria cuando se consume como parte de la dieta, aunque no simula la acción potencial proteasas celulares del borde intestinal (Aluko, 2012) ni la acción de las bacterias.

3.- Por síntesis química de péptidos con estructuras idénticas o similares a los conocidos como bioactivos. En la mayoría de los casos, el uso de fraccionamiento y los métodos de purificación no producen cantidades adecuadas o económicamente viables de péptidos. Por lo tanto, las secuencias de los péptidos deben ser sintetizadas químicamente. Este enfoque sólo se puede utilizar si la información en la secuencia de aminoácidos del péptido bioactivo es conocida. La síntesis química de péptidos requiere de instrumentos especializados, que pueden

no estar disponibles en la mayoría de los laboratorios. Por lo tanto, la síntesis del péptido es llevada a cabo normalmente por empresas en una cuota por servicio. Sin embargo, uno de los principales problemas en la síntesis química es la presencia de impurezas y diferencias en la estereoquímica que podrían afectar a la actividad en comparación con el péptido natural aislado (Aluko, 2012).

2.3.2 Péptidos anticancerígenos

El desarrollo de una nueva clase de compuestos anticancerígenos que carecen de toxicidad para las células sanas y no se ven afectadas por los mecanismos comunes de resistencia sería un avance importante en la quimioterapia del cáncer (Ortiz-Martínez *et al.*, 2014).

Varios estudios han demostrado el potencial anticancerígeno de las proteínas de la dieta, péptidos y aminoácidos, tanto si se producen de forma natural o el producto de la fermentación, hidrólisis enzimática o digestión gastrointestinal (De Mejia *et al.*, 2010; Sarmadi *et al.*, 2010; Ortiz-Martinez *et al.*, 2014).

Los péptidos han atraído la atención como alternativas en quimioterapia, como resultado de ciertas ventajas que éstos poseen. En contraste con la mayoría de moléculas pequeñas, los péptidos tienen una alta afinidad, fuerte especificidad y baja toxicidad, y en contraste con los anticuerpos quimioterapéuticos, tienen una mejor penetración en los tejidos debido a su pequeño tamaño. Esto proporciona un impulso al estudio de péptidos bioactivos como posibles agentes terapéuticos, aunque el uso de los péptidos ha sido limitado debido a su alta inestabilidad en ambientes biológicos, la depuración rápida de la sangre, pobre transportabilidad en membrana y posible digestión en el tracto gastrointestinal (Ortiz-Martínez *et al.*, 2014).

Los experimentos *in vivo* y ensayos clínicos son necesarios para demostrar el efecto fisiológico de los péptidos, pero los estudios *in vitro* siguen siendo

herramientas importantes porque la funcionalidad del péptido se basa en los mecanismos biológicos. No pueden, sin embargo, sustituir los estudios *in vivo* y clínicos, ya que es muy difícil establecer una relación directa entre actividad biológica *in vitro* e *in vivo*. La biodisponibilidad del péptido después de la administración oral es una de las principales razones de esta incomparabilidad y es uno de los primeros aspectos a estudiar antes de que puedan ser incorporados en alimentos o fármacos sistemas (Bhutia *et al.*, 2008; Segura-Campos *et al.*, 2011; Ortiz-Martínez *et al.*, 2014).

Existe una base de datos en donde se ha depositado información de los péptidos anticancerígenos que han sido caracterizados hasta el momento llamada CancerPPD (http://crdd.osdd.net/raghava/cancerppd/browse_assay.php). Hasta el momento en la base de datos se encuentran 3491 entradas las cuales son clasificadas en el origen del péptido, tamaño, línea celular estudiada, año de descubrimiento, etcétera.

Los estudios de la actividad anticancerígena de péptidos derivados de proteínas vegetales se presentan en la Tabla 6. Se puede observar que la mayoría los investigadores han analizado la actividad de la Lunasina en el tratamiento del cáncer.

Tabla 6.- Ejemplos de péptidos con actividad anticancerígena derivados de fuentes vegetales*

Ensayo Biológico	Proteína codificante/ Hidrolizado proteico	Fuente	Referencias
<i>In vitro e in vivo</i>	Lunasina	Trigo	Jeong <i>et al.</i> , 2007
<i>In vitro</i>	Lunasina	Cebada	Jeong <i>et al.</i> , 2002
<i>In vitro e in vivo</i>	Lunasina	Centeno	Jeong <i>et al.</i> , 2009
<i>In vitro</i>	Lunasina de la fracción de glutelinas	Amaranto	Silva-Sanchez <i>et al.</i> , 2008; Maldonado-Cervantes <i>et al.</i> , 2010
<i>In vitro e in vivo</i>	Lunasina	Soya	Jeong <i>et al.</i> , 2003,2007; De Mejia <i>et al.</i> , 2003, 2004; Park <i>et al.</i> , 2005; Hernandez- Ledezma <i>et al.</i> , 2009
<i>In vitro</i>	Pentapéptido	Arroz	Kannan <i>et al.</i> , 2010
<i>In vitro e in vivo</i>	Inhibidor de Bowman-Birk	Soya	Park <i>et al.</i> , 2005
<i>In vitro e in vivo</i>	Lectinas	Soya	De Mejia <i>et al.</i> , 2003; Barac <i>et al.</i> , 2005
<i>In vitro</i>	Hidrolizado de semilla de soya germinada por 6 días	Soya	Robles-Ramirez <i>et al.</i> ,2012
<i>In vitro</i>	Aislado de hemaglutinina dimérica	Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Lam y Ng, 2011
<i>In vitro</i>	Fracción de prolaminas	Arroz (O sativa L. japonica)	Chen <i>et al.</i> , 2010
<i>In vitro</i>	Hidrolizado con peso molecular menor a 5 KDa	Maíz	Li <i>et al.</i> , 2013

*Tomado de Belovic *et al.*, 2011 y de Ortiz-Martínez *et al.*, 2014

Kannan *et al.* (2010) aislaron y caracterizaron un novedoso pentapéptido contra el cáncer a partir hidrólisis enzimática del salvado de arroz, cuya secuencia de aminoácidos es Glu-Gln-Arg-Pro-Arg. Este péptido es resistente a los jugos gastrointestinales y posee propiedades inhibitorias del crecimiento del cáncer en de colon, mama, pulmón y hepatocarcinoma.

Barrio y Añón (2010) estudiaron las propiedades antitumorales de la proteína aislada de *Amaranthus mantegazzianus* (MPI) y dilucidaron el posible mecanismo de acción. El estudio se realizó con 4 diferentes células tumorales: MC3T3E1, UMR106, Caco-2, y TC7. MPI mostró un efecto antiproliferativo sobre las 4 líneas celulares con diferentes potenciales. MPI inhibe la adhesión celular e induce la apoptosis y necrosis en la célula maligna UMR 106, y los autores concluyeron que el aislado proteico de las semillas de *A. mantegazzianus* muestran un potencial antitumoral y el efecto antiproliferativo aumentó con la hidrólisis. Asimismo, Quiroga, Barrio y Añón (2015) encontraron que esta actividad es debida a una lectina presente en la fracción hidrofóbica de MPI.

Una de las sustancias bioactivas más ampliamente estudiadas en la soya es el Inhibidor de proteasa de Bowman-Birk (BBI) (Jeong *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005; Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). BBI es un inhibidor de proteasas serínicas que consta de una sola cadena de 71 residuos de aminoácidos. Esta cadena está entrecruzada por siete pares de enlaces disulfuro. Tiene la capacidad de inhibir la acción de la tripsina y la quimotripsina (Park *et al.*, 2005, Barac *et al.*, 2005). Se ha demostrado que BBI interfiere con el desarrollo de tumores inducido por carcinógenos químicos en una variedad de sistemas tanto *in vivo* como *in vitro* (Kennedy, 1998; Park *et al.*, 2005; Robles 2010). Chen *et al.* (2005) demostraron que el BBI inhibe específicamente la actividad proteosomal semejante a quimotripsina. Esta inhibición está asociada con la acumulación de proteínas ubiquitinadas y de los sustratos del proteosoma, p21 y p27, que acompañan la

disminución de las ciclinas D1 y E, lo cual podría detener el ciclo celular en la fase G1/S (Robles, 2010).

Las lectinas son proteínas que unen selectivamente hidratos de carbono (De Mejía *et al.*, 2003). Las lectinas muestran varios efectos bioquímicos, fisiológicos y nutricionales después de su ingestión. Algunos de ellos son de aglutinación de las células rojas de la sangre y la estimulación la secreción de enzimas en páncreas, resultando en la reducción de la absorción intestinal de nutrientes.

Hay varios informes que sugieren que las lectinas de plantas pueden tener actividades antitumoral y anticancerígeno que podrían ser de utilidad en el tratamiento del cáncer. Las lectinas se unen preferentemente a la membrana celular de las células cancerosas, o a sus receptores, causando citotoxicidad, apoptosis e inhibición del crecimiento del tumor; pueden unirse a ribosomas e inhibir síntesis de proteínas, modificar el ciclo celular y activar la cascada de caspasas. También pueden disminuir la actividad de la telomerasa e inhibir la angiogénesis (De Mejía *et al.*, 2005). Yu *et al.* (2001) investigaron los efectos proliferativos de dietas con dos lectinas que se pueden unir al factor tumoral (TF- lectina vinculante): la jacalina (*Artocarpus integrifolia*) y la lectina de amaranto (*A. caudatus*). El aumento de la expresión del antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno TF) es una característica común de malignidad epitelial. Los resultados mostraron que las dietas que contienen las lectinas vinculantes a TF pueden ser marcadores de la proliferación de las células epiteliales gastrointestinales malignas y que puede tener un papel en el diagnóstico de cáncer intestinal (Caselato -Sousa, et al, 2012).

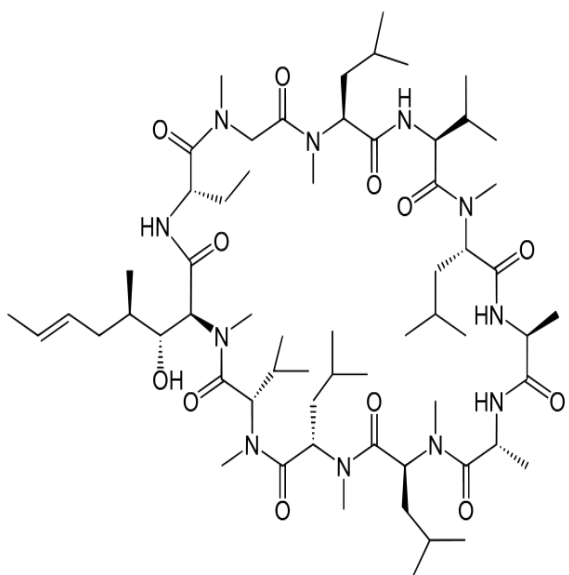
2.3.2.1 Aspectos comerciales de los péptidos anticancerígenos

En 2010, 50 fármacos peptídicos fueron aprobados para su comercialización, en su mayoría análogos hormonales sintéticos y recombinantes, cuyas ventas globales anuales fueron alrededor de 1 billón de dólares asociados con los siguientes fármacos: ciclosporina (e.g., Neoral®, Novartis), acetato de

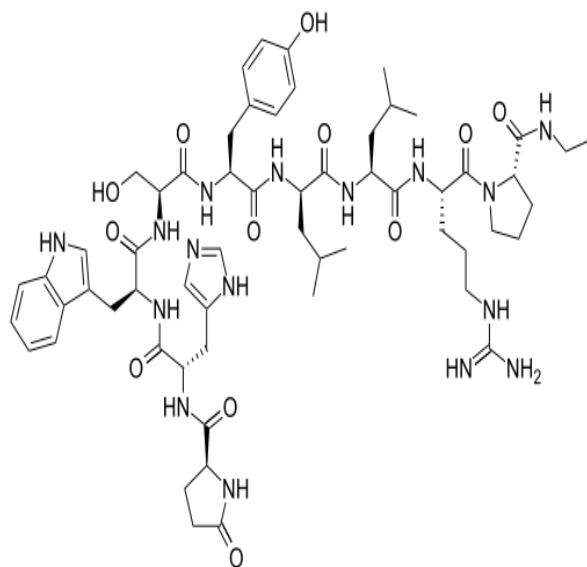
goserelina (Zoladex®, AstraZeneca), acetato de glatiramer (Copaxone®, Teva Pharmaceuticals), acetato de leuprolide (Lupron®, Abbott Laboratories) y acetato de octreotida (Sandostatin®, Novartis) (Ortiz-Martinez *et al.*, 2014). De los anteriormente mencionados el acetato de glatimer consta solamente de 4 residuos de aminoácidos Glu-Ala-Tyr-Lys. Las estructuras químicas se muestran en la figura 4.

Figura 4. Estructuras químicas de péptidos comerciales con potencial anticarcinogénico

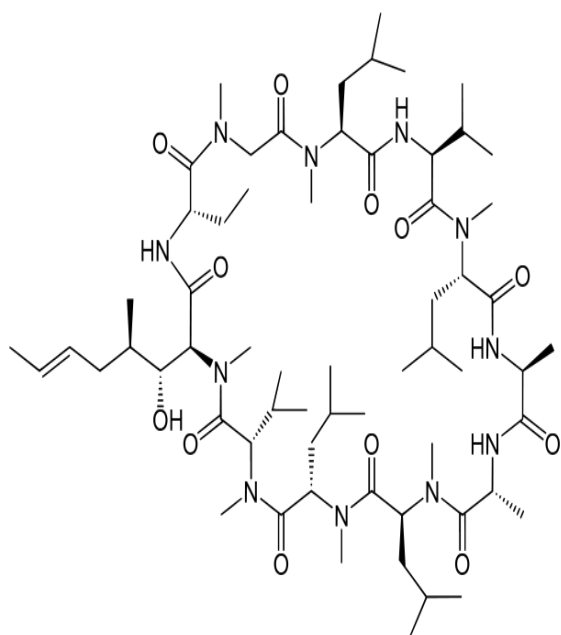
(A) Goserelina



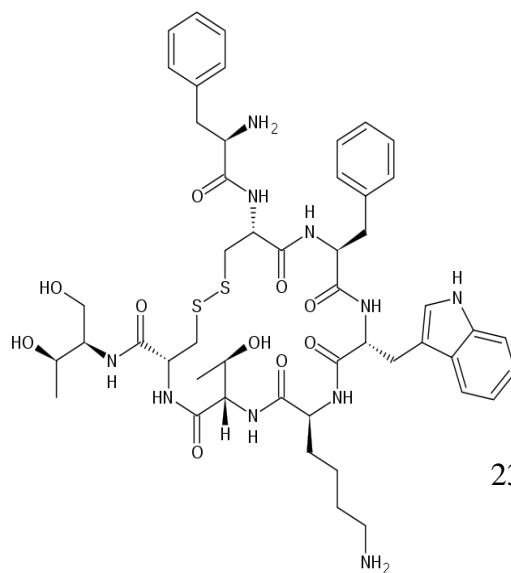
(B) Leuprolida



(C) Ciclosporina



(D) Octreotida



El creciente interés por la industria farmacéutica en el desarrollo de péptidos como fármacos es consecuencia de la aceptación generalizada de ahora proteínas terapéuticas por los médicos y pacientes y el desarrollo de soluciones a problemas tales como una vida media corta y la llegada a su sitio de acción (Ortiz-Martínez *et al.*, 2014).

2.3.2.2 Lunasina

Estudios recientes han identificado y caracterizado péptidos derivados de fuentes animales y vegetales como agentes quimiopreventivos prometedores (Picot *et al.*, 2006; Jang, 2008; Kannan *et al.*, 2010). Uno de estos péptidos, llamado Lunasina, fue identificado en la soya y otras plantas y legumbres así como en el amaranto (Silva-Sanchez, *et al.*, 2008). Los estudios realizados en los últimos cinco años han puesto de manifiesto las propiedades de éste péptido en cultivos celulares y en modelos animales, lo que es una estrategia potencial para la prevención y/o terapia del cáncer. La eficacia de la Lunasina contra el cáncer de mama, colon, leucemia y de próstata usando experimentos de cultivo celular y modelos animales se ha demostrado en la última década.

Varios estudios *in vitro* y *in vivo* han demostrado la acción de la Lunasina en la prevención del cáncer. Además, se ha demostrado que, en ausencia de agentes carcinógenos, no parece que éste péptido afecte a la morfología celular y proliferación, pero impide la transformación de las células en la presencia de carcinógenos. En investigaciones *in vitro* se ha demostrado que mientras la Lunasina pura se hidroliza fácilmente en el tracto gastrointestinal por pepsina y pancreatina, la Lunasina de la proteína de soya es resistente a la acción de estas enzimas. Los estudios posteriores de biodisponibilidad llevados a cabo con animales, han confirmado los resultados preliminares obtenidos por análisis *in vitro* (Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). Es propiedad muy importante de la Lunasina, ya que implica que este agente preventivo del cáncer puede tomarse por vía oral (Belovic *et al.*, 2011).

La Lunasina es un péptido de 43 residuos de aminoácidos, el cual ha mostrado ser quimiopreventivo contra oncogenes y carcinógenos en células de mamífero y en modelo de cáncer de piel de ratón (Figura 5).

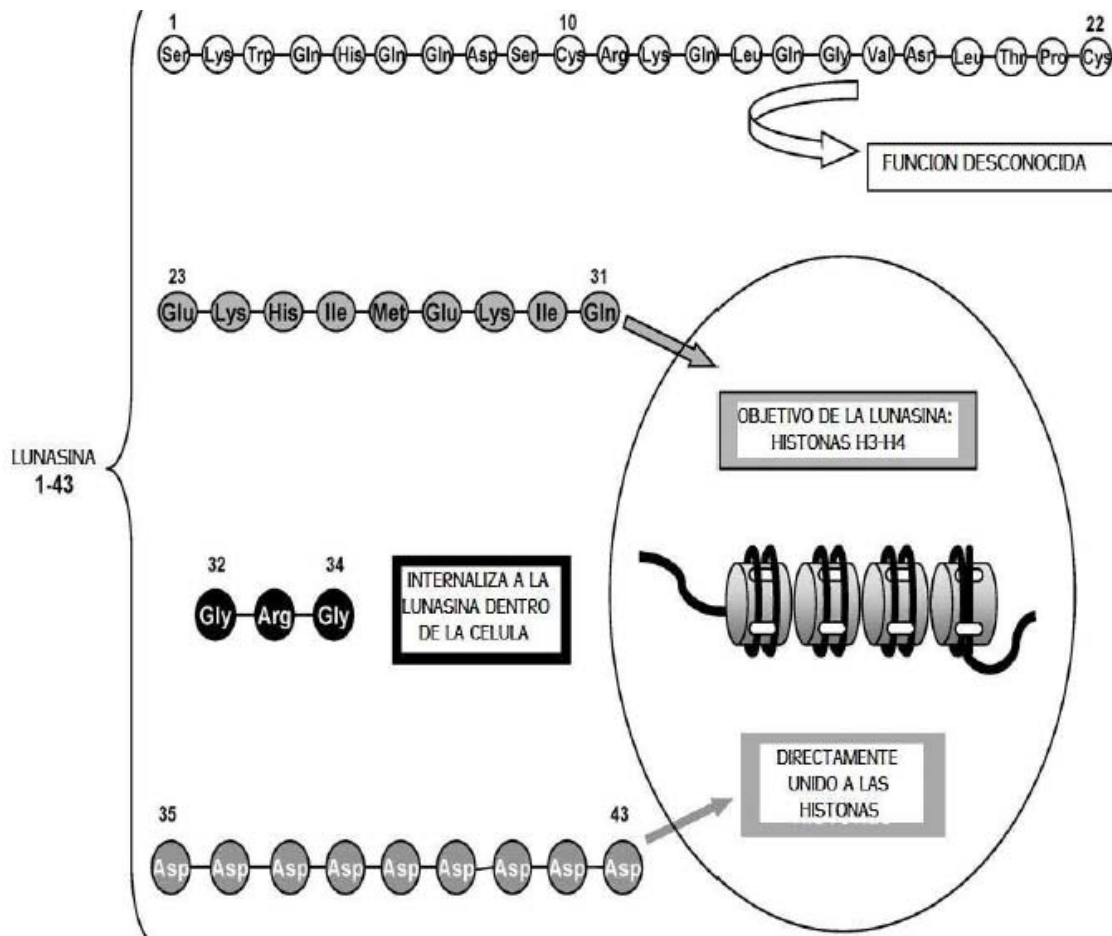
Figura 5. Secuencia de residuos de aminoácidos de la Lunasina*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	V	N	L	T	P	C	E	K	H	I	M	E	K	I
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43		
Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D		

*Tomado de Ortiz-Martínez, 2014

Algunas variedades de soya muestran cantidades variables de Lunasina, mismas que correlacionan con el grado de inhibición de la acetilación de histonas. El fragmento 23-31 dirige la Lunasina hacia la cromatina. El motivo de Gly-Arg-Gly (32-34) es responsable de la internalización de la Lunasina dentro del núcleo de la célula. El fragmento de poli aspartil (35-43) es responsable de la unión directa a la cromatina uniéndose a la región de histonas (Figura 6). La Lunasina natural de soya y la sintética inhiben la acetilación de histonas de una manera dependiente de la dosis. La Lunasina sintética es estable al calor, a temperaturas de hasta 100 ° C durante 10 min. Los estudios en animales indican que la Lunasina resiste la digestión y entra en los tejidos diana después de la absorción (Ortiz-Martínez *et al.*, 2014)

Figura 6.- Actividad de los diferentes fragmentos de la secuencia de la Lunasina*



*Tomado de Hernandez-Ledezma, 2009

Silva-Sánchez *et al.*, (2008) reportan la existencia de un péptido similar a la Lunasina en el amaranto en la fracción de glutelinas, cuya concentración varía de 9.5 a 12.1 µg/g de proteína. En la soya es donde se presenta en mayor concentración, la concentración varía de 6000-7000 mg/g de proteína (González de Mejía *et al.*, 2004).

2.4 Papaína

La papaína es una enzima cisteín proteasa endolítica que se aísla del látex de la papaya (*Carica papaya L.*). Ésta se obtiene por el corte de la piel de la papaya verde y del secado del látex que fluye del corte. Entre más inmadura se encuentre

la fruta, más activa es la enzima. Es de importancia crucial en muchos procesos biológicos en todos los organismos vivos tales como fisiológicos, así como usos industriales tales como en ablandadores de carne y preparaciones farmacéuticas (Tsuge *et al.*, 1999; Amri *et al.*, 2012). La papaína muestra extensa actividad proteolítica hacia proteínas, péptidos de cadena corta, ésteres de aminoácidos y enlaces amida y es aplicada ampliamente en los campos de la alimentación y la medicina (Uhlig, 1998). Preferentemente rompe enlaces peptídicos en los cuales están implicados aminoácidos básicos, particularmente arginina, lisina y residuos adyacentes a la fenilalanina (Menard *et al.*, 1990). Choe *et al.* (2006) y Sigma reportan que preferencialmente la hidrólisis será en los residuos de arginina y lisina adyacentes a residuos hidrofóbicos tal como se muestra en la Figura 7.

Figura 7.- Sitio preferencial de corte de la papaína*

P6	P5	P4	P3	P2	P1	↓	P1'	P2'	P3'	P4'
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	hidrofóbico	Arg	↓	No Val	Xaa	Xaa	Xaa
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	hidrofóbico	Lys	↓	No Val	Xaa	Xaa	Xaa

Xaa = cualquier residuo de aminoácido

hidrofobico = Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, además de Tyr

↓ = sitio de corte

* Tomado de Sigma, 2015

2.4.1 Propiedades, estructura y características de la papaína.

La papaína (Figura 8) Es una proteína globular con una masa molecular de 23,406 Da y consiste de 212 residuos de aminoácidos con 3 puentes disulfuro y con residuos catalíticamente importantes Gln 19, Cys 25, His 158 y His 159 (Michel *et al.*, 1970; Robert *et al.*, 1974; Tsuge *et al.*, 1999). La papaína es una cisteína hidrolasa que es estable y activa bajo un amplio rango de condiciones de pH. Es muy estable incluso a temperaturas elevadas (Cohen *et al.*, 1986). Es una enzima resistente a altas concentraciones de agentes desnaturizantes, por ejemplo, urea 8 M o solventes orgánicos como etanol al 70%. El pH óptimo para la actividad de la

papaína está en el rango de 3.0-9.0, la cual varía con diferentes sustratos (Edwin and Jagannadham, 2000; Ghosh, 2005).

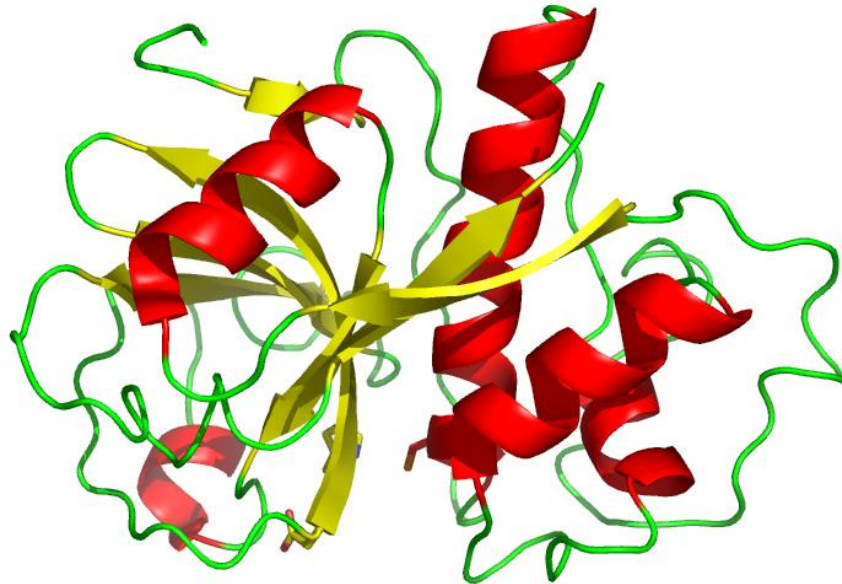


Figura 8.- Representación de listón de la estructura de la papaína (Amri *et al.*, 2012).

La proteína es estabilizada por tres puentes disulfuro y su estructura tridimensional consiste de dos dominios estructurales con una hendidura entre ambas. Ésta hendidura contiene al sitio activo, el cual contiene la diada catalítica que ha sido comparada con la triada catalítica de la quimotripsina. La diada catalítica consiste de los aminoácidos cisteína-25 e histidina-159 (Amri *et al.*, 2012).

2.4.2 Mecanismo del funcionamiento de la papaína

El mecanismo por el cual la papaína realiza la catálisis es a través de la cisteína-25 del sitio activo que ataca el carbono del carbonilo en la cadena principal del polipéptido dejando libre el extremo terminal amino. La ruptura de enlaces peptídicos implica la desprotonación de Cys-25 por His-159. La Asp-175 ayuda a orientar el anillo imidazol de la His-159 para permitir que la desprotonación se lleve a cabo. Aunque lejos dentro de la cadena, estos tres aminoácidos están en estrecha

proximidad debido al plegado. La Cys-25, a continuación, realiza un ataque nucleófilo sobre el carbonilo de carbono de un esqueleto peptídico (Menard *et al.*, 1990; Tsuge *et al.*, 1999). En el sitio activo de la papaína, Cys -25 y His-159 se cree que son catalíticamente activos como par iónico tiolato-imidazolio. La papaína puede ser inhibida por peptidil o no peptidil N-nitrosoanilinas (Guo *et al.*, 1998). La inactivación se debe a la formación de un enlace estable S-NO en el sitio activo (S-nitroso-Cys²⁵) de la papaína (Xian *et al.*, 2000; Amri *et al.*, 2012).

2.4.3 Usos de la papaína

Los usos de la papaína son los siguientes:

1. Para tratar las alergias asociadas con síndrome de intestino irritable e hipoclorhidria (insuficiencia el ácido del estómago) (Mansfield *et al.*, 1985; Amri *et al.*, 2012)
2. Por su efecto analgésico significativo y actividad anti-inflamatoria contra síntomas de la sinusitis alérgica aguda como dolor de cabeza y dolor de muelas sin efectos secundarios (Mansfield *et al.*, 1985; Amri *et al.*, 2012).
3. Como proteasa en ablandadores de carne (Khanna *et al.*, 2007; Amri *et al.*, 2012).
4. En el tratamiento contra la dispepsia y otros trastornos digestivos y trastornos del tracto gastrointestinal (Huet *et al.*, 2006, Amri *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si el hidrolizado con papaína de globulinas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) presenta actividad citotóxica *in vitro* frente a líneas celulares neoplásicas.

3.2 Objetivos Particulares

- Hidrolizar las proteínas de la semilla de amaranto con papaína.
- Fraccionar los oligopéptidos del hidrolizado de las proteínas de amaranto mediante la técnica de ultrafiltración.
- Evaluar la influencia de cada fracción del hidrolizado en la viabilidad celular.
- Evaluar la influencia el tiempo de exposición de cada fracción de hidrolizado en la viabilidad de líneas celulares neoplásicas (Ca Ski, Hep G2 , MCF7 y en la línea celular VERO como control negativo).
- Evaluar la influencia de la concentración de cada fracción de hidrolizado en la viabilidad de líneas celulares neoplásicas (Ca Ski, Hep G2 , MCF7 y en la línea celular VERO como control negativo).

4 HIPOTESIS

En el hidrolizado de las semillas de la especie mexicana *Amaranthus hypochondriacus* puede haber oligopéptidos con actividad citotóxica frente a líneas celulares neoplásicas.

5 JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En México, la tercera causa de muerte para ambos sexos son los tumores malignos, después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus (INEGI, 2012). En México, las principales causas de muerte al año por cáncer en las mujeres corresponden al cáncer de mama y a cáncer cervicouterino (CaCU). El INEGI reportó que de todas las muertes por cáncer en 2010, el tercer lugar fue debido a cáncer hepático.

Los expertos de la FAO/OMS en dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas, reconocen que el crecimiento epidémico de enfermedades crónicas que afligen tanto a los países en desarrollo como a los países desarrollados, están relacionados con cambios en la dieta y el estilo de vida, por lo que actualmente se están encaminando las investigaciones hacia el desarrollo de alimentos funcionales que proporcionen un efecto benéfico a la salud más allá de sus nutrientes (Robles, 2010). Uno de estos alimentos es el amaranto que tiene potencial para combatir estas enfermedades por su alto contenido de nutrientes y sus proteínas. Además, poco se ha investigado acerca del efecto de los oligopéptidos y péptidos producidos por la hidrólisis enzimática de globulinas de amaranto y su posible actividad citotóxica en las líneas celulares de cáncer Ca Ski (CaCU), HepG2 (hepatocarcinoma), MCF7 (cáncer de mama) y en la línea celular VERO (células epiteliales de riñón de mono verde) como control negativo de células. Se decidió probar el efecto de las fracciones del hidrolizado obtenidas por ultrafiltración en estas células considerando que diferentes líneas de cáncer pueden tener diferente sensibilidad a los agentes terapéuticos.

6 METODOLOGÍA

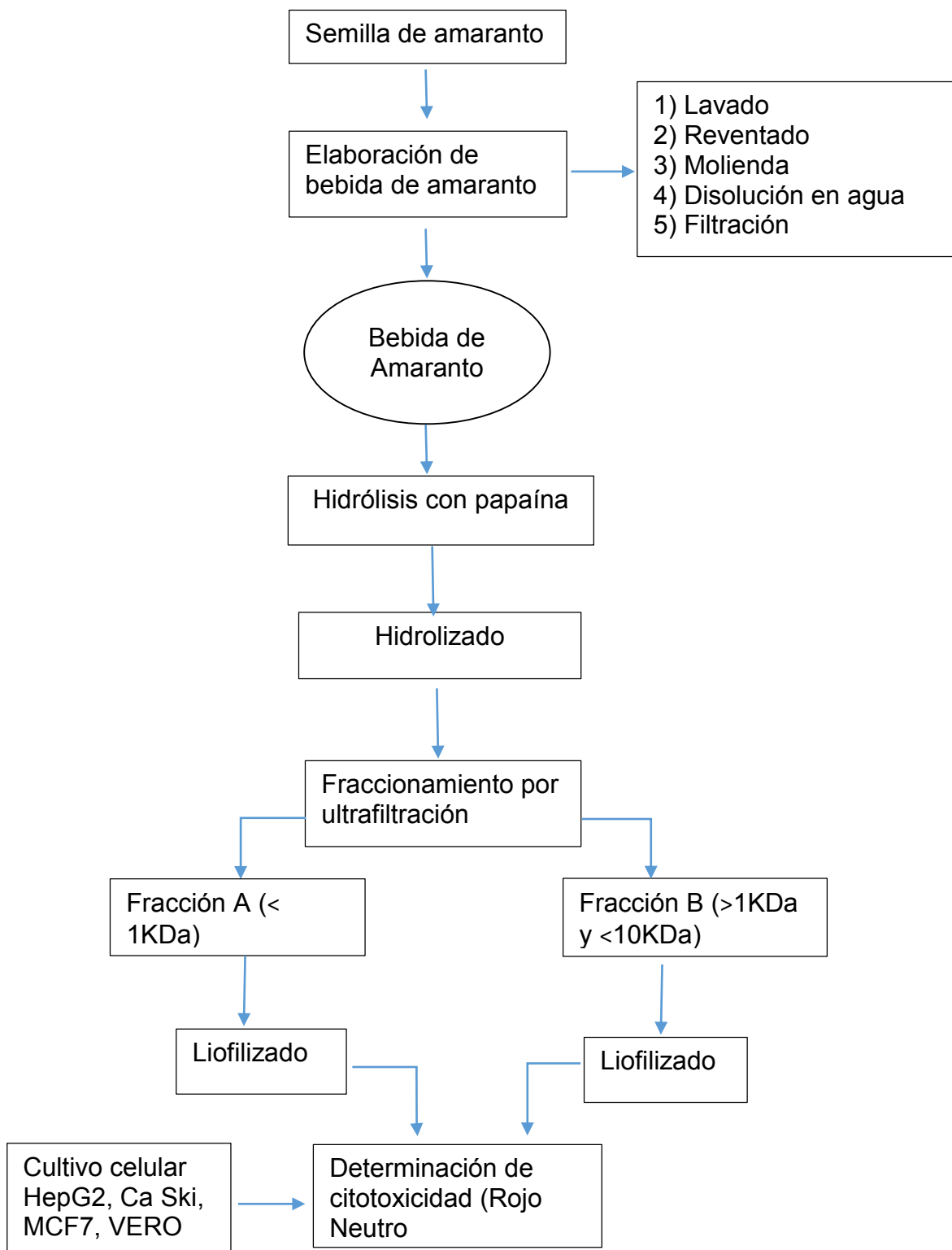


Figura 9. Metodología general de investigación

6.1 Proceso de obtención de la bebida de amaranto

El proceso de elaboración de la bebida de amaranto o “leche de amaranto” se realizó de acuerdo a la patente registrada con nombre “Producto de amaranto nutritivo, su proceso de elaboración y su uso en la alimentación de individuos sanos y/o pacientes con algún tipo de desorden metabólico” del Dr. Manuel Soriano García que consiste de las siguientes etapas:

1. Se seleccionaron las semillas enteras o completas de acuerdo con su contenido interno sólido y una apariencia uniforme de color amarillo. El proceso de selección de la semilla se hizo por inspección visual mediante el rompimiento de la semilla en un mortero de porcelana. La semilla que se selecciona debe tener un contenido completo y sólido.
2. Se limpiaron las semillas para eliminar la cascarilla, la semilla de color negro, las partículas de polvo y pequeños trozos de tallo. Las semillas de color negro son de las especies de amaranto silvestre. La limpieza de las semillas se hizo a través de diferentes tamices que permiten obtener una semilla limpia de color amarillo.
3. Se lavaron las semillas con agua durante 5 minutos en un chorro de agua. El agua ha sido previamente tratada por varios filtros que contienen carbón activado para eliminar las partículas de polvo, cloro, y finalmente un tratamiento con luz ultravioleta empleando un equipo manual y comercial para la eliminación de microorganismos.
4. Se secaron las semillas empleando una fuente de aire caliente.
5. Se reventaron las semillas y se realizó la molienda de la semilla reventada. El tiempo de molienda varió entre 5 a 9 minutos, preferentemente 7 minutos. El equipo de molienda es un producto comercial que tiene un sistema de

cuchillas y el motor de 100 a 500 vatios, preferentemente de 150 vatios que evita el sobrecalentamiento del molino. Se dejó reposar por un periodo de tiempo entre 10 y 15 minutos, y a una temperatura de 20 °C.

6. Se agregó agua que ha sido previamente tratada en una proporción de 10 a 15 partes en volumen por una parte en peso de semillas. Preferentemente se emplearon 10 partes en volumen por una parte en peso de semillas. Se agitó la suspensión obtenida por unos 30 minutos.
7. Se filtró la suspensión para recuperar la proteína soluble en solución acuosa, lípidos que forman la suspensión y carbohidratos solubles, eliminando de esta manera los carbohidratos no solubles tales como los almidones, lípidos, proteínas no solubles en disolución acuosa y la fibra con el fin de separar la bebida de amaranto de los almidones insolubles y fibra. El proceso de filtrado puede ser mediante el uso de una tela de franela, de tejido fino generalmente de lana cardada, perchado y ligeramente batanado, y el efecto de gravedad o empleando equipo de filtración industrial de prensa u otro tipo de filtración de suspensiones de uso industrial. Preferentemente se usa la tela de franela.
8. Se ajustó el volumen de la solución a la concentración de proteína deseada que varía desde 3 a 20 % de proteína, a una concentración de proteína del 13% empleando agua, la concentración de proteína se determinó por el método del ácido bicinconíico.
9. Se agitó la suspensión para homogenizar su contenido durante 10-20 minutos preferentemente 15 minutos con agitador de madera. En el proceso de homogenización se reduce en tamaño los glóbulos de grasa y se induce el proceso de asociación no covalente de los glóbulos de grasa pequeños y las proteínas solubles obteniéndose una bebida con apariencia similar a la leche de vaca, ya que las proteínas y lípidos por separado en presencia de agua forman dispersiones coloidales y emulsiones, respectivamente.

Asimismo, la molienda de las semillas remojadas permitió obtener una dispersión adecuada de los azúcares solubles, de los cationes y aniones y las vitaminas hidrosolubles. De esta manera se obtuvo una bebida o leche de amaranto.

10. Se determinó la cantidad de proteína en la bebida de amaranto empleando los procedimientos: método del ácido bicinconínico (ANEXO 1).

6.2 Obtención del hidrolizado

A partir de la bebida de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*), se llevó a cabo la hidrólisis enzimática utilizando la enzima papaína (Papaína de *Carica papaya*, de Sigma-Aldrich) en una concentración de enzima de 0.05% con respecto al volumen del hidrolizado. Se dejó agitando a una temperatura de 37°C en continua agitación durante 18 horas. Se colectaron muestras cada hora para analizar el proceso de hidrólisis. La hidrólisis se detiene enfriando el recipiente con hielo. Una vez obtenido el tiempo óptimo de hidrólisis, se procedió a realizar la purificación subsecuente de los oligopéptidos generados en el hidrolizado, se centrifugó a 4000 rpm a 4°C para quitar almidones residuales provenientes del extracto de la semilla de amaranto. El sobrenadante fue colectado en frío y se ajustó el pH a 9 con NaOH 0.1 N para precipitar el almidón, se dejó reposar a 4°C durante 1 hora y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 minutos, se colectó el sobrenadante (Medina *et al.*, 1990; Martínez *et al.*, 1996; Condés *et al.*, 2009).

6.3 Análisis electroforético

El análisis electroforético del hidrolizado y de la disolución de globulinas se realizó con geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970).

Se empleó un equipo de electroforesis modelo Mini-PROTEAN II Cell de Bio-Rad. Los geles se hicieron al 12 % de poliacrilamida. Se utilizó un kit estándar de marcadores de peso molecular (Sigma Market Low Range), que incluye las

siguientes proteínas: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina de huevo de pollo (45 kDa), gliceraldehído – 3 – fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36 kDa), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24 kDa), inhibidor de tripsina de soya (20 kDa), α -lactoalbúmina de leche bovina (14.2 kDa), aprotinina de pulmones bovinos (6.5 kDa). El gel fue teñido en azul brillante de Comassie R-250.

6.4 Fraccionamiento del hidrolizado

Para fraccionar el hidrolizado con base en el peso molecular se utilizó el sistema de ultrafiltración Amicon® (Millipore) usando una membrana de 10 KDa para separar los fragmentos proteicos de alto peso molecular así como la enzima papaína. Se colectó el filtrado y éste se pasó nuevamente por una membrana de ultrafiltración de 1 KDa, recuperando el sobrenadante retenido en el sistema. Una vez concentrado el hidrolizado se ajustó al pH inicial (7.0) diluyendo en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 y concentrando nuevamente en membrana de 1KDa. En este estudio se denominará fracción A a la fracción de péptidos que atravesó la membrana de 1KDa y fracción B a la fracción del hidrolizado que atravesó la membrana de 10KDa y se retuvo con la de 1KDa. Ambas fracciones se esterilizaron por filtración a través de un filtro Millipore de 0.22. El concentrado de péptidos fue cuantificado mediante el método de ácido bicinconínico (ANEXO 1)

6.5 Cultivo celular

Los cultivos celulares y los ensayos de citotoxicidad fueron realizados en el laboratorio de enzimología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

Se descongelaron y cultivaron diferentes líneas celulares neoplásicas: MCF-7 (Adenocarcinoma de glándula mamaria), Ca Ski (carcinoma cervicouterino, VPH 16), HEP G2 (hepatocarcinoma) y una línea celular control Vero (células epiteliales de riñón de mono verde). Se cultivaron en DMEM (por sus siglas en inglés

Dulbecco's Modified Eagle Medium) conteniendo 0.1 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y suplementado con 7% de suero fetal bovino (SFB). Los cultivos fueron mantenidos en 5% CO₂ a 37°C en la incubadora.

6.5.1 Montado de placas y exposición del hidrolizado

Una vez que se obtuvo el 80% de confluencia, se sembraron 1x10⁴ células en micro placas de 96 pozos con medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) adicionado de 7% de SFB (suero fetal de bovino) y 1% de antibiótico, y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24h. Pasado este tiempo, las células se expusieron a las concentraciones que se muestran en la tabla 7 para ambas fracciones de hidrolizado durante 24, 48 y 72h a 37°C. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se compararon con un control sin tratamiento y un testigo.

Tabla 7. Diseño experimental para los ensayos de citotoxicidad

LINEAS CELULARES	24h	48h	72h
Vero (control negativo)	Exposición al hidrolizado (ppm) 10, 100,1000,5000,10000,20000		
Ca Ski			
HepG2			
MCF-7			

Posteriormente se determinó la viabilidad mediante el método de rojo neutro (reactivo de Sigma Aldrich).

6.5.2 Método de Rojo Neutro

Se eliminó el medio de los pozos (desde el testigo) y se agregaron 100 µl de solución de rojo neutro (50 µg/ml en DMEM). La microplaca se incubó a 37°C durante 3 h y después se retiró el rojo neutro. Entonces se agregaron 100 µl de solución formolcalcio (0.5% de formaldehído, 1.0% de CaCl₂) y se retiraron inmediatamente. Posteriormente, se agregaron 100 µl de una disolución acético-etanol (1% ácido acético, 50% etanol) a cada pozo y se agitó la placa durante 15 min. La solución colorida de cada pozo fue transferida a una microplaca de 96 pozos vacía y se leyó en un lector de placas a 540 nm (Ramón, 2006; Robles-Ramirez, 2010).

La absorbancia a 540 nm indica la cantidad de Rojo Neutro incorporado por las células por endocitosis y es directamente proporcional a la viabilidad celular. El porcentaje de células viables en la población celular a cada una de las diferentes dosis de los oligopéptidos ensayados, se calculó por medio de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia promedio de células tratadas}}{\text{absorbancia promedio de las células control}} \times 100$$

6.6 Análisis estadístico.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Excel®. Los datos se trataron por un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con varias muestras por grupo. La significancia de las medias se determinó por el método de comparación de medias usando la prueba de Tukey. Se muestra el valor aceptado de *p* (probabilidad) es <0.05. Los resultados se presentan como la media ± error estándar de la media.

7 RESULTADOS

7.1 Predicción de hidrólisis de la globulina 11s del amaranto con la papaína

La predicción de los sitios de corte de la papaína se realizó manualmente debido a que programas disponibles para realizar una hidrólisis *in silico* no tienen en su base de datos la información acerca de la papaína.

En la figura 10 se presenta la secuencia de la globulina 11 s de *Amaranthus hypochondriacus* (código Uniprot Q38712) mostrando en color rojo los residuos en los que preferencialmente están implicados en la hidrólisis con papaína.

Figura 10. Predicción de la hidrólisis con papaína en la secuencia de la globulina 11s de *Amaranthus hypochondriacus*. Los aminoácidos en rojo representan los sitios de corte de la papaína.

10	20	30	40	50
STHASGFFFF	HPTKMAKSTN	YFLISCLLFV	LFNGCMGEGR	FR EF QQNEC
60	70	80	90	100
QIDRLTALEP	TNRIQAERGL	TEVWDSNEQE	F RC AGVSVIR	RTIEPHGLLL
110	120	130	140	150
PSFTSAPELI	YIEQNGGITG	MMIPGCPETY	ESGSQQFQGG	EDERIE RE QGS
160	170	180	190	200
RKFGMRGDRF	QDQHQKIR HL	REGDIFAMPA	GVSHWAYNNG	DQPLVAVILI
210	220	230	240	250
DTANHANQLD	KNFPTRFYLA	GKPQQEHSGE	HQFSRESRRG	ERNTGNIF RG
260	270	280	290	300
FETRLLAESF	GVSEEIAQKL	QAEQDDRGNI	VRVQEGHVI	K PP SRAWEEER
310	320	330	340	350
EQGSRGSRYL	PNGVEETICS	ARLAVNVDDP	SKADVYTPEA	GRLTTVNSFN
360	370	380	390	400
LPIL RHL RLS	AAKGVLY RNA	MMAPHYNLNA	HNIMYCV RGR	GRIQIVNDQG
410	420	430	440	450
QSVFDEELSR	GQLVVVPQNF	AIV KQ AFEDG	FEWVSF KT SE	NAMFQSLAGR
460	470	480	490	500
TSAIR SL PID	VVSNIYQISR	EAAFGL KFN R	PETTLF RSS G	QGEY RR KISI

La papaína corta preferencialmente en residuos de arginina o lisina adyacentes a residuos hidrofóbicos (Choe *et al.*, 2006; Sigma, 2015). La globulina 11s contiene arginina y lisina, sin embargo es mayor el contenido del primero.

Teóricamente se generan 17 fragmentos o cortes de diferentes pesos moleculares siendo el menor, un tripéptido y la fracción más grande contiene 17 residuos. Además, de los fragmentos teóricos ninguno corresponde o tiene similitud con la secuencia de la lunasina.

En el amaranto, específicamente, en *A. hypochondriacus*, la globulina 11s es la más estudiada, y ésta es la razón por la que se presenta como ejemplo de hidrólisis con papaína, sin embargo en la bebida existen más proteínas como albuminas, globulinas 7s y 11s así como la globulina-P como principales fracciones (Martinez *et al.*, 1996; Condés *et al.*, 2009) las cuales en la hidrólisis pueden formar nuevos péptidos. Hasta el momento no hay antecedentes que muestren que se haya estudiado la hidrólisis de éstas globulinas en la búsqueda de péptidos con actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer.

7.2 Análisis electroforético

Al analizar el perfil electroforético (Figura 11); se observa que el hidrolizado y el extracto de globulinas tienen diferentes patrones de bandas siendo el extracto el que tiene más. Esto muestra que la adición de la papaína y las condiciones de hidrólisis (tiempo, temperatura, agitación) fueron satisfactorias para la digestión de proteínas del extracto. Se muestran tres bandas en el hidrolizado mientras que en el extracto se muestran 10 bandas siendo la más intensa aproximadamente en 36 KDa. Las bandas del hidrolizado corresponden a pesos aproximadamente de 14 kDa y menores a 6.5 KDa. El perfil electroforético del hidrolizado de amaranto muestra la degradación de las fracciones del extracto de globulinas de pesos moleculares superiores a 20 kDa.

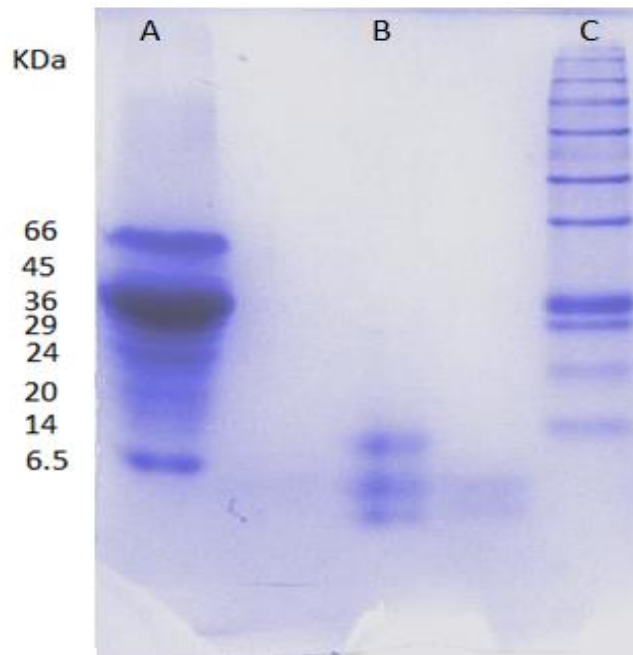


Figura 11. Perfil electroforético del extracto de globulinas y del hidrolizado. Gel de electroforesis al 15% de acrilamida. Donde A= Marcador de peso molecular (Sigma Market Low Range). B= Hidrolizado de globulinas de amaranto y C= Disolución de globulinas de amaranto sin hidrolizar

7.3 Ensayos de citotoxicidad

Los resultados de citotoxicidad se obtuvieron por medio del ensayo de captación de rojo neutro que proporciona una estimación cuantitativa del número de células viables en un cultivo. Es una de las pruebas de citotoxicidad más utilizadas en muchas aplicaciones biomédicas y ambientales. El ensayo se basa en la capacidad de células viables para incorporar y enlazar el colorante rojo neutro supravital en los lisosomas. La mayoría de las células primarias y líneas celulares de origen diverso puede emplearse con éxito. Éste procedimiento es más barato y más sensible que otros ensayos de citotoxicidad (sales de tetrazolio, fuga de enzimas o contenido de proteína). Una vez que las células han sido tratadas, el ensayo puede completarse en menos de 3 horas (Babich y Borenfreund, 1991).

7.3.1 Efecto del tamaño del péptido en la viabilidad celular

En las tablas 8 y 9 se muestra la viabilidad (de acuerdo con el método de rojo neutro) de cada línea celular expuesta a diferentes concentraciones de las fracciones A y B del hidrolizado de globulina de amaranto. Se observa que el efecto es estadísticamente diferente en todas las líneas celulares, lo que sugiere que la sensibilidad de todas las líneas celulares utilizadas en este estudio fue diferente.

En general, los fragmentos de menor peso molecular (fracción A) afectaron la viabilidad de células en mayor medida que la fracción mayor (fracción B). Así mismo, conforme aumenta la concentración de cada fracción, disminuye la viabilidad celular. Tanto en la fracción A como la B, la línea celular que fue mayormente afectada fue la línea celular Ca Ski de cáncer cérvico uterino.

Para la fracción A, disminuyó significativamente (con una probabilidad del 0.05%) a partir de una concentración de 10 ppm el porcentaje de viabilidad en las células Ca Ski disminuyendo un 44% y a 100ppm se mostró una disminución de casi el 80%. Cabe resaltar que en la línea de células VERO (control negativo) no hubo una disminución significativa de la viabilidad en el intervalo de concentraciones de 10 a 1000ppm, fue significativo el cambio a concentraciones de 5000 ppm y mayores mostrando una selectividad para la línea celular Ca Ski. En la fracción B el comportamiento fue diferente. En éste caso la disminución en la viabilidad fue significativa a partir de una concentración de 10 ppm sin embargo aumentó a 85% en 100 ppm. En concentraciones de 5000 ppm y mayores disminuyó nuevamente 98%.

En las células HepG2 disminuyó 19 % a una concentración de 1000 ppm en la fracción A, mientras que en la fracción B fue significativa la disminución a partir de 10 ppm disminuyendo un 87%.

De las líneas celulares neoplásicas, las células MCF7 mostraron una mayor resistencia a la fracción A, ya que hubo una disminución significativa en 10000 ppm del 45%. Sin embargo, las células VERO fueron más resistentes a los péptidos ya que a una concentración de 20000 ppm hubo una disminución del 62 % mientras que las MCF7 disminuyeron un 97 %. Los resultados con la fracción B muestran que la disminución la viabilidad de células fue significativa en 10000ppm del 87%

La línea celular VERO mostró diferencias para cada fracción ya que fue significativa la disminución a partir de 5000 ppm en la fracción A mientras que en la fracción B fue a partir de 10 ppm, disminuyendo un 24%.

En la línea celular VERO y MCF7 se observa que a las concentraciones bajas de péptidos se obtiene una viabilidad mayor que en las células testigo las cuales no estuvieron expuestas a péptidos de amaranto, esto sucede a concentraciones de 10 y 100 ppm de la fracción A en células VERO y de 100 a 5000 ppm de ambas fracciones en las células MCF7. Para ambas líneas celulares concentraciones altas de hidrolizado (10000 y 20000 ppm) provoca la muerte. La adición de péptidos al medio de cultivo de las células constituye un suplemento de fuentes de nitrógeno, aminoácidos, péptidos y vitaminas que podrían ser usadas por las células, previamente esto fue observado en modelos de daño celular gastrointestinal (Fitzgerald *et al.*, 2005; Picot *et al.*, 2006).

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular en función de la concentración de fracción A

% de viabilidad celular (Fracción A)							
Concentración (ppm)							
	TESTIGO	10	100	1000	5000	10000	20000
VERO	100 ± 3.2	105 ± 2.3	103 ± 2.2	99 ± 3.8	77 ± 3.0	62 ± 2.9	38 ± 1.8
MCF7	100 ± 2.7	99 ± 3.7	101 ± 3.2	107 ± 4.7	113 ± 5.0	55 ± 2.9	3 ± 1.6
Ca Ski	100 ± 5.2	66 ± 10.5	21 ± 5.8	19 ± 2.1	19 ± 6.2	23 ± 5.9	10 ± 3.3
Hep G2	100 ± 4.9	99 ± 4.8	100 ± 3.4	81 ± 7.1	9 ± 1.6	3 ± 0.7	7 ± 1.1

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular en función de la concentración de fracción B

% de viabilidad celular (Fracción B)							
Concentración (ppm)							
	TESTIGO	10	100	1000	5000	10000	20000
Vero	100 ± 0.8	76 ± 2.8	78 ± 5.2	76 ± 4.4	11 ± 0.8	5 ± 0.8	4 ± 1.2
MCF7	100 ± 3.5	100 ± 1.4	111 ± 2.9	117 ± 0.8	99 ± 3.4	13 ± 3.3	5 ± 1.9
Ca Ski	100 ± 8.9	58 ± 6.3	85 ± 9.4	24 ± 1.8	2 ± 2.7	2 ± 3.3	2 ± 2.4
Hep G2	100 ± 9.6	79 ± 6.5	80 ± 5.7	75 ± 6.5	1 ± 0.3	3 ± 1.6	4 ± 0.8

Estudios realizados por Kannan *et al.*(2008) muestran que en el hidrolizado de salvado de arroz con alcalasa, aumenta la citotoxicidad en la línea celular HepG2 conforme disminuye el peso molecular de las fracciones peptídicas ya que la fracción de 5-10 KDa tuvo valores de citotoxicidad del 60% mientras que la menor a 5KDa fue mayor a 80%.

7.3.2 Efecto combinado del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular

En las figuras 12 a la 19 se presenta el efecto de la concentración de la fracción de hidrolizado, así como del tiempo de exposición del péptido en las células Ca SKi, HepG2, MCF 7 y VERO. Como en el caso anterior, se muestra que la viabilidad es diferente para cada fracción. En general, cuando ambas fracciones se expusieron por más de 24 horas, hubo una disminución en la viabilidad con concentraciones menores mostrando que hay una interacción entre el tiempo de exposición y la concentración. Esto se comprueba con el análisis de varianza en la cual se muestra que hay diferencia significativa entre la interacción de factores.

7.3.2.1 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea Ca Ski

En la figura 12 se muestra el efecto de la Fracción A en la línea celular Ca Ski. En este caso, desde las primeras 24 horas de exposición la disminución de viabilidad fue significativa a partir de la concentración más baja (10 ppm) y conforme aumenta la concentración disminuyó aún más hasta alcanzar valores de viabilidad negativos en 5000ppm, 10000 y 20000 ppm cuyas cifras son de -2, -4 y -6%.

Ahora bien, a las 48 y 72 horas se inhibió aún más el crecimiento de las células que a las 24 horas. A las 48 horas en una concentración de 1000 ppm hubo una viabilidad del 8 %, 10 veces menor que a las 24 h. Esta información sugiere que la disminución de la viabilidad celular es dependiente del tiempo de exposición en la línea celular Ca Ski. Al igual que a las 24 h, los valores de viabilidad fueron negativos en concentraciones superiores a 5000ppm.

A las 72 h de exposición se alcanzó el mayor efecto inhibitorio. A la concentración de 10 ppm hubo una disminución del 34% mientras que a 24 y 48 horas la disminución fue del 5% y 8% respectivamente. A partir de la concentración

de 100 ppm, hubo una disminución del 80% y este valor se mantuvo constante en 1000, 5000 y 10000 ppm. En 20000ppm disminuyó 90%. Se observa que no se llegaron a valores negativos tal como sucedió en 24 y 48 h, posiblemente debido a que las células se adaptaron al medio de cultivo con los péptidos de la fracción A.

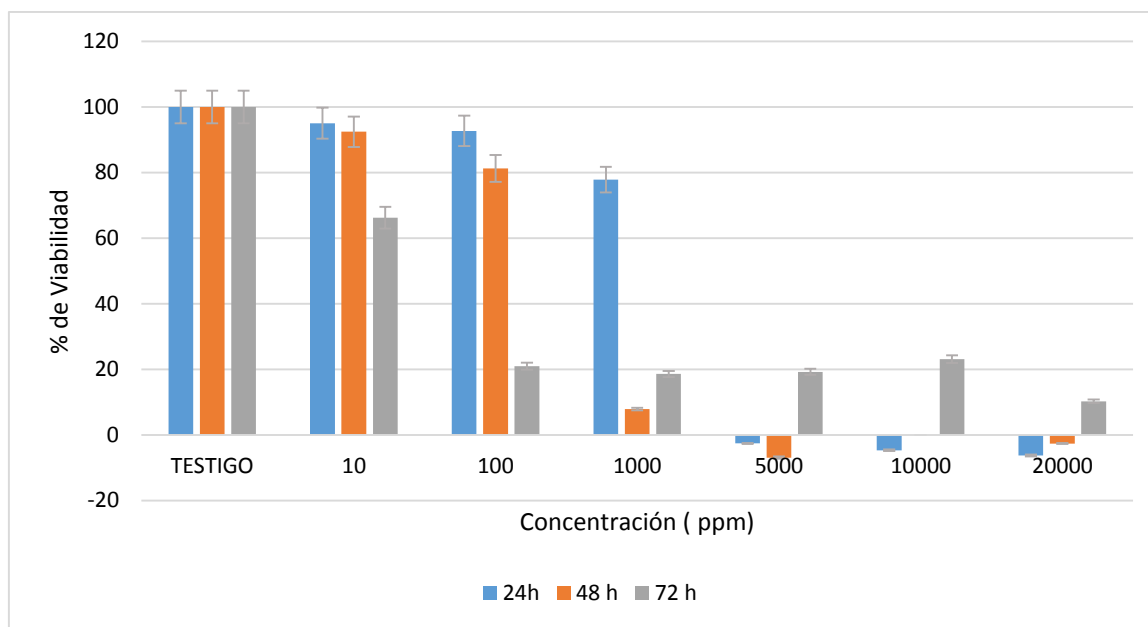


Figura 12. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Ca Ski en la fracción A

En la figura 13 se muestra el efecto de la Fracción B en la línea celular Ca Ski. En este caso también se observa que la viabilidad de las células es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de la fracción B. A las 24h se muestra que en 10 ppm hubo una viabilidad del 56 sin embargo, en 100 y 1000 ppm aumentó ya que se obtuvieron valores de 83 y 78% respectivamente. En 5000 ppm volvió a disminuir a 43% y en 10000 y 20000 ppm hubo valores menores al 10%. Con esta fracción no se obtuvieron valores negativos tal como ocurrió con la fracción A.

A las 48 horas no hubo diferencia significativa entre 10, 100 y 1000 ppm ya que en promedio disminuyó un 20%. A partir de 5000 ppm hubo una disminución considerable mayor del 90%.

A las 72 horas se observa el mismo caso que a las 24 h ya que en 10 ppm hubo una menor viabilidad que a 100 ppm. En 1000 ppm disminuyó nuevamente un 86% y en concentraciones superiores hubo una inhibición mayor al 98%. En ningún caso se obtuvieron valores negativos.

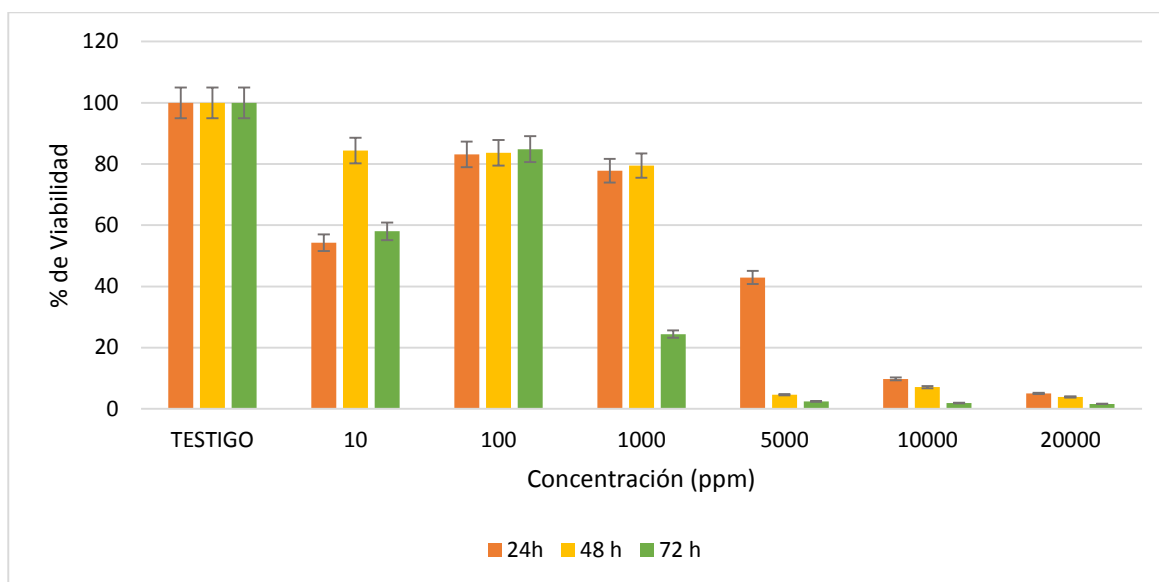


Figura 13. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Ca Ski en la fracción B

Hasta el momento, no hay antecedentes en los que se haya probado el efecto de algún péptido o proteína de origen alimentario en la viabilidad de células Ca Ski, sin embargo la base de datos CancerPPD (<http://crdd.osdd.net/raghava/cancerppd/info.php>) reporta hasta el momento 18 entradas en esta línea celular las cuales en su mayoría provienen de péptidos derivados de la superficie del parásito *Toxoplasma gondii* y del antígeno secretado Mycobacterium tuberculosis (MPT63) cuyos valores máximos de citotoxicidad fueron de 20% y 55% respectivamente.

Estudios realizados por Robles-Ramirez *et al.*, (2009) muestran que el hidrolizado de proteína de semilla de soya germinada tuvo actividad citotóxica en la línea celular HeLa (cáncer cervicouterino).

7.3.2.2 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea Hep G2

En la figura 14 se muestra el efecto de la Fracción A en la línea Hep G2. En este caso, a las 24 horas de exposición la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 5000 ppm ya que hubo una disminución del 22% y a 10000 y 20000 ppm hubo una disminución del 52 y 85% respectivamente.

Ahora bien, a las 48 y 72 horas disminuyó la viabilidad a partir de 1000 ppm, lo que sugiere que el tiempo de exposición influye en la viabilidad de las células HepG2. Conforme aumenta la concentración, la viabilidad disminuye considerablemente ya que a las 48 y 72 a una concentración de 5000 ppm la viabilidad es de 10 y 9% respectivamente, indicando que no hubo diferencia significativa entre ambos tiempos. Comparando estos valores con los de 24 hubo una disminución en la viabilidad de casi 8 veces a esa misma concentración.

A 10000 ppm a 24 horas la disminución es del 52% mientras que a 48 y 72 h es mayor al 95% .

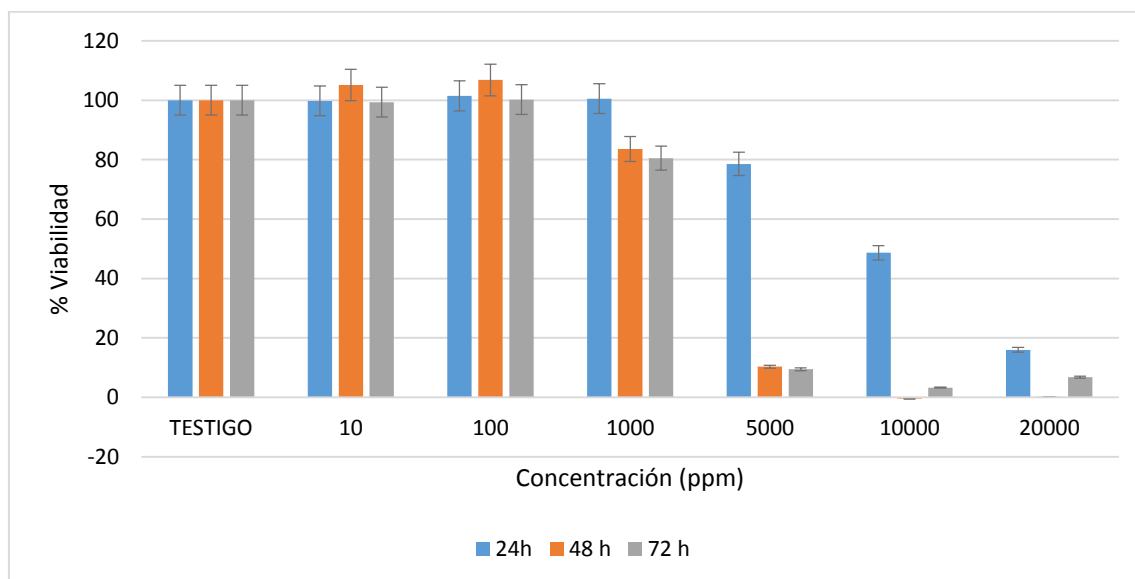


Figura 14. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Hep G2 en la fracción A.

En la figura 15 se muestra el efecto de la Fracción B en la línea Hep G2. En este caso, a las 24 horas de exposición el cambio en la viabilidad fue significativo a partir de 1000 ppm ya que hubo una disminución del 17% y conforme aumentó la concentración el cambio fue mayor ya que en 5000 y 10000 ppm hubo valores de inhibición del 26 y 61% respectivamente.

A las 48 horas de exposición, la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 1000 ppm igual que a las 24 horas. Asimismo en 5000 y 10000 ppm hubo una disminución del 88 y 97% respectivamente.

A las 72 horas la disminución fue a partir de 10 ppm con un valor del 22% y fue constante hasta 5000 ppm donde disminuyó la viabilidad un 99% al igual que con la fracción A, el tiempo de exposición influye en la viabilidad.

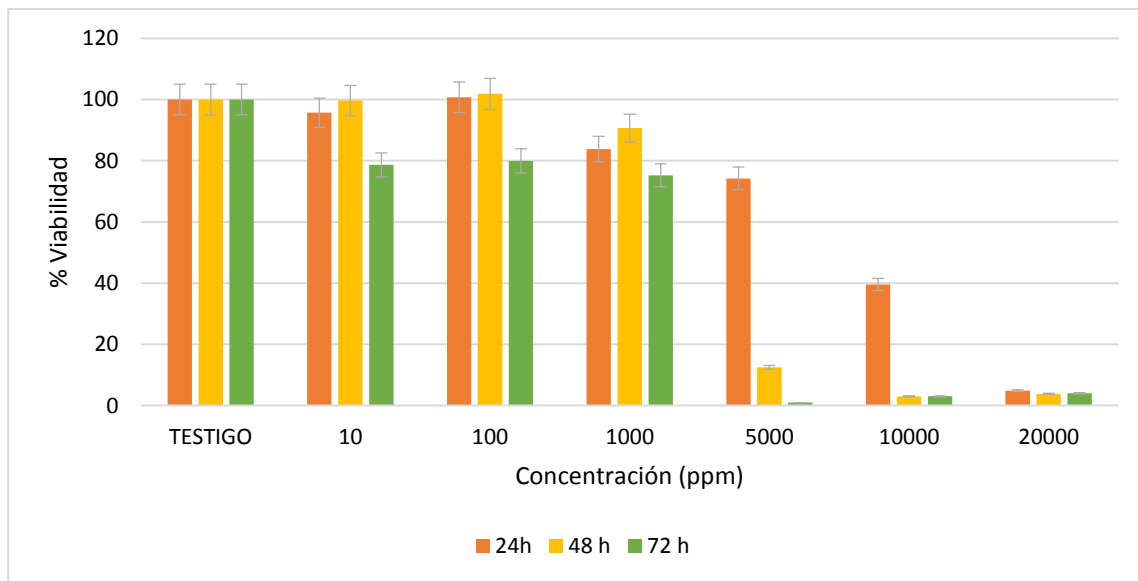


Figura 15 Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular Hep G2 en la fracción B

En estudios realizados por Li *et al.* (2013) se muestra que en hidrolizados de proteína de maíz con alcalasa disminuye la viabilidad de células conforme aumenta el tiempo de exposición. A las 72 horas y una concentración de 5120 ppm, hubo una disminución casi del 50% en células Hep G2 siendo menor que con el amaranto.

En la base de datos CancerPPD hasta el momento se han hallado 6 entradas para esta línea celular, de las cuales 4 corresponden a péptidos antimicrobianos de la familia de las temporinas, en donde el máximo valor de fue de 50% a una concentración de 50 µg/mL y 24 horas de exposición.

7.3.2.3 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea celular MCF7

En la figura 16 se muestra el efecto de la Fracción A en la línea MCF7. En este caso, a las 24 horas de exposición la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 100 ppm, ya que fue del 11% y conforme aumentaba la concentración alcanzó una disminución del 77% con una concentración de 20000 ppm.

A las 48 horas de exposición, la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 5000 ppm con un valor del 13% y a 10000 y 20000 ppm fueron de 66 y 95% respectivamente.

A las 72 horas a una concentración de 1000 ppm hubo un aumento en la viabilidad del 8% y del 13% en 5000 lo que posiblemente sugiere que la fracción A del hidrolizado promovió el crecimiento celular a estas concentraciones. Sin embargo, a las concentraciones de 10000 y 20000 ppm disminuyó considerablemente la viabilidad 46 y 97% respectivamente.

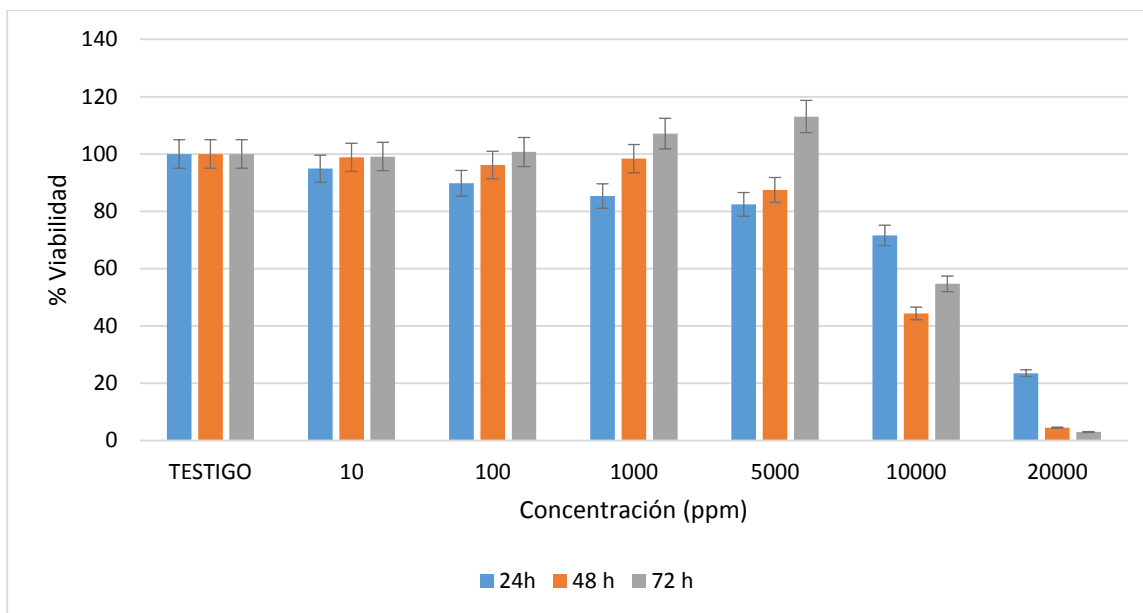


Figura 16 Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular MCF7 en la fracción A

En la figura 17 se muestra el efecto de la Fracción B en la línea MCF7. En este caso, a las 24 horas de exposición la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 100 ppm ya que fue del 7% y se mantuvo constante ya que no tuvo diferencia significativa entre este valor y a 1000 y 5000ppm. A 10000 y 20000 ppm los valores fueron 50 y 91% respectivamente.

A las 48 horas de exposición, al igual que en la fracción A, la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 5000 ppm ya que fue del 20% y a 10000 y 20000 ppm fue del 82 y 93% respectivamente.

A las 72 horas hubo un aumento en la viabilidad a una concentración de 100 y 1000 ppm del 8% y del 20% respectivamente y disminuyó la viabilidad en 5000ppm y concentraciones mayores. Estos resultados sugieren que, al igual que en la fracción A, los péptidos promovieron el crecimiento celular en el intervalo medio de las concentraciones en estudio.

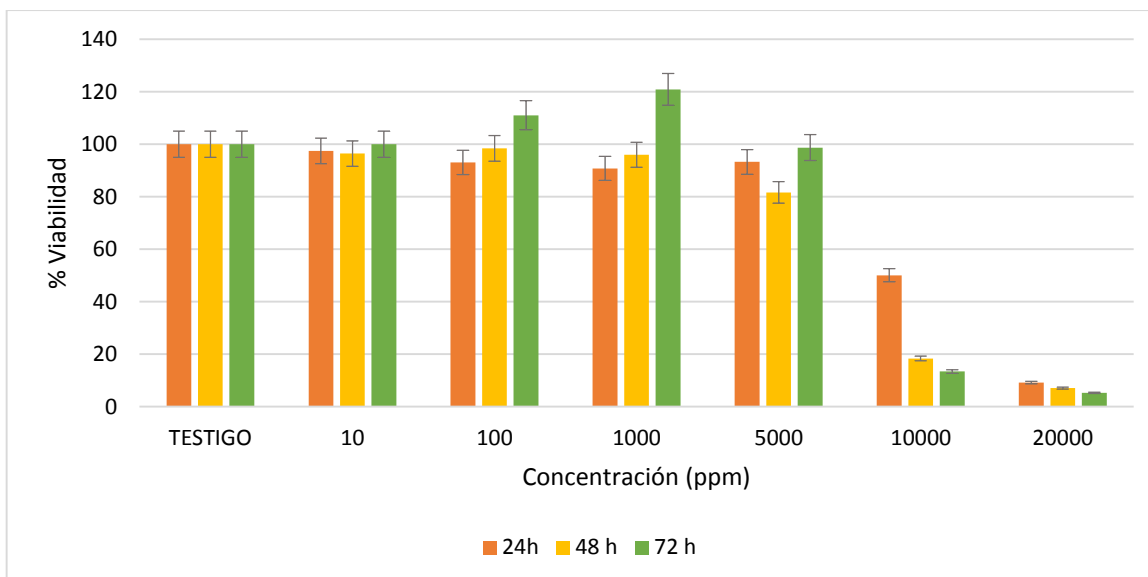


Figura 17. Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular MCF7 en la fracción B

Existen estudios realizados por Picot *et al.*, (2006) realizaron ensayos células MCF7 en donde prueban hidrolizados de proteínas de pescado con una mezcla de enzimas (Protamex®- alcalasa) en concentraciones de 1000 ppm hay inhibición de crecimiento de hasta 26% en proteína de bacaladilla y en proteína de bacalao de hasta 40% a las 72 h de exposición.

Asimismo, existen estudios realizados por Hsu *et al.*, (2011) donde aislaron 2 péptidos largos (Leu-Pro-His-Val-Leu-Thr-Pro-Glu-Ala-Gly-Ala-Thr y Pro-Thr-Ala-Glu-Gly-Gly-Val-Tyr-Met-Val-Thr) del hidrolizado de proteínas de atún con papaína y proteasa XXII que mostraron actividad antiproliferativa de forma dosis dependiente contra la línea celular MCF7, con una IC₅₀ de 8.1 y 8.8 μ M respectivamente.

De todas las líneas celulares utilizadas en este estudio, la línea MCF 7 fue la que tuvo el mayor número de entradas en la base de datos CancerPPD con 237. El péptido que tuvo mayor actividad fue el obtenido de la secreción de piel de *Rana*

chensinensis el cual ocasionó que las células tuvieran un valor de porcentaje de viabilidad celular del 61% a un tiempo de exposición de una hora.

7.3.2.4 Efecto del tiempo de exposición y concentración de los péptidos en la viabilidad celular de la línea celular VERO

El objetivo de todas las terapias contra el cáncer es prevenir la proliferación y destruir a las células cancerosas logrando un resultado efectivo con el mínimo de efectos colaterales (Robles, 2010). De aquí que sea tan importante evaluar el efecto de los hidrolizados de proteína de soya sobre células no cancerosas. Esta prueba se realizó sobre células epiteliales de riñón de mono verde (VERO).

En la figura 18 se muestra el efecto de la Fracción A en la línea celular VERO. En este caso, a las 24 horas de exposición la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 5000 ppm ya que fue del 12%. A 10000 y 20000 ppm disminuyó 32 y 48% respectivamente.

A las 48h de exposición, al igual que en la fracción A, la disminución de viabilidad fue significativa a partir de 100 ppm con un valor del 91% y a 20000 ppm disminuyó un 60%

A las 72 h hubo un aumento en la viabilidad a una concentración de 100 ppm del 8% y la viabilidad se mantuvo a 100% y 1000ppm. Este valor disminuyó concentraciones mayores. Estos resultados sugieren que, al igual que en el caso de la línea celular MCF7, los péptidos promovieron el crecimiento celular en el intervalo medio de las concentraciones en estudio. Sin embargo, este efecto fue mayor en MCF7.

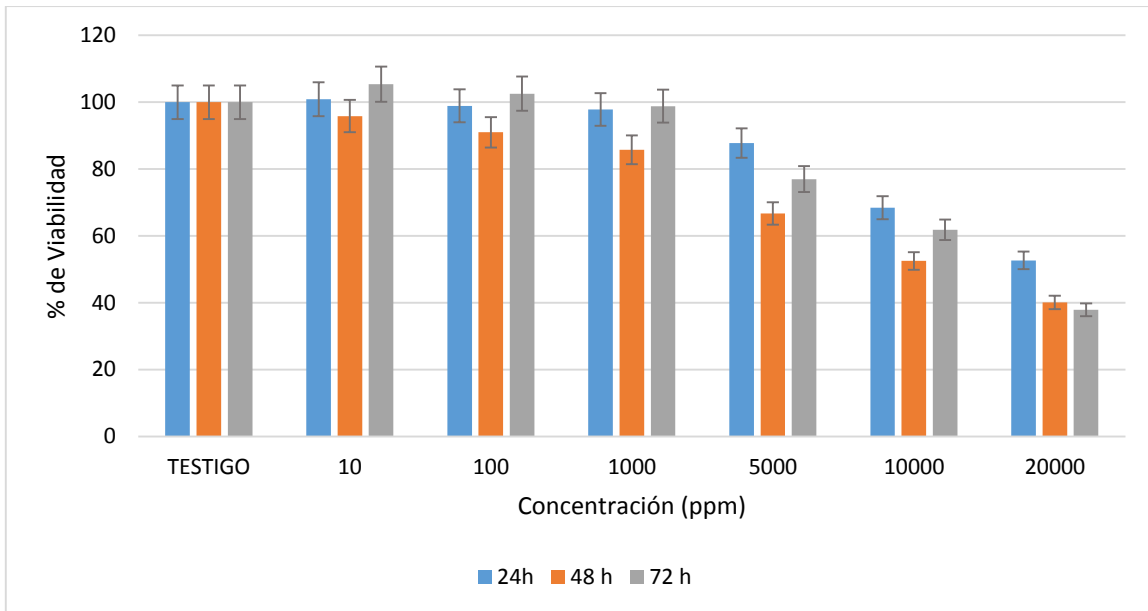


Figura 18 Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular VERO en la fracción A

En la figura 19 se muestra el efecto de la Fracción B en la línea celular VERO. En este caso, a las 24 horas de exposición hubo un aumento en la viabilidad del 17% a 10 ppm, posteriormente disminuyó y fue significativa en 5000 ppm disminuyendo un 8%. A 10000 disminuyó 76% y 20000 ppm fue mínima.

A las 48 h también se observa un aumento en la viabilidad en las concentraciones de 10 a 1000 ppm. A partir mayores de 5000 ppm comenzó a disminuir considerablemente y fue menor que a las 24 h.

A las 72 h tuvo un efecto inhibitorio. En el intervalo de 10-1000ppm la disminución de la viabilidad se mantuvo constante. A las concentraciones de 5000, 10000 y 20000 hubo el mayor efecto ya que hubo valores de 10, 5% y 3% de viabilidad respectivamente.

Comparando ambas fracciones, se observa que hubo una menor viabilidad de células VERO con la fracción B, ya que si se compara la concentración de

1000ppm y 72h de exposición para ambas fracciones, en la fracción A la viabilidad es de 100% mientras que para la fracción B hay un valor del 76%.

Las células Ca Ski y Hep G2 se vieron mayormente afectadas que las células VERO al ser expuestas a la fracción A. Las células cancerosas y normales de mamífero tienen una serie de diferencias que pueden ser responsables de la selectividad de algunos de los péptidos. Estas diferencias se basan en primer lugar en la carga neta negativa que caracteriza a las membranas de las células malignas (Schweizer, 2009). Moléculas aniónicas tales como la fosfatidilserina (PS), mucinas O-glicosiladas, gangliósidos sialilados y sulfato de heparina están presentes en la membrana de las células cancerosas, que les confiere una carga neta negativa que contrasta con la membrana celular normal de los mamíferos, típicamente de naturaleza zwitteriónica (Hoskin y Ramamoorthy, 2008; Schweizer, 2009).

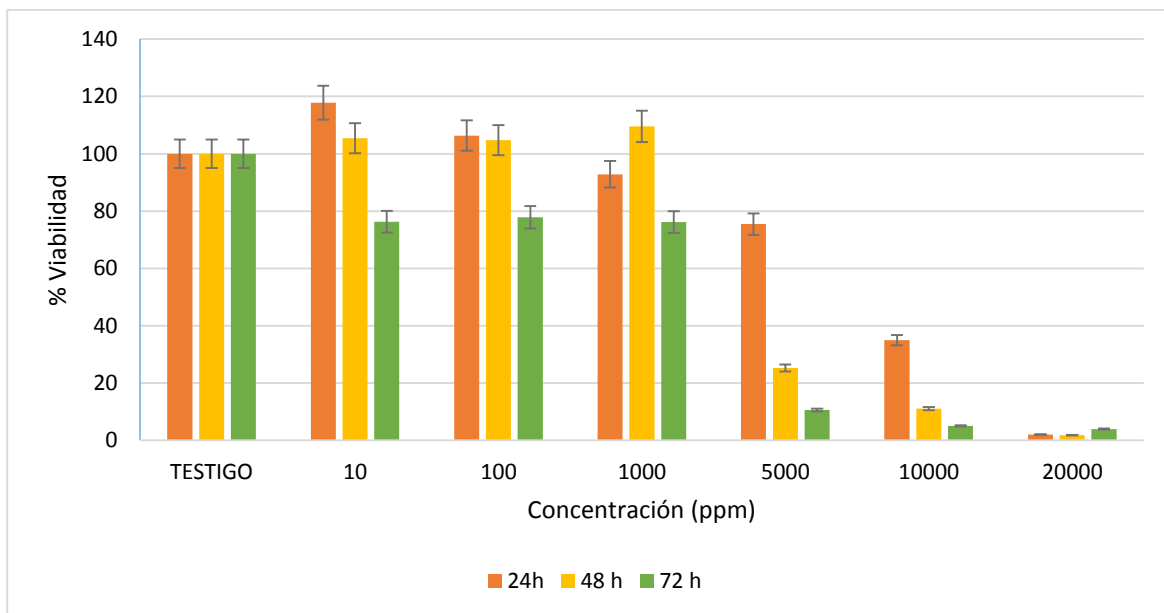


Figura 19 Efecto de la concentración y del tiempo de exposición en la viabilidad de la línea celular VERO en la fracción B

La mayoría de estudios en alimentos con péptidos con posible actividad anticancerígena se ha enfocado en la Lunasina si similares a éste. En otros estudios, se prefiere elevar la funcionalidad liberando secuencias encriptadas

dentro de una proteína mediante hidrólisis. Esta observación fue demostrada por Barrio y Añon en 2010 ya que encontraron que la actividad antiproliferativa de *Amaranthus mantegazzianus* fue el doble que la actividad del aislado proteico sin hidrolizar. Sin embargo, hay estudios donde el hidrolizado tiene menor citotoxicidad que la Lunasina pura debido a que los posibles péptidos con actividad no están purificados y por ende no tienen la misma concentración que la Lunasina.

8 CONCLUSIONES

- Se obtuvieron péptidos producidos por la hidrólisis de las proteínas de la semilla de amaranto con las condiciones de 18 horas de incubación a 37°C con la enzima proteolítica papaína.
- Los hidrolizados de las proteínas de la semilla de amaranto inhibieron el crecimiento de células cancerosas Ca Ski, Hep G2 y MCF7 de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. Además tuvo un efecto mínimo en células VERO (no cancerosas).
- A las 24, 48 y 72 h de exposición se observó una disminución de la viabilidad celular significativa de la línea celular neoplásica (Ca Ski), dependiente de la concentración de cada fracción del hidrolizado. Se muestra que el mayor efecto citotóxico se obtuvo a las 72 h. El efecto citotóxico de cada fracción de hidrolizado en cada línea celular fue diferente. La línea celular sobre la que tuvo mayor actividad citotóxica fue la línea celular Ca Ski, seguida de la línea HepG2 y la línea celular neoplásica que mostró mayor resistencia fue la MCF7. Para la línea Ca Ski, la fracción A (menor a 1KDa) mostró mayor actividad que la fracción B (mayor a 1KDa). La citotoxicidad fue mayor para la fracción A (<1KDa) 10 veces.
- La línea celular control (Vero) mostró disminución de la viabilidad en un 60% a una concentración de 20000ppm del hidrolizado en la fracción de péptidos menor a 1 KDa.

9 PERSPECTIVAS

- Purificar la fracción A de los péptidos del hidrolizado de las proteínas de amaranto empleando técnicas de cromatografía de líquidos con cromatografía de alta resolución (HPLC).
- Determinar la estructura del o los péptidos con actividad citotóxica.
- Dilucidar el mecanismo de actividad anticancerígena de los oligopéptidos obtenidos.
- Los péptidos con actividad citotóxica “*in vitro*” podrían servir para posibles estudios de citotoxicidad “*in vivo*” con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos para prevenir y coadyuvar en el tratamiento del cáncer.

10 BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Castro, A.J., Jacobo-Salcedo, M. del R., Salazar-Olivo, L.A., Carranza-Alvarez, C., González-Espíndola, L.A., Domínguez, F., Maciel-Torres, S.P., García-Lujan, C., González-Martínez, M. del R., Gómez-Sánchez, M., Estrada-Castillón, E., Zapata-Bustos, R., Medellín-Milán, P., García-Carrancá, A. 2011. Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Natural Product Communications*, 6(12),1925-8.

Aluko, R.E. (2012). *Functional foods and Nutraceuticals*, Food Science Text Series, Springer, pp. 38-39

Amri, E., Mamboya, F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance: A review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8 (2), 99-104

Annie's Annuals and Perennials, 2015. *Amaranthus hypochondriacus* `Giant Purple` Disponible a traves de internet en <https://www.anniesannuals.com/plants/view/?id=2066>

Arendt, E., Zannini, E. (2013). *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing Limited. Cap. 13. Pp. 439-473

Asociacion Mexicana del Amaranto. (2012). El amaranto, un alimento con multiples beneficios. Disponible en internet en www.amaranto.com.mx

Babich, H., Borenfreund E. (1991). Citotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(7), 2101-2103.

Barac, M. B., Stanojević, S. P., Pešić, M. B. (2005). Biologically Active Components of Soybeans and Soy Protein Products – A Review. *APTEFF*, 36, 1–266.

- Barrio, D.A, Añon, M.C.(2010). Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European Journal of Nutrition*, 49, 73-82
- Belović, M. M., Mastilović, J.S., Torbica, A.M., Tomić, J.M., Stanić ,D.R., Džinić N.R. (2011). Potential of bioactive proteins and peptides for prevention and treatment of mass non-communicable diseases. *Food and Feed Research*, 38 (2), 51-61
- Becerra, R. (2000). El amaranto: Nuevas tecnologías para un cultivo antiguo. *Biodiversitas*, 5 (30), 1-7
- Bewley, J.D., Greenwood, J.S., (1990). Protein Storage and utilization in seeds. *Plant Physiology, biochemistry and molecular biology*. David T. Dennis and David H Tuppin. Ed John Wiley. Pp. 456-469
- Bhutia, S.K., Maiti, T.K. (2008). Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology*, 26,210–7.
- Cai, Y. Z., Corke, H., Wu, H. X. (2004). Amaranth. In: wrigley, c., corke, h. and walker, c. (eds) *Encyclopedia of Grain Science*. Oxford: Elsevier.
- Caselato-Sousa, V. M., & Amaya-Farf_an, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science*, 77(4), 93-104
- Chen, Y., Huang, S., Lin-Shiau, S. , Lin, J. (2005). Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, 26(7),1296-1306.

- Chen, Y., Chen, Y., Wu ,C., Yu, C., Liao, H. (2010). Prolamin, a rice protein, augments anti-leukaemia immune response. *Journal of Cereal Science*, 51 (2),189–97.
- Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D.C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J.A., Craik, C.S. (2006). Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12824–12832
- Cohen, L.W., V.M. Coghlan and L.C. Dihel, 1986. Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene*, 48 219-227.
- Condés, M.C., Scilingo, A.A., Añon, M.C. (2009). Characterization of amaranth protein modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 963-970
- De Gobba, C., Tompa, G., Otte, J. (2014). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205-215.
- De la Cruz-Torres, E., García-Andrade, J. M.(2008) “Mejoramiento de PSEUDOCEREALES en el ININ”. Disponible en: <http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/48%20MEJORAMIENTO.pdf>
- De Mejia, E. G., Bradford T., Hasler C. (2003). The Anticarcinogenic Potential of Soybean Lectin and Lunasin. *Nutrition Reviews*, 61, 7, 239–246.
- De Mejia, E. G., Vasconez, M., De Lumen, B. O., Nelson, R. (2004). Lunasin Concentration in Different Soybean Genotypes, Commercial Soy Protein, and Isoflavone Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5882-5887.

- De Mejia, G. E., Bradford, T., Hasler, C. (2005). The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutrition Reviews*, 61, 239-246
- De Mejia, E.G., Dia, V.P. (2010). The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29, 511– 528.
- Dei Piu, L., Tassoni, A., Serrazanetti, D. I., Ferri, M., Babini, E., Tagliazucchi, D., Gianotti, A. (2014). Exploitation of starch industry liquid by-product to produce bioactive peptides from rice hydrolyzed proteins. *Food Chemistry*, 155, 199-206
- Delgado, M., Tironi, V.A., Añon, M.C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1752–60.
- Esteve, C., Marina, M. L., García, M. C. (2014). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167, 272-280.
- Fitzgerald, A.J., Rai, P.S., Marchbank, T., Taylor, G.W., Ghosh, S., Ritz, B.W., Playford, R.J. (2005). Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut*; 54(6):775–81
- Ghosh, S., 2005. Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. *Journal of Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 264, 6-16.
- Gorinstein, S., Pawelzik, E., Delgado-Licon, E., Haruenkit, R., Weisz, M. and Trakhtenberg, S. (2002). Characterisation of pseudocereal and cereal proteins

by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 886–891

Guo, Z., J. Ramirez, J. Li and P.G.Wang, 1998. Peptidyl N-nitrosoanilines: A novel class of cysteine protease inactivators. *Journal of American Chemical Society*, 120, 3726-3734.

Hoskin, D.W, Ramammorthy,A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial péptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 357-375

Hernández-Ledesma B., Hsieh, C. C., De Lumen, B. O. (2009). Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides*, 30, 426–430.

Huet, J., Y. Looze, K. Bartik, V. Raussens, R. Wintjens, Boussard, P. (2006). Structural characterization of the papaya cysteine proteinases at low pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341: 620-626.

Huerta-Ocampo, J.A., Barba de la Rosa, A.P. (2011). Amaranth: A pseudo-cereal with nutraceutical properties, *Current Nutrition & Food Science*, Bentham Science Publishers Ltd. , 1-9

Hsu, K-C, Li-Chen, E.C.Y., Jao, C-L.(2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126 (2), 617-622

Iwaniak, A., Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6 (3), 5-15

- Jang, A., Jo, C., Kang, K-S, Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107, 327–36.
- Jeong H. J., Lam Y., De Lumen B. O.(2002). Barley Lunasin Suppresses *ras*-Induced Colony Formation and Inhibits Core Histone Acetylation in Mammalian Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 50, 5903- 5908
- Jeong, H. J., Park, J. H., Lam, Y., De Lumen, B. O. (2003). Characterization of Lunasin Isolated from Soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7901–7906.
- Jeong H. J., Jeong J. B., Kim D. S., Park J.H., Lee J. B., Kweon D. H., Chung G. Y., Seo E. W., De Lumen ,B. O. (2007). The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Letters*, 255, 42–48.
- Jeong H. J., Lee J. R., Jeong J. B., Park J.H., Cheong Y.-K., De Lumen B. O. (2009). The Cancer Preventive Seed Peptide Lunasin From Rye Is Bioavailable and Bioactive. *Nutrition and Cancer*, 61, 5, 680–686.
- Juan, R., Pastor, J., Alaiz, M., Megias, C., Vioque, J. (2007). Caracterización proteica de las semillas de once especies de amaranto. *Grasas y Aceites*, 58 (1), 49-55
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Johnson, M.G., Nannapaneni, R.(2008). Human colon and liver cancer cell proliferation inhibition by peptide hydrolysates derived from Heat-Stabilized defatted rice bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11643-11647

- Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Lay, J. O., Liyanage, R. (2010). Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31, 1629–1634.
- Khanna, N., Panda, P.C. (2007). The effect of papain on tenderization and functional properties of spending hen meat cuts. *Indian J. Anim. Res.*, 41: 55-58.
- Kennedy, A.R. (1998). The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal Of Clinical Nutrition*. 68(suppl), 1406S-1412S.
- Li J-T, Zhang J-L, He, H, Ma Z.L., Nie Z-K, Wang Z-Z, Xu, X-E (2013). Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*, 5, 297–305.
- Lam ,S.K., Ng, T.B. (2011). Apoptosis of human breast cancer cells induced by hemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* cv. Legumi secchi. *Food Chemistry*, 126, 595–602.
- Maldonado-Cervantes, E., Jeong, H. J., León-Galván, F., Barrera-Pacheco, A., De León-Rodríguez, A., De Mejia, E. G., De Lumen, B. O., Barba de la Rosa, A. P. (2010). Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*, 31, 1635–1642.
- Manninen, A. (2004). Protein hydrolysates in sport and exercise: A brief review. *Journal of Sports Science and Medicine*, 3, 60-63

- Mans, D.R., Di Leone, L., Ferrary Caldas, A.P., Maino, M., Almeida, L., Cancela, A.L., Grivicich, L., Brondani da Rocha, A., Schwartzmann, G. (2000). Cellular and clinical pharmacokinetic/pharmacodynamic basis for lack of efficacy of 21-day continuous topotecan in patients with untreated advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Tumori Journal*, 86(6),458-64.
- Mansfield, L.E., Ting, S., Haverly, R.W. , Yoo, T.J. (1985). The incidence and clinical implications of hypersensitivity to papain in an allergic population, confirmed by blinded oral challenge. *Annals of Allergy*, 55, 541-543.
- Martinez, E.N., Añon, M.C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 44, 2533-2530
- Medina,L.M., Mackenzie,J., Bermudez, A.S. (1990). Obtención de almidon bajo en proteínas a partir de maíz desgerminado. *Revista Colombiana de Química*, 19 (2), 7-14
- Menard, R., Khouri, H.E. , Plouffe, C. , Dupras R. , Ripoll, D., Vernet, T, *et al.* 1990. A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry*, 29: 6706-6713.
- Mitchel, R.E., Claiken, M.I.,Smith, E.L.J. 1970. The complete amino acid sequence of papain. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 3485-3492.
- Monteros, C. J.; Nieto, C. C.; Caicedo, C. V.; Rivera, M. M. y Vimos, C. N. (1998). "INIAP Alegría". Primera variedad mejorada de Amaranto para la sierra Ecuatoriana. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo.
- Mora-Escobedo, R., Robles-Ramirez, M.C., Ramon-Gallegos, E., Reza-Aleman, R. (2009).Effect of protein hydrolysates from germinated soybean on cancerous

cells of the human cervix: An *in vitro* study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 271-278

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2015). Cancer. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Ortiz-Martinez, M., Winkler, R., García-Lara, S.,(2014). Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of Proteomics*, 5, 111,165-183

Park, J. H., Jeong, H. J., De Lumen, B. O. (2005). Contents and Bioactivities of Lunasin, Bowman-Birk Inhibitor, and Isoflavones in Soybean Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7686-7690.

Pasko, P., Sajewicz, M., Gorinstein, S., Zachwieja, Z. (2008). Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica* ,20,661–72.

Pecorino, L. (2005). *Molecular Biology of Cancer, Mechanisms, Targets and Therapeutics*. Oxford, New York

Pereira, A.L. (2000). Respuesta humoral contra las proteínas L1 y E2 del HPV en mujeres con lesiones precursoras y cáncer cervicouterino. *Biomédicas-UNAM*,11, 3-11

Picot, L., Bordenave, S, Didelot, S., *et al.* 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*. 41, 1217–1222.

Pisarikova, B., Kracmar, S., Herzig, I. (2005). Amino acid contents and biological

value of protein in various amaranth species. Czech Journal of Animal Science 50:169–74.

Quiroga, A.V., Barrio, D.A., Añon, M.C.(2015). Amaranth lectin presents potential antitumor properties. LWT-Food Science and Technology, 60, 478-485

Ramón, G.E. 2006. Técnicas básicas de cultivo de células y tejidos animales y ensayos de citotoxicidad. ENCB. IPN. México.

Rivillas Acevedo, L. A., 2008. Aislamiento y purificación de péptidos antimicrobianos de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Rizzello, C.G., Coda, R., De Angelis, M., Di Cagno, R., Carnevali, P., Gobbetti, M. (2009). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. International Journal of Food Microbiology, 131:189–96.

Robert, A.M., Dann, L., Lown, G. 1974. The specificity of the S'1 subsite of papain. Journal of Biochemistry, 141, 495-501.

Robles Ramírez, M.C., 2010. Efecto de la germinación sobre las propiedades anticancerosas de la proteína de soya. Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional

Robles-Ramírez M.D.C., Ramón-Gallegos, E., Mora-Escobedo, R., Torres-Torres N. (2012). A peptide fraction from germinated soybean protein down regulates PTTG1 and TOP2A mRNA expression, inducing apoptosis in cervical cancer cells. Journal of experimental therapeutics & oncology, 9, 255–63.

- Santini, A., Novellino, E., Armini, V., Ritieni, A. (2013). State of the art of Ready-to-Use Therapeutic Food: A tool for nutraceuticals addition to foodstuff. *Food Chemistry*, 140 (4), 843-849.
- Sarmadi BH, Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
- Sauer, J.D. (1967). The grain amaranth and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54 (2), 103-137
- Saunders, R.M., Becker, R. (1984). *Amaranthus*: A potential food and feed resource. En *Advances In Cereal Science and Technology*. Y. Ed Pomeranz . Vol 6, Cap 6, p 357-397
- Schweizer, F. (2009). Cathionic amphiphilic peptides with cáncer-selective toxicity. *European Journal of Pharmacology*, 625, 190-194
- Segura-Campos, M., Chel-Guerrero, L., Betancur-Ancona, D., Hernandez-Escalante, V.M. (2011). Bioavailability of bioactive peptides. *Food Reviews International* ,27, 213–226.
- Sigma-Aldrich. Papain. Preferential Cleavage. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/biochemicals/biochemical-products.html?TablePage=16410606>
- Silva Sanchez, C., 2007. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. Tesis de doctorado. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Silva-Sánchez C., Barba de la Rosa A. P., León-Galván M. F., De Lumen B. O., De León-Rodríguez A., De Mejía E. G. (2008). Bioactive Peptides in Amaranth

(*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 1233–1240.

Soriano-García, M. Patente denominada “PRODUCTO DE AMARANTO NUTRITIVO, SU PROCESO DE ELABORACIÓN Y SU USO EN LA ALIMENTACIÓN DE INDIVIDUOS SANOS Y/O PACIENTES CON ALGÚN TIPO DE DESORDEN METABÓLICO” Invento: Dr. Manuel Soriano García en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM. 9 de julio del 2004. Patente No de Folio 2709184-2. Clasificación: Int. CI: A23C11/10; A23L2/00; A23L2/38; A23L2/39; A61K36/21. Obtención del título de patente No. 278682. Fecha de expedición: 3 de septiembre de 2010.

Tironi V.A., Añon M.C., 2010. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: effect of proteolysis. Food Research International, 43, 315–322.

Torres, MG., Ortega, O.C, Ángeles, LA., Villalobos, HA., Salmerón, CJ., Lazcano, PE., Hernández, AM. 2013. Patrones de utilización de programas de prevención y diagnóstico temprano de cáncer en la mujer. Salud Pública Mex. 55 supl 2: S241-S248.

Tsuge, H., T. Nishimura, Y. Tada, T. Asao and D. Turk *et al.*, 1999. Inhibition mechanism of cathepsin L specific inhibitors based on the crystal structure of papain- CLIK148 complex. Biochemical and biophysical Research Communications, 266, 411-416.

Vargas Ramírez, A. B., 2010. Efectividad *in vitro* de la terapia fotodinámica y modificación cromatínica en la eliminación de células de cáncer cervicouterino. Tesis de maestría. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional

Venskutonis, P. R. and Kraujalis, P. (2013), Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12: 381–412

Ulbricht, C.; Abrams, T.; Conquer, J.; Costa, D.; Serrano, J. M. G.; Taylor, S.; Varghese, M. (2009). An evidence-based systematic review of amaranth (*Amaranthus* spp.) by the natural standard research collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 6(4) Pages: 390-417

Uhlir, H., 1998. *Industrial Enzymes and their Applications*. 1st Edn., John Wiley and Sons, New York, , pp: 454.

URL 1: <http://www.inegi.org.mx>

URL 2: http://crdd.osdd.net/raghava/cancerppd/browse_assay.php

URL 3: <http://www.achtli.com/node/366>

Xian, M., X. Chen, Z. Liu, K. Wang and P.G. Wang, 2000. Inhibition of papain by s-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 20467-20473

Yu, L. G., Milton, J. D., Fernig, D. G., & Rhodes, J. M. (2001). Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomse-Friedenreich antigen-binding lectins. *Journal of Cellular Physiology*, 186(2), 282-287

Zhou, P., Yang, Ch., Ren, Y., Wang, C., Tian, F. (2013). What are the ideal properties for functional food peptides with antihypertensive effect? A computational peptidology approach. *Food Chemistry*, 141 (3), 2967-2973.

11 ANEXOS

ANEXO 1. Determinación de proteínas por el método de BCA

Preparación de reactivo de trabajo para el cálculo de proteínas por medio de BCA

Para la preparación del reactivo de trabajo se tiene que llevar a cabo los siguientes cálculos:

Volumen total de reactivo de trabajo= (número de estándares + muestras) x número de repeticiones x 200 μ l

Medición de proteína soluble mediante el método de ácido bicinconínico

Para la cuantificación de proteína soluble por el método del ácido bicinconínico, se utilizó el kit de proteínas BCA de Pierce, número 23225. Se realizó una curva patrón a partir de disoluciones de albúmina bovina sérica (BSA).

Curva patrón:

El kit contiene ampollas de albúmina estándar con una concentración de 2mg/mL en 0.9% de solución salina y 0.05% de azida de sodio, las cuales se diluyeron al realizar la curva patrón para el procedimiento de microplacas, en un rango de trabajo de 20-2000 μ g/mL, de acuerdo a la tabla 10:

Tabla 10 Estándares para la curva de calibración de Albúmina para BCA

VIAL	VOLUMEN DE DILUYENTE	VOLUMEN DE FUENTE DE BSA	CONCENTRACIÓN FINAL DE BSA
A	0 μ L	300 μ L de stock	2000 μ g/mL
B	125 μ L	375 μ L de stock	1500 μ g/mL
C	325 μ L	325 μ L de stock	1000 μ g/mL
D	175 μ L	175 μ L de stock	750 μ g/mL
E	325 μ L	325 μ L de stock	500 μ g/mL
F	325 μ L	325 μ L de stock	250 μ g/mL
G	325 μ L	325 μ L de stock	125 μ g/mL
H	400 μ L	100 μ L de stock	25 μ g/mL
I	400 μ L	0 μ L de stock	blanco

Reactivos

Reactivo A contiene: carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bisinconínico y tartrato de sodio en Hidróxido de sodio 0.1 M

Reactivo B contiene: sulfato cúprico al 4%

Preparación del reactivo de trabajo (WR)

1. Se determinó el volumen del reactivo del trabajo (WR), de acuerdo a la siguiente fórmula: $(\# \text{ de estándares} + \# \text{ de muestras}) * (\# \text{ de réplicas}) * (\text{Volumen de WR por muestra}) = \text{volumen total de WR requerido}$
Nota: El volumen de WR requerido por muestra en este procedimiento es de 200 μL
2. El reactivo de trabajo WR se preparó mezclando 50 partes de A con una de reactivo B (50:1, reactivo A:B)

PROCEDIMIENTO PARA MICROPLACAS.

- 1.-Se tomó una alícuota de 25 μl de cada uno de los estándares o muestras desconocidas, por duplicado, dentro de los pozos en la microplaca.
- 2.- Se adicionó 200 μl del reactivo de trabajo (WR), a cada uno de los pozos y se agitó en un agitador de placas, por 30 seg.
- 3.- Se cubrió la placa y se incubó a 37 °C por 2 h.
- 4.- Una vez que transcurrió el tiempo, se dejó enfriar la placa por unos minutos.
- 5.- Se midió la absorbancia a 562 nm.

ANEXO 2. Análisis nutrimental de la bebida de amaranto

La Tabla 11 muestra los promedios de la composición de la bebida de amaranto en líquido. Los estudios de la composición de amaranto se realizaron por el Laboratorio de Ingeniería Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Tabla 11. Composición de la bebida de amaranto por cada 100 gramos.

Análisis	Bebida Nutritiva de Amaranto
Contenido energético	101.00 (Kcal/100g) 428,00 (KJ/100g)
Proteínas*	13,00 g
Grasas (Lípidos)	5,00 g
de las cuales Grasa saturada	0,50 g
Cenizas	3,00 g
Carbohidratos totales	67,30 g
de los cuales azúcares	1,00 g
Fibra dietética	7,00 g
Cenizas	3,00 g
Colesterol	0,00 g
Sodio, mg/100g	22,99 mg
Potasio, mg/100g	411,00 mg
Calcio, mg/100g	298,00 mg
Fósforo, mg/100g	887,00 mg
Manganeso, mg/100g	2,26 mg
Hierro, mg/100g	10,00 mg
Tiamina (Vitamina B1)	0,14 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	0,34 mg
Vitamina E (Equivalente a tocoferol)	10,00 mg
Ácido ascórbico (Vitamina C)	7,50 mg
Agua	4,00 g

* Factor de 6.25