



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* en células malignas humanas SiHa y MDA”

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L.N. MARIA FERNANDA RESENDIZ OTERO

Directora de Tesis

DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 15 de febrero de 2021



15/febrero/2021
 AAM/MCBS/025/2021

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

María Fernanda Reséndiz Otero
 Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de Amaranthus hypochondriacus L. en células malignas humanas SiHa y MDA" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

- PRESIDENTE Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
- PRIMER VOCAL Dra. María del Carmen Valadez Vega
- SECRETARIO Dra. Aurea Bernardino Nicanor
- SUPLENTE Dr. Luilli Antonio López Contreras
- SUPLENTE Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
 DIRECTOR



DIRECCIÓN

DEA LYDIA LOPEZ PONTIGO
 COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
 COORDINADOR DEL PROGRAMA

Instituto de Ciencias de la Salud
 Exhacienda la Concepción s/n Camino a Tilcuautla.
 San Agustín Tlaxiaca, Hgo. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 mtria_bio_sal@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada con número de CVU: 920773.

Al Instituto Tecnológico de Celaya, en Celaya, México; por las facilidades que me brindaron durante la estancia corta realizada en el periodo de 3 de agosto al 28 de agosto de 2019.

Agradezco en especial a mi madre, mi hermana y mis tutores por todo el apoyo y cariño brindado.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUCCIÓN	5
2 ANTECEDENTES	6
2.1 <i>Generalidades</i>	6
2.1.1 <i>Cáncer</i>	6
2.1.1.1 <i>Cáncer de mama</i>	7
2.1.1.2 <i>Cáncer de cérvix</i>	8
2.1.2 <i>Características de los pseudo-cereales</i>	9
2.1.2.1 <i>Amaranthus</i>	9
2.2 <i>Antecedentes de problema</i>	19
2.2.1 <i>Hidrólisis enzimática</i>	19
2.2.1.1 <i>Enzimas proteolíticas</i>	20
2.2.1.2 <i>Obtención de péptidos</i>	22
2.2.2 <i>Péptidos bioactivos</i>	22
2.2.2.1 <i>Péptidos bioactivos en la semilla de amaranto</i>	23
2.2.2.2 <i>Actividades biológicas de los péptidos bioactivos</i>	24
3 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	28
4 JUSTIFICACIÓN	29
5 HIPÓTESIS	30
6 OBJETIVO(S)	30
6.1 <i>General</i>	30
6.2 <i>Específicos</i>	30
7 MATERIALES Y MÉTODOS	31
7.1 <i>Tipo de estudio</i>	31
7.2 <i>Evaluación de protocolo por el comité de ética</i>	31
7.3 <i>Diagrama de diseño experimental</i>	31
7.3.1 <i>Extracción de proteínas</i>	31
8 METODOLOGÍA	33
8.1 <i>Material vegetal</i>	33
8.2 <i>Preparación de muestra</i>	33

8.2.1	<i>Harina</i>	33
8.2.2	<i>Extracto-Aislado proteico</i>	33
8.2.2.1	<i>Precipitación de proteínas con sulfato de amonio</i>	33
8.2.2.2	<i>Liofilización</i>	33
8.2.3	<i>Fracciones peptídicas</i>	33
8.2.3.1	<i>Hidrolisis enzimática</i>	33
8.2.3.2	<i>Ultrafiltración</i>	34
8.3	<i>Análisis químico proximal</i>	34
8.4	<i>Ensayo de Bradford para determinación de proteínas solubles totales</i>	34
8.5	<i>Cuantificación de metabolitos secundarios</i>	35
8.5.1	<i>Determinación de actividad hemaglutinante (Lectinas)</i>	35
8.5.1.1	<i>Preparación de eritrocitos</i>	35
8.5.1.2	<i>Identificación</i>	35
8.5.2	<i>Determinación de actividad hemolítica (Saponinas)</i>	35
8.5.2.1	<i>Preparación de eritrocitos</i>	36
8.5.2.2	<i>Identificación</i>	36
8.6	<i>Cuantificación de compuestos de origen fenólico</i>	36
8.6.1	<i>Fenoles totales (FT)</i>	36
8.6.2	<i>Taninos (TN)</i>	36
8.6.3	<i>Antocianinas totales (ANT)</i>	37
8.7	<i>Cuantificación de ácido ascórbico (AA)</i>	37
8.8	<i>Determinación de actividad antioxidante</i>	38
8.8.1	<i>Ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS^{•+})</i>	38
8.8.2	<i>Ensayo de decoloración del catión radical α-α-difeníl-β-picrilhidrazilo (DPPH[•])</i>	38
8.8.3	<i>Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)</i>	38
8.9	<i>Determinación de actividad anticarcinogénica</i>	39
8.9.1	<i>Líneas celulares, cultivo y siembra</i>	39
8.9.2	<i>Conteo celular y protocolo de siembra</i>	39
8.9.3	<i>Ensayo de citotoxicidad y antiproliferativo en líneas celulares con aislado proteico y péptidos bioactivos</i>	40
8.9.4	<i>Citotoxicidad (Ensayo de MTT)</i>	40
8.10	<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET)</i>	41

8.11	<i>Definición de variables</i>	42
8.12	<i>Análisis estadístico</i>	43
9	RESULTADOS	44
9.1	<i>Análisis químico proximal de la harina de Amaranto (<i>A. hypochondriacus</i>)</i>	44
9.2	<i>Cuantificación de proteína soluble de la harina de semilla de <i>A. hypochondriacus</i> durante el proceso de separación de los péptidos.</i>	44
9.3	<i>Metabolitos secundarios</i>	45
9.3.1	<i>Actividad hemaglutinante del extracto proteico, aislado proteico y péptidos</i>	45
9.3.2	<i>Actividad hemolítica del extracto proteico, aislado proteico y péptidos</i>	46
9.3.3	<i>Constituyentes de origen fenólico y ácido ascórbico en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos</i>	47
9.3.4	<i>Actividad antioxidante en extracto proteico, aislado proteico y péptidos</i>	48
9.3.5	<i>Concentración antioxidante inhibitoria media (IC₅₀)</i>	49
9.3.6	<i>Actividad anticarcinogénica</i>	50
9.3.6.1	<i>Estudios in vitro en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231).</i>	50
9.3.6.2	<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET) en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) tratadas con aislado proteico.</i>	57
9.3.6.3	<i>Estudios in vitro en la línea celular de cáncer de cervix (SiHa)</i>	58
9.3.6.4	<i>Microscopía electrónica de transmisión (MET) en la línea celular de cáncer de cervix (SiHa) tratadas con aislado proteico.</i>	64
10	DISCUSIÓN	65
10.1	<i>Análisis proximal</i>	65
10.2	<i>Proceso de obtención de los péptidos</i>	66
10.3	<i>Caracterización de compuestos presentes en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos de <i>A. hypochondriacus</i>.</i>	68
10.3.1	<i>Actividad hemaglutinante</i>	68
10.3.2	<i>Actividad hemolítica</i>	69
10.3.3	<i>Compuestos de origen fenólico</i>	69
10.3.4	<i>Ácido ascórbico</i>	71
10.3.5	<i>El aislado proteico y péptidos de <i>A. hypochondriacus</i> mostraron actividad antioxidante</i>	72

10.4	<i>El aislado proteico de A. hypochondriacus mostró actividad citotóxica y antiproliferativa.....</i>	75
10.4.1	<i>Cambios morfológicos de las células MDA-MB-231 y SiHa inducidos por el aislado proteico de A. hypochondriacus.....</i>	77
10.5	<i>Los péptidos de A. hypochondriacus mostraron actividad citotóxica y antiproliferativa.....</i>	80
11	CONCLUSIONES.....	83
12	PERSPECTIVAS	84
13	REFERENCIAS	85
14	ANEXOS	107
14.1	<i>Correlaciones.....</i>	107
14.2	<i>Carta de aprobación del por el comité de ética en investigación</i>	109
14.3	<i>Cartas de consentimiento informado.....</i>	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas de la carcinogénesis.	6
Figura 2 Clasificación de los tipos de virus por riesgo carcinogénico.....	8
Figura 3 Especies predominantes de amaranto. A) <i>A. hypochondriacus</i> B) <i>A. caudatus</i> C) <i>A. cruentus</i>	10
Figura 4 Fruto y semilla de amaranto. A) Fruto B) Micromorfología de la superficie de la semilla de <i>A. hypochondriacus</i> C) Sección transversal D) Sección longitudinal de la semilla de amaranto.	11
Figura 5 Esquema de liberación de péptidos bioactivos a partir de proteína precursora.	23
Figura 6 Esquema metodológico de la separación de péptidos a partir de la semilla de <i>A. hypochondriacus</i>	31
Figura 7 Esquema metodológico.....	32
Figura 8 Cuantificación de proteínas solubles durante el proceso de extracción..	45
Figura 9 Actividad hemaglutinante de lectinas presentes en proteínas y péptidos obtenidos de la semilla de <i>A. hypochondriacus</i> en 4 tipos de eritrocitos.	46
Figura 10 Concentración antioxidante inhibitoria media (IC ₅₀).	50
Figura 11 Efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 24 h de exposición.....	51
Figura 12 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 48 h de exposición.	53
Figura 13 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 72 h de exposición.	54
Figura 14 Análisis con microscopico electrónico de transmisión (TEM) de la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) cultivada durante 72 h.....	57
Figura 15 Efecto citotóxico del asilado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 24 h de exposición..	58

Figura 16 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 48 h de exposición.....	59
Figura 17 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 72 h de exposición.....	61
Figura 18 Análisis con microscopico electrónico de transmisión (TEM) de la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) cultivada durante 72 h.....	64
Figura 19 Modelo descrito sobre la formación de poros por saponinas.	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación botánica del amaranto.	10
Tabla 2 Comparación de composición proximal entre amaranto y algunos cereales y pseudocereales.....	12
Tabla 3 Composición de aminoácidos esenciales en las semillas de las tres principales especies de amaranto.....	13
Tabla 4 Clasificación de Osborne para proteínas vegetales basándose en su solubilidad. .	14
Tabla 5 Distribuciones promedio de proteínas (%) en fracciones Osborne de varios pseudocereales, cereales y legumbres.....	14
Tabla 6 Enzimas proteolíticas	20
Tabla 7 Características de líneas celulares	39
Tabla 8 Definición de variables	42
Tabla 9 Composición química proximal de harina de semilla de <i>A. hypochondriacus</i>	44
Tabla 10 Metabolitos secundarios evaluados en el extracto proteico, aislado proteico y ambos péptidos.....	47
Tabla 11 Actividad antioxidante en el extracto proteico, aislado proteico y ambos péptidos	48
Tabla 12 Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad y antiproliferativos, expresados en porcentaje de viabilidad celular, del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231)	54
Tabla 13 Dosis inhibitoria media (DI ₅₀) determinadas en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) tratada con aislado proteico y péptidos obtenidos de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	56
Tabla 14 Análisis estadístico de los ensayo de citotoxicidad y antiproliferativos en porcentaje de viabilidad celular del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto en la línea celular de cáncer de cervix (SiHa).....	61
Tabla 15 Dosis inhibitoria media (DI ₅₀) determinadas en la línea celular de cáncer de cervix (SiHa) tratada con aislado proteico y péptidos obtenidos de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	63
Tabla 16 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre las diferentes muestras del proceso de separación de péptidos y los compuestos evaluados ($p < 0.05$).....	107

Tabla 17 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en el extracto proteico ($p < 0.05$)	107
Tabla 18 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en el aislado proteico ($p < 0.05$)	108
Tabla 19 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en los péptidos >30 kDa ($p < 0.05$)	108
Tabla 20 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en los péptidos <30 kDa ($p < 0.05$)	108

RESUMEN

Los pseudocereales han sido ampliamente reconocidos como una fuente de alimentación altamente nutritiva ofreciendo beneficios para la salud debido a la presencia de compuestos bioactivos; dentro de este grupo se encuentra el amaranto, el cual es reconocido por su aporte de proteínas de buena calidad, así como por su funcionalidad, ya que posee propiedades bioactivas tales como antimicrobiana antioxidante, antihipertensivo, anticanceroso e inmunomodular; así mismo se ha demostrado que aislados proteicos y péptidos producidos mediante hidrólisis enzimática de las proteínas mejoran las propiedades funcionales. En la actualidad, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, en México es la tercera causa de muerte, siendo el cáncer de mama y de cérvix las de mayor incidencia entre mujeres; en el estado de Hidalgo en 2018 se reportaron 122 y 120 casos de cada uno de ellos, por lo que se buscan terapias que sean más selectivas y menos agresivas, lo cual se podría efectuar con el uso de componentes bioactivos naturales. Es por esto que en el presente trabajo se propuso como objetivo evaluar la composición fitoquímica y la acción citotóxica *in vitro* de las proteínas y péptidos obtenidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*. Por lo cual, para comprobarlo, de la harina de semillas de amaranto se realizó la extracción de las proteínas con solución reguladoras de fosfatos salino, del cual se preparó el aislado proteico mediante precipitación con sulfato de amonio, de este se prepararon péptidos <30 y >30 kDa mediante hidrólisis enzimática. Al aislado proteico y péptidos se les determinó actividad hemaglutinante, presencia de saponinas, contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante mediante las técnicas de FRAP, DPPH• y ABTS•⁺, se midió el efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama (MDA) y cervicouterino (SiHa), empleando el método de MTT y mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron los cambios estructurales en las líneas celulares.

Los resultados indicaron que las lectinas presentes en el aislado proteico aglutinaban preferentemente eritrocitos tipo AB⁺, mientras que los péptidos no reportaron actividad; las saponinas solo se encontraron en el aislado proteico causando lisis de eritrocitos, se observó la presencia de compuestos fenólicos totales, así como de taninos, antocianinas y ácido ascórbico, siendo el aislado proteico quien mostró la mayor concentración de dichos compuestos. Los ensayos de atrapamiento de radicales, indicaron que el aislado proteico y los péptidos poseen un potente efecto antioxidante, siendo mayor en el aislado proteico. El ensayo de MTT mostró que el aislado proteico logró inhibir las líneas celulares cancerosas

de MDA y SiHa de manera efectiva, obteniendo valores de DI_{50} de $59.18 \pm 12.45 \mu\text{g/mL}$ en MDA y $678 \mu\text{g/mL}$ SiHa a las 72h; observándose un severo daño en la morfología de las células tratadas. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de compuestos bioactivos pueden ser los responsables del daño observado en las líneas celulares, lo que condujo a disminuir la proliferación celular, siendo un indicativo que el aislado proteico podría tener potencial uso en la terapia contra el cáncer, sin embargo, es necesario otros estudios que lo confirmen.

Palabras clave: *Amaranthus hypochondriacus*, péptidos bioactivos, citotoxicidad, antiproliferativo, microscopía de electrónica de transmisión, anticancerígeno.

ABSTRACT

Pseudocereals have been widely recognized as a highly nutritious food that offers health benefits; due to the presence of bioactive compounds, in this group is found the amaranth, which is recognized for its high quality of proteins and functional properties; as it show antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, anticancer, and immunomodulating activity; Furthermore, protein and peptide isolates produced by enzymatic hydrolysis of proteins have been shown to improve functional properties. Currently, cancer is one of the main causes of mortality worldwide, in Mexico, it is the third cause of death, being breast and cervical cancer the highest incidence among in women. In Hidalgo State, 122 and 120 cases of each were reported in 2018, therefor more selective and less aggressive are necessary, which could be carried out with the use of natural bioactive components. The goal of this work was evaluating the phytochemical composition and the in vitro cytotoxic action of proteins and peptides obtained from *Amaranthus hypochondriacus* seed.

For this reason, it was carried out the extraction of proteins from the amaranth seed flour with saline phosphate buffer solution, the protein isolate was prepared by precipitation with ammonium sulfate, peptides were prepared (≤ 30 and >30 kDa) by enzymatic hydrolysis. Hemagglutinating activity, identification of saponins, phenolic compounds content, and antioxidant activity were determined by FRAP, DPPH• and ABTS•+ techniques, the cytotoxic effect was determinate in breast and cervical cancer (MDA, SiHa) cell lines, employing the MTT assay and transmission electronic microscopy was carried out to establish cell structure damage.

The results indicated that lectins present in the protein isolate preferentially agglutinated erythrocytes type AB+, while peptides did not report activity; saponins were only found in the protein isolate causing erythrocyte lysis, total phenolic compounds were observed, as well as tannins, anthocyanins and ascorbic acid, being the protein isolate the one that showed the highest concentration of such compounds. Radical trapping assays indicated that protein isolate and peptides have a potent antioxidant activity, being the effect on protein isolate higher. The MTT assay showed that the protein isolate inhibited the cancer cell lines of MDA and SiHa effectively, obtaining DI_{50} values of 59.18 ± 12.45 $\mu\text{g/mL}$ in MDA and 678 $\mu\text{g/mL}$ SiHa at 72h; observing severe damage in the morphology of the cells treated.

The results obtained indicated that the presence of bioactive compounds may be responsible for the damage observed in the cell lines, which led to a decrease the cell proliferation, being an indication that the protein isolate could have potential use in cancer therapy, however it is necessary other studies to confirm it.

Key words: *Amaranthus hypochondriacus*, bioactive peptides, cytotoxicity, antiproliferative, transmission electron microscopy, anticancer.

1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer de mama y cérvix son las neoplasias más frecuentes que aquejan a las mujeres, las cuales generan altas tasas de morbilidad y mortalidad; en México son diagnosticados 35.4 y 23.3 casos por 100,000 mujeres respectivamente (1); por lo que el conocimiento de la fisiopatología del cáncer ha promovido la búsqueda de nuevos agentes que trabajen en conjunto con los tratamientos de primera línea; debido principalmente a que la terapéutica farmacológica tradicional trae consigo efectos adversos no deseados. Lo que hace necesario una búsqueda de nuevas alternativas menos nocivas, más seguras y con efectividad, lo que abre nuevas posibilidades a la investigación de distintas proteínas y péptidos provenientes de fuentes naturales como los pseudo-cereales (2,3).

El *Amaranthus* es un pseudo-cereal perteneciente a la familia de las *Amaranthaceae*, que tiene aproximadamente 87 especies, distribuidas por todo el mundo, incluido México (4), ampliamente cultivado y consumido desde épocas prehispánicas (5), que ha demostrado que su consumo puede prevenir o disminuir el riesgo de desarrollar distintas enfermedades, ya que contiene compuestos bioactivos que presentan diversas actividades biológicas (6–8). Una de las especies más importante es *A. hypochondriacus*, planta que proporciona granos y hojas con alto valor nutricional, es rico en proteínas (17%) con una composición de aminoácidos cercanos al equilibrio óptimo requerido en una dieta humana (9). La harina es la materia prima para la obtención de un concentrado proteico llamado “aislado proteico”; mediante la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, este aislado proteico posteriormente se hidrolizará para obtener los péptidos (10), se ha señalado que los péptidos y algunos otros compuestos bioactivos pueden traspasar la barrera intestinal de forma intacta, llegando a ser transportados a través del sistema cardiovascular, logrando interactuar con tejidos y órganos donde ejercen sus propiedades biológicas (11,12), atribuyéndoles diferentes efectos sobre la salud incluidas propiedades: antitrombóticas, inmunomoduladoras, antioxidantes, activadoras la proteólisis mediada por ubiquitina (AUMP), inmunoestimulantes, y antihipertensivas (13,14).

Por lo que en el objetivo fue evaluar algunos de los compuestos activos (lectinas, taninos, saponinas y fenoles totales), la actividad antioxidante y el efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos de >30 kDa y <30 kDa, obtenidos a partir de la semilla de *A. hypochondriacus* en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa).

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Cáncer

El cáncer es esencialmente una enfermedad de división celular incontrolada afectando el balance que existe entre la proliferación celular y la apoptosis, el principal mecanismo de regulación para el correcto mantenimiento de la homeostasis en el organismo. Este proceso, conocido como carcinogénesis, tiene un origen multifactorial como se muestra en la Figura 1, los agentes carcinogénicos resultan en diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la célula de manera secuencial hacia una transformación maligna (15).

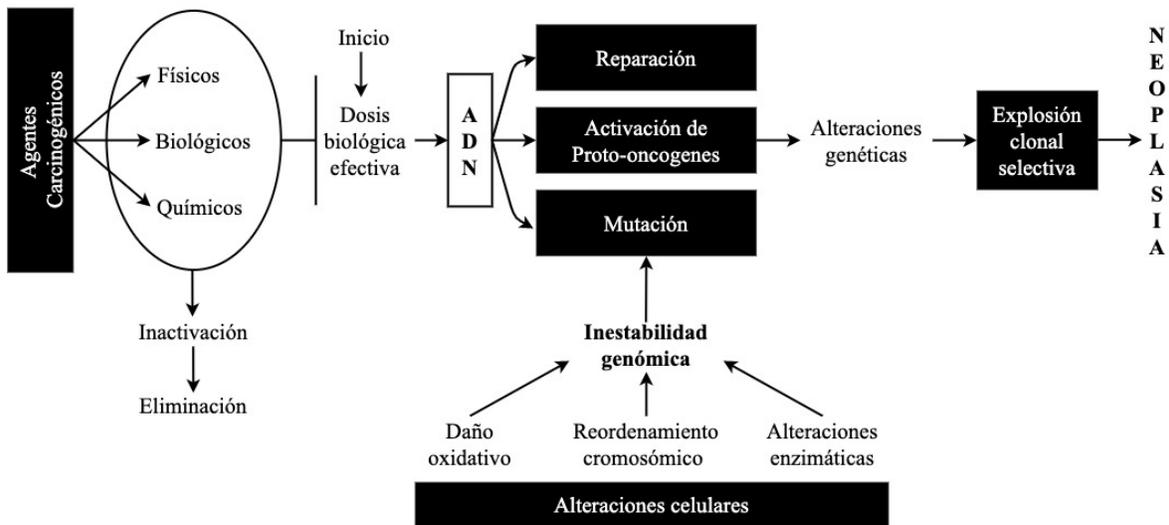


Figura 1 Etapas de la carcinogénesis (16).

Debido a lo anterior el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, ocasionando 9.5 millones de defunciones en 2018, en México 14 de cada 100 mexicanos mueren por esta enfermedad siendo la tercera causa de muerte con 82 502 defunciones registradas, en Hidalgo se registraron 1903 defunciones en 2018 (17,18).

Los tipos de cáncer con mayor incidencia son el de pulmón, hígado, estómago, colon y mama; en el caso de las mujeres el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), indicó que los tumores malignos más frecuentes en mujeres son: el cáncer de mama y cervix con altas tasas de morbilidad y mortalidad (1); y que aproximadamente el 30% de casos es debido a factores de riesgo conductuales y dietéticos (índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y alcohol) (19,20).

2.1.1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia maligna con mas incidencia entre las mujeres a nivel mundial, representa el 24.2% de todos los tipos de cáncer femeninos, según las estadísticas del Observatorio Global de Cáncer (GLOBOCAN) en el 2018, por lo que se considera la primera causa de muerte por cáncer en mujeres en países en vías de desarrollo. En México, de acuerdo a cifras de la Dirección General de Epidemiología (DGE), en 2018 se diagnosticaron 11668 nuevos casos de tumor maligno de la mama (21,22).

El cáncer de mama no es una sola enfermedad, es un grupo heterogéneo de neoplasias que pueden surgir tanto de células epiteliales lobulares como ductales, los subtipos de este cáncer se definen en función a sus perfiles moleculares e histológicos, los cuales causan variación en la presentación clínica, pronóstico y tratamiento a elegir (23).

Las causas precisas del cáncer de mamá no son claras, sin embargo, se han descubierto algunos factores que pueden aumentar el riesgo de padecerlo, como: la edad (aumenta a mayor edad), antecedentes familiares, padecer enfermedad proliferativa de la mama, mutación en los genes BRCA1 y BRCA2, menarca a edad temprana, edad avanzada en el primer embarazo, no haber recibido lactancia materna, niveles altos de testosterona y edad de la menopausia (24).

El diagnóstico se basa en un análisis clínico, junto con una serie de pruebas de imagenología: mastografía, resonancia magnética y ultrasonido. Posterior al diagnóstico se clasifica en estadios los cuales son determinados por los siguientes factores: 1) Tamaño del tumor, 2) La propagación a nodos linfáticos, 3) Metástasis a sitios lejanos, 4) La presencia de receptores de estrógeno, progesterona o Her2, y 5) la proporción de células normales/ cancerígenas en el tumor (24).

El tratamiento depende de la etapa clínica en el que es diagnosticado, el cual puede consistir en quimioterapia, radioterapia, cirugía o una combinación de estas, para los estadios I y II la cirugía conservadora de mama, y la radioterapia post-quimioterapia conforman el tratamiento de elección; en estadios más avanzados suele ser recomendada la mastectomía con quimioterapia adyuvante para atacar la enfermedad metastásica microscópica residual local o distante (24).

2.1.1.2 Cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix es un crecimiento anormal del tejido dentro del cuello uterino (porción inferior del útero), inicia con displasia de las células uterinas, este crecimiento anormal se torna hipertrófico, hiperplásico, anaplásico e invasivo hacia el tejido circundante por competencia del suministro sanguíneo mediante destrucción directa de las células contiguas (25).

La causa primaria de las lesiones precancerosas y del cáncer de cérvix es la infección vía sexual persistente o crónica por uno o más de los tipos oncogénicos del virus del papiloma humano (VPH). De los más de 200 tipos de VPH hasta ahora caracterizados, el VPH-16 es el más asociado al cáncer de cérvix seguidos por el VPH-18 y el VPH-31, como se muestra en la Figura 2, otros factores de riesgo incluyen la infección por VIH, tabaquismo, el uso de píldoras anticonceptivas por más de 5 años, historia de cáncer de cérvix en la familia, más de tres partos e inmunodepresión ligada a malnutrición u otras enfermedades sistémicas (26,27)

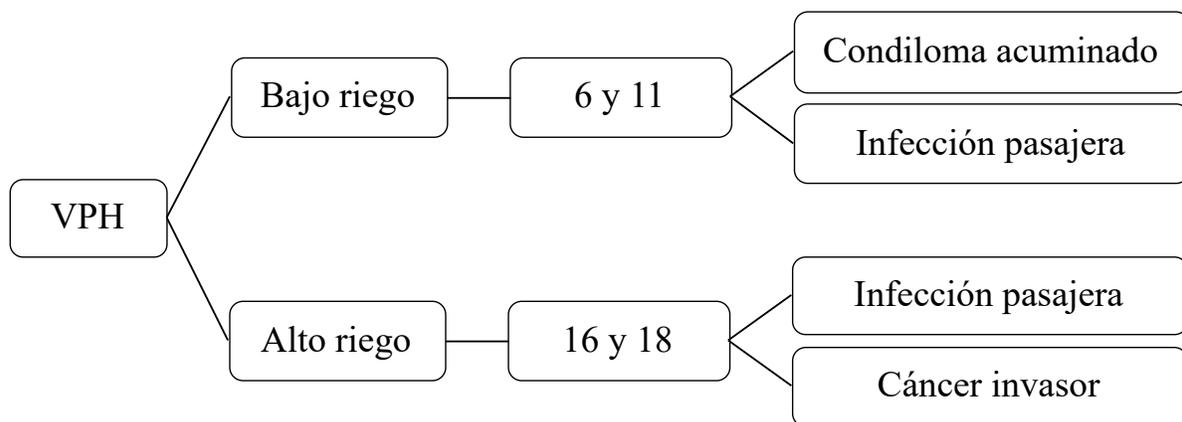


Figura 2 Clasificación de los tipos de virus por riesgo carcinogénico. (27)

Se estima que el cáncer cervical es la cuarta neoplasia maligna más común entre las mujeres alrededor del mundo, más de medio millón de mujeres fueron diagnosticadas en 2018; en México la dirección general de epidemiología (DGE) reportó 2876 nuevos casos de tumor maligno del cuello de útero en 2017 (21,22).

Los esfuerzos para la prevención y el diagnóstico temprano del cáncer de cérvix se han centrado en el tamizaje de las mujeres con riesgo de contraerlo mediante la técnica de Papanicolaou, el cual permite realizar un diagnóstico citológico de probable displasia de las células uterinas, existen otros métodos diagnósticos auxiliares como la histopatología (26,28).

Se clasifica en estadios, los cuales son determinados por dos factores: 1) Localización del tumor (se limita al cuello, se ha diseminado a tejidos circundantes, ha hecho metástasis) y 2) Tamaño, el tratamiento depende de la estratificación, el cual incluye histerectomía, radioterapia, quimioterapia y exenteración pélvica en los casos en el que el cáncer sea persistente o recurrente con un tumor limitado a pelvis (25). La cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, como se menciona anteriormente han sido durante muchos años, las terapias estándar en el tratamiento contra el cáncer, las cuales han incrementado notoriamente la supervivencia en el paciente oncológico; sin embargo, tras la cirugía se puede ocasionar un impacto negativo sobre su salud, es relativamente frecuente un estado catabólico, desarrollo de fistulas, síndrome de malabsorción; por otro lado la radioterapia, presenta una toxicidad importante en la zona radiada, que se intensifica al llevarse junto a quimioterapia ocasionado con frecuencia una malabsorción de nutrientes, una limitación de la ingesta oral y desnutrición (29).

Debido a lo previamente descrito existe una demanda constante por desarrollar coadyuvantes a los medicamentos de primera línea contra el cáncer que sean nuevos, efectivos y asequibles, lo que ha conducido a la exploración de fuentes naturales, este nuevo interés se expresa en el redescubrimiento de alimentos ancestrales considerados funcionales, como los pseudocereales; que han demostrado ser ricos en compuestos bioactivos con potencial anticancerígeno que podrían auxiliar al mejoramiento de la terapia anticancerígena evitando la resistencia y la toxicidad de los medicamentos de primera línea; presentando una nueva alternativa y valioso recurso.

2.1.2 Características de los pseudo-cereales

El American Heritage Dictionary of English define un pseudo-cereal como “cualquier planta que no pertenezca a la familia de las gramíneas pero que produzca frutos y semillas utilizados como harinas”, son plantas dicotiledóneas cuyas semillas muestran función y composición similar a la de los otros cereales (maíz, avena, centeno), entre los que se encuentran la quínoa, el trigo sarraceno y el amaranto (30).

2.1.2.1 Amaranthus

El *Amaranthus* es un pseudo-cereal (Tabla 1), originario de América Central, con gran importancia como cultivo alimenticio para las civilizaciones azteca, maya e inca (31); consta de alrededor de 87 especies distribuidas en todo el mundo se clasifican en dos tipos : El

amaranto de grano mostrado en la Figura 3 (p. Ej., *A. cruentus* L., *A. caudatus* L., *A. hybridus* L. y *A. hypochondriacus* L.) y amaranto vegetal (p. Ej., *A. tricolor* L., *A. dubius* L. y *A. lividus* L.) (32).

Tabla 1 Clasificación botánica del amaranto (33).

Clasificación	
Reino	<i>Plantae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Caryophyllidae</i>
Orden	<i>Caryphyllales</i>
Familia	<i>Amaranthaceae</i>
Género	<i>Amaranthus</i>
	Al menos 87 especies p.ej.
Especie	<i>A. Caudatus</i>
	<i>A. Cruentus</i>
	<i>A. hypochondriacus</i>

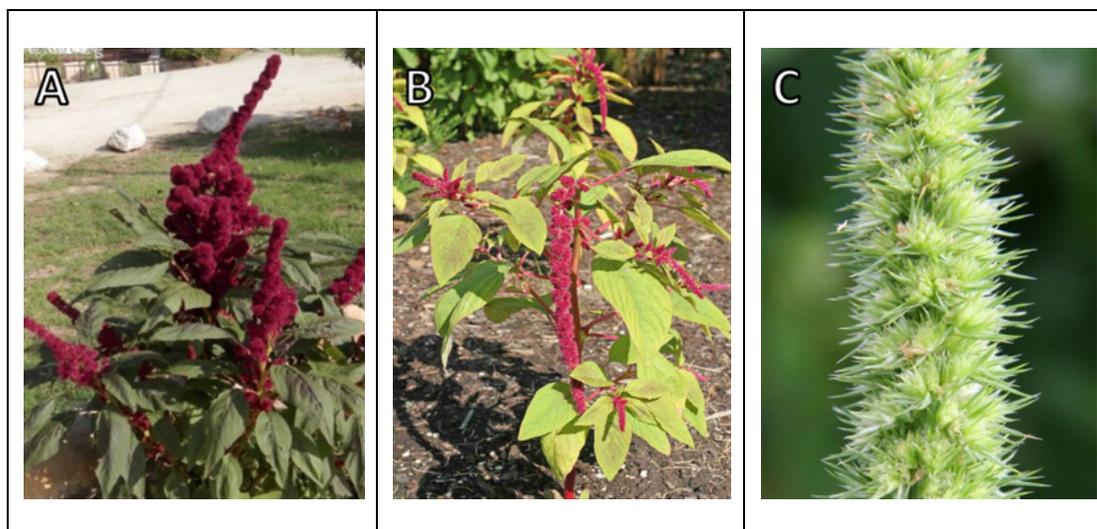


Figura 3 Especies predominantes de amaranto. A) *A. hypochondriacus* B) *A. caudatus* C) *A. cruentus*. (34)

2.1.2.1.1 Características morfológicas

El género *Amaranthus* se caracteriza por ser una planta perenne (anual) de tallos robustos, cilíndricos y fibrosos, que puede llegar a crecer de 0.3-5 m; con tonalidades diversas que van desde el verde hasta el púrpura (4) con hojas dispuestas en forma alterna y opuesta al tallo de

forma romboide, con longitud de entre 6.5-15 cm y flores son grandes dispuestas en panículos y agrupadas en inflorescencia, con coloraciones vistosas como amarillo, verde, rosado, rojo o púrpura (31,35).

El amaranto es una de las pocas plantas que puede generar tanto granos y vegetales de hoja comestibles de alta calidad nutricional, la Figura 4A muestra el fruto seco, con forma de cápsula que se abre de forma transversal dividiéndose en dos partes opérculo (superior) y urna (inferior) el cual contiene una sola semilla (35), las Figuras 4B-5C muestran que la semilla tiene una forma lenticular y llega a medir entre 0.9-1.7 mm de diámetro, y es una especie dicotiledónea; anatómicamente se componen de una cubierta o episperma, dos cotiledones, ricos en proteínas; el perisperma, una capa rica en almidón; el endosperma y la raíz. De colores que van del blanco al amarillo dorado (4,35).

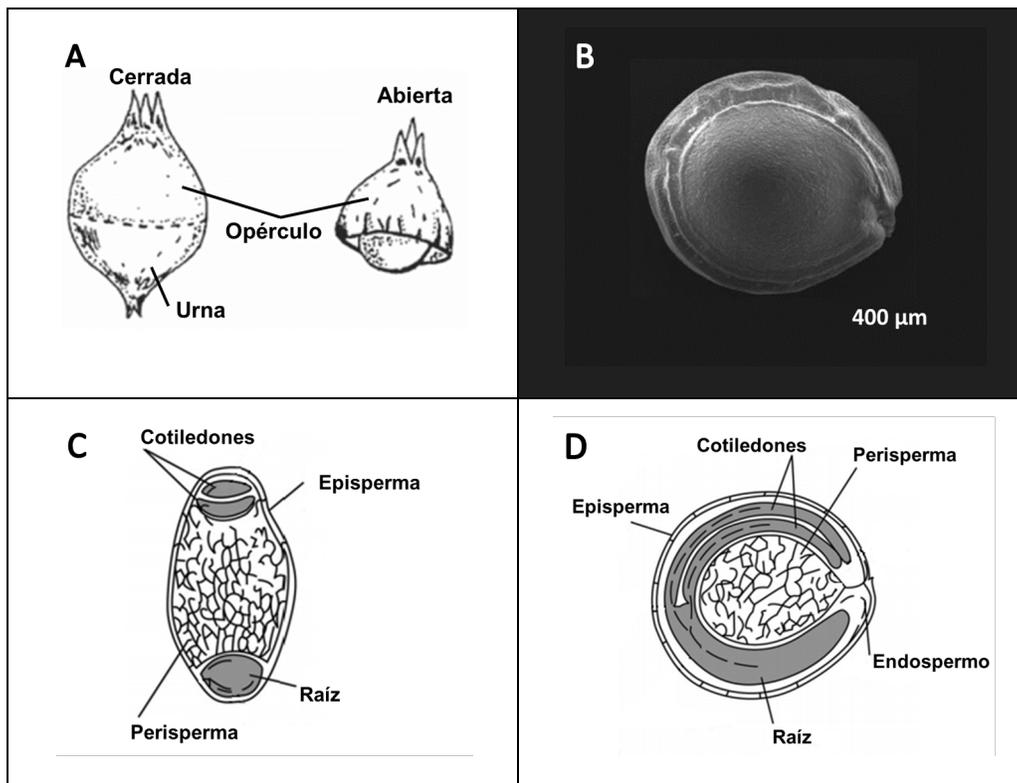


Figura 4 Fruto y semilla de amaranto. A) Fruto B) Micromorfología de la superficie de la semilla de *A. hypochondriacus* C) Sección transversal D) Sección longitudinal de la semilla de amaranto (4,35,36).

2.1.2.1.2 Composición de la semilla de amaranto

La semilla de amaranto se caracteriza por un menor contenido de almidón, mayor contenido de lípidos y proteínas en comparación a otros cereales y pseudocereales, la Tabla 2 muestra

la comparación química proximal promedio entre amaranto y otros cereales y pseudocereales (32,37).

Tabla 2 Comparación de composición proximal entre amaranto y algunos cereales y pseudocereales (32,37)

Composición	Amaranto**	Trigo*	Maíz*	Arroz*	Quínoa*
Carbohidratos	59.2	66.9	67.7	75.4	58.1
Proteína	16.6	14	10.3	8.5	15.6
Grasa	7.2	2.1	4.5	2.1	4.6
Fibra	4.1	2.6	2.3	0.9	8.9
Cenizas	3.3	1.9	1.4	1.4	2.3
Humedad	9.6	12.5	13.8	11.7	7.8

*Porcentajes en peso seco. ** Promedio de cuatro especies de *Amaranthus* (*A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*).

2.1.2.1.2.1 Carbohidratos-Almidón y Grasas

El almidón es el carbohidrato principal del grano, entre el 48-69% de su peso seco total, pero generalmente se encuentra en cantidades más bajas que en otros cereales como se muestra en la Tabla 2 (32,33) con un gránulo de almidón de tamaño pequeño (1–3 μm), y un alto contenido de amilopectina que da como resultado propiedades únicas como la excelente estabilidad ante la congelación-descongelación, temperaturas de gelatinización más altas, estabilidad de retrogradación, viscosidad, menor solubilidad o mayor capacidad de retención de agua. Estas propiedades dan una gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria (33). Su contenido de aceite, es más alto que en otros cereales como se muestra en la Tabla 2; los ácidos palmítico, oleico y linoleico son los principales ácidos grasos presentes en el aceite de amaranto, con una relación de ácidos grasos saturado/insaturado que varía de 0.12 a 0.50, contiene una cantidad considerable de escualeno (5%) comparada con otros cereales y oleaginosas (0.01-0.4 %). Sin embargo, el aceite de amaranto se produce en niveles muy bajos y a un costo muy alto en comparación de otros aceites como el de oliva, cacahuete, girasol (32).

2.1.2.1.2.2 Proteínas

Las proteínas son el segundo componente más abundante en la semilla, es la proteína como se muestra en la Tabla 2, estas juegan un papel importante en la estructura de los alimentos

a través de procesos como la emulsión y gelificación; nutricionalmente las proteínas del amaranto cuentan con un suministro alto y equilibrado de aminoácidos esenciales con alta biodisponibilidad; en la Tabla 3 se muestra la composición de aminoácidos esenciales en las diferentes especies de amaranto, donde se puede ver que el contenido de lisina (Lys) es de dos a tres veces mayor ($\bar{x} = 5.6$ g/100g de proteína) en comparación a otros cereales como el maíz, arroz o trigo (1.9, 3.8 y 2.9 g/100g de proteína) y el contenido de aminoácidos azufrados (Met y Cys: $\bar{x} = 4.5$ g/100g de proteína) es relativamente alto en comparación con otras leguminosas como la soja (3.1 g/100g de proteína) (4,32).

Tabla 3 Composición de aminoácidos esenciales en las semillas de las tres principales especies de amaranto (32).

Aminoácidos (g/100g de proteína)	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
Cisteína (Cys)	2.3	2.0-3.8	2.0-3.9
Isoleucina (Ile)	3.6-4.1	3.4-3.7	2.8-3.8
Leucina (Leu)	5.9-6.3	4.8-5.9	5.0-5.8
Lisina (Lys)	5.7-6.4	4.8-5.8	3.2-6.0
Metionina (Met)	2.4-3.3	1.8-2.6	0.6-1.6
Fenilalanina (Phe)	3.4-4.0	3.2-4.5	3.8-4.5
Treonina (Thr)	3.8	3.2-4.2	2.6-4.3
Triptófano (Trp)	1.1	n. d	1.1-4.0
Tirosina (Tyr)	2.8	2.4-4.0	3.1-4.0
Valina (Val)	4.1-4.7	3.9-4.3	3.2-4.2
Met-Cys	4.7	3.8-5.4	2.6-5.5
Phe-Tyr	6.2	5.6-8.5	6.9-8.5

Las proteínas de almacenamiento generalmente se clasifican en cuatro tipos, basándose en su solubilidad como se muestra en la Tabla 4, la distribución relativa de las proteínas de amaranto según la clasificación de Osborne muestra que la composición está más estrechamente relacionada con la mostrada por las leguminosas que por los cereales, como se muestra en la Tabla 5, por lo que las fracciones de albúminas y globulinas son las más dominantes.(38,39)

Tabla 4 Clasificación de Osborne para proteínas vegetales basándose en su solubilidad (38).

Proteína vegetal	Disolvente
Glutelinas	Ácidos o bases diluidos
Globulinas	Soluciones salinas acuosas (NaCl) (10%)
Albúminas	Agua
Prolaminas	Disolventes orgánicos

Tabla 5 Distribuciones promedio de proteínas (%) en fracciones Osborne de varios pseudocereales, cereales y legumbres. (38)

	Referencia	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas
	(40)	19	38	13	21
	(41)	51	16	2	31
Amaranto	(42)	47	19	1	29
	(43)	44	20		
	(44)	11	51	0	7
	(32)	52	16	2	31
Guisante		21	66	0	12
Arroz	(45)	11	10	12	77

2.1.2.1.2.2.1 *Albuminas*

Se han descrito dos tipos de albuminas de amaranto, obtenidas mediante una extracción de dos pasos: agua y disolución salina, la fracción proteica principal clasificada como albúmina-1, extraída de la harina con una disolución salina, seguida de una diálisis contra agua y una posterior eliminación de la globulinas por centrifugación, con un peso molecular de alrededor de 34 kDa; el segundo tipos descrito puede ser extraído con agua del residuo de harina, esta fracción es llamada albúmina-2, albúmina menor o globulina P; es llamada globulina debido a que comparten varias características con otras globulinas de amaranto como el tamaño molecular y la reactividad de la superficie, por lo que la albumina-2 es una isoforma de la globulina 11S, la estructura secundaria de las albúminas de amaranto consiste en 4% de hélices α , 37% de láminas β y 55% de estructura aperiódica. (38,46)

2.1.2.1.2.2 Globulinas

Es la fracción principal y la proteína más importante de almacenamiento, los dos tipos principales de globulinas son la 11S y 7S, la globulina 11S o amarantina consiste en 3 subunidades en forma de pro globulinas caracterizada como una proteína con 501 residuos con masa molecular de alrededor de 56 kDa organizada en dos hexámeros, cada hexámero está formado por subunidades con masa molecular entre 52 y 59 kDa, las subunidades esta conformadas por una proteína ácida (34 a 36 kDa, pI 5.6) y una proteína básica (22 a 24 kDa, pI 9.2) unidas por un enlaces disulfuro; como se mencionó anteriormente la albúmina-2 se considera una isoforma de la globulina 11s (4,38,47). La globulina 7S está presente en menor cantidad que la globulina 11S, formada por 3 subunidades principales llamadas α (57-68 kDa), α' (57-72 kDa) y β (42-52 kDa) unidas por enlaces no covalentes para formar un trímero con una masa molecular de aproximadamente 170 a 200 kDa. Cada subunidad tiene uno o dos grupos glicosilo unidos a N-terminal, esta estructura puede ser estabilizar en soluciones de alta resistencia iónica (4).

2.1.2.1.2.3 Prolaminas y Glutelinas

Las prolaminas en el amaranto son la fracción proteica con los niveles más bajos, formadas por algunos de los componentes en otras de las fracciones proteicas, con masas moleculares de 52 a 54, 33 a 34 y 22 a 27 kDa unidos por enlaces disulfuro; comparten subunidades comunes con las glutelinas, y las diferencias de solubilidad entre estas proteínas y las prolaminas se le atribuye a las diferencias en los niveles y ubicaciones de los enlaces disulfuro (38). Las glutelinas representan la segunda fracción más importante en las semillas de amaranto, compuesta por seis polipéptidos, dos con peso molecular de 55-67 kDa, dos de 35-38 kDa y los más pequeños de 22-23 kDa. Estas proteínas presentan el mayor contenido de lisina (5.9-10.2%) y de tirosina-fenilalanina (6.7-10.3%) y presentan propiedades únicas de solubilidad, pero molecularmente tienen características de globulinas (48).

2.1.2.1.3 Otros constituyentes de la semilla

2.1.2.1.3.1 Ácidos fenólicos, flavonoides y otros polifenoles

Los compuestos fenólicos presentes en el amaranto, están involucrados en la defensa de la planta contra la invasión de patógenos, incluidos bacterias, hongos y virus. Estos antioxidantes impiden o retrasan la oxidación de otras moléculas a través de la inhibición de reacciones de oxidación; evitando la catálisis de metales como hierro y cobre para evitar la

formación de radicales libres, y el daño en ADN. Se ha reportado una mayor concentración de estos compuestos es mayor en el *A. caudatus* (660,37 µg trolox/g), comparado con otros alimentos como las mora (1784 µg trolox/g), el maíz morado (4720 µg trolox/g) y el camote morado (3167 µg trolox/g), entre otros (49). Uno de los principales componentes en el amaranto es el flavonoide polifenólico rutina (quercetin-3-rutinósido) descrito por Kraujalis *et al.* (50), que es un potente antioxidante, antimicrobiano y fungicida; con valores reportados alrededor de 0.08 g/Kg en semilla y 24.5 g/Kg en hoja seca, mientras que las variedades reportadas con más rutina son *A. hybridus* y *A. cruentus* (51). Otros de los compuestos antioxidantes reportados en diferentes extractos de la planta de amaranto son: fitoesteroles, antocianinas, fenoles, betacianinas, betaxantinas, nicotiflorina, isoquercetina, ácido 4-hydroxybenzoico, ácido *p*-cumárico, vitamina C, neoxantina, violaxantina, luteína, alfa y beta carotenos (52). Tufts *et al.* (53) describieron una actividad inhibitoria de TNF-alfa debida a los compuestos antioxidantes y anti inflamatoria en las hojas de la variedad *A. dubius*.

2.1.2.1.3.2 Compuestos antinutricionales

El término antinutricional se utiliza para describir aquellos compuestos que afectan el valor nutricional de los alimentos, especialmente las semillas, pues dificultan o inhiben la asimilación de nutrientes; estos compuestos son de naturaleza variada y pueden llegar a ser tóxicos o causar efectos fisiológicos (afectaciones pancreáticas o aglutinación de glóbulos rojos entre otras). Estos compuestos son sustancias naturales no fibrosas, generadas por el metabolismo de defensa de las plantas (54).

2.1.2.1.3.2.1 Ácido fítico

El ácido fítico (mioinositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato), es la principal forma de almacenamiento de fósforo que comprende del 1-5% de peso en los cereales, representan del 50-85% del fósforo total en las plantas, se acumula en las semillas durante el periodo de maduración, concentrándose en el salvado. Este se une a los minerales y los hace no disponibles debido a sus propiedades quelantes, inhibiendo la absorción intestinal y biodisponibilidad de hierro, zinc, calcio magnesio y manganeso, además interactúan con los residuos básicos de la proteína formando complejos, proteína-fitato y proteína-fitatomineral, por lo que muchas reacciones enzimáticas a nivel digestivo se paralizan. Egli *et al.* (55) reportaron que la cantidad de ácido fítico en el amaranto es mayor que en otros cereales (56).

2.1.2.1.3.2.2 *Lectinas*

Compuesto perteneciente a un grupo variado de proteínas, conocido como hemaglutinas; las lectinas vegetales se presentan frecuentemente en forma de glicoproteínas, cuyo mecanismo de acción consiste en combinarse con las glicoproteínas de las membranas celulares aglutinándolas o coagulándolas; su mecanismo de acción es resultado de su alta especificidad para reconocer los carbohidratos sobre la superficie del intestino delgado, causando daños en la pared intestinal afectando los procesos de absorción y transporte a través de ella (54). Las Amarantinas son las lectinas presentes en el amaranto, se considera una de las familias de lectinas de plantas más pequeñas; la primera lectina de la familia de Amarantina se purificó a partir de las semillas de *A. caudatus*, la aglutinina de éstas semillas es una proteína homodimérica de 66 kDa describiendo dos sitios de unión a carbohidratos (57).

2.1.2.1.3.2.3 *Saponinas*

Son compuestos con una estructura compleja formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos, son glucósidos que le atribuyen su sabor amargo a las semillas. Las saponinas bajan la tensión superficial, poseen propiedades emulsificantes y tiene efectos hemolizantes en glóbulos rojos. Su actividad hemolítica, antilipidémica y su capacidad de reducir los niveles de colesterol en el suero, son algunas de sus características más importantes (54).

Las saponinas del amaranto son un grupo de glucósidos de alto peso molecular, formados por una o más cadenas carbohidratadas y una aglicona denominada sapogenina, se han aislado 7 saponinas triterpenoicas de la semilla de *A. caudatus* (58). En *A. cruentus* se demostró que la concentración total de saponinas en las semillas era de 0.09-0.1%, y se concluyó que los bajos contenidos de saponinas en las semillas de amaranto relativamente baja para generar toxicidad (59).

2.1.2.1.3.2.4 *Taninos (TN)*

Son compuestos polifenólicos de gran peso molecular y un gran número de grupos hidroxilos, clasificados en hidrolizables (gálicos) y condensados (catéquicos), son compuestos contruidos por un núcleo que contiene un glúcido, que a la vez posee grupos hidroxilos; mientras que los taninos condensados son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles. Estos se pueden unir a enzimas, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas y formar complejos con el hierro, inhibiendo las enzimas digestivas y formar

complejos con membranas mucosas provocando daños en las mismas. Los complejos taninos-proteína son insolubles y esto disminuye la digestibilidad proteica, además reducen la biodisponibilidad de vitamina B12, destruye la vitamina B1 y disminuye las reservas de vitamina A (54,60). Estos compuestos se localizan principalmente en la testa y en los cotiledones, en la semilla germinada o reventada contiene mayores cantidades de taninos, esto se debe a la formación de pigmentos debido a reacciones químicas y bioquímicas (54). El contenido reportado por Becker *et al.* (61), del promedio de diez especies de amaranto tiene un rango muy amplio de 0.4 a 5.2 mg/g; esto puede deberse a las diferencias entre las variedades y la forma de cultivo. Estudios recientes reportan valores de $0.06 \pm .11\%$ en peso seco para *A. hypochondriacus* y $0.12 \pm .04\%$ para *A. cruentus* (62).

2.2 *Antecedentes de problema*

El desarrollo de tratamientos con compuestos naturales y seguros como las proteínas alimentarias (aislados, hidrolizados o péptidos) han reportado propiedades nutricionales como diversas funciones biológicas.

Las proteínas provenientes de cereales o pseudo-cereales pueden ser extraídas y procesadas para obtener aislados proteicos y mediante una hidrólisis enzimática los péptidos bioactivos que están inactivos dentro de las secuencias proteicas, y pueden liberarse (63), la estructura de estos péptidos proporciona las bases moleculares sobre su funcionalidad y su capacidad de ejercer su actividad biológica, estas propiedades no solo dependen de la secuencias primarias de las proteínas, sino también de su conformación (64). El uso de proteínas alimentarias ha aumentado debido a su alto valor nutricional, su funcionalidad y su bajo contenido de factores antinutricionales (65).

2.2.1 *Hidrólisis enzimática*

Los hidrolizados proteicos se definen como una mezcla compleja de oligopeptidos, péptidos y aminoácidos libres que se producen por hidrólisis parciales o extensas; mientras que los péptidos bioactivos se definen como aquellos con propiedades farmacológicas beneficiosas (63), la hidrólisis *in vitro* utiliza enzimas proteolíticas, este es el proceso más usado para la obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades biológicas (66); debido a las condiciones específicas requeridas (pH 6.0-8.0; temperaturas 40-60 °C), los hidrolizados y péptidos obtenidos con proteasas específicas son reproducibles y no involucran solventes orgánicos o químicos tóxicos, por lo que es adecuada para la industria alimentaria y farmacéutica (67).

La especificidad de las proteasas utilizadas para la hidrólisis afecta la longitud, la composición y la secuencia de los aminoácidos, lo que influye en la actividad biológica de los péptidos, por lo que un tratamiento con diferentes proteasas, que muestran diferentes tipos de especificidad, y generan varios tipos de hidrolizados, con una mezcla de aminoácidos libres, oligopéptidos de alto y mediano peso molecular y péptidos cortos con diferentes secuencias de aminoácidos. Las proteasas de menor especificidad producen péptidos más cortos que las proteasas de mayor especificidad (63).

2.2.1.1 Enzimas proteolíticas

Las enzimas proteolíticas como se muestra en la Tabla 6, son clasificadas por su origen (plantas, animales y de fuentes microbianas), su sitio catalítico (aminoácidos) y modo de acción (endo- o exo- actividad) (63).

Tabla 6 Enzimas proteolíticas (68)

Tipo	Origen	Nombre	Fuente	Temp (°C)	pH	Sitio de acción catalítica
Serinproteasa		Tripsina		30-60	7-9	-*Lis (o Arg)
	Animal	Quimotripsina	Porcino y Bovino	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu)
		Elastasa			6-8	-*Ala
	Bacteriana	Alcalasa Subtilisina Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	Aminoácidos aromáticos e hidrófobos
Cisteinproteasas		Papaína	Papaya	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)
	Plantas	Bromelaina	Piña	20-65	5-8	Aahf -
		Ficina	Látex de <i>Ficus</i>		5-8	

Tabla 6 Enzimas proteolíticas -cont. (68).

Tipo	Origen	Nombre	Fuente	Temp (°C)	pH	Sitio de acción catalítica
Aspartato proteasas	Animal	Pepsina	Porcino y Bovino		1-4	-Fe (o Tir, Leu)
		Quimosina			4-6	-*Trp (o Fe, Tir)
	Fúngica	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *-Similar a la pepsina
		Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40-50	3-6	
Metalo proteasa	Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
	Bacteriana	Neutrasa	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7	-Fe, Leu, Val*---
Preparaciones enzimáticas		Papaína cruda	Papaya		5-9	
		Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30-80	7-9	Amplia especificidad
		Veron P, Sumicina LP, Bocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	
		Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	

2.2.1.2 Obtención de péptidos

Los péptidos, pueden exhibir funciones biológicas deseadas, pero se encuentran en bajas concentración dentro del hidrolizado por lo que el fraccionamiento y concentración es esencial. Existen varios métodos para aislar los péptidos, como la cromatografía líquida o la ultrafiltración en la que se emplean diferentes tipos de membranas (membranas de corte en peso molecular (MWCO)); estos métodos logran un separación en función de parámetros fisicoquímicos como el tamaño molecular, hidrofobicidad o carga (63). El método de ultrafiltración se emplea para obtener hidrolizados de proteínas enriquecidos con péptidos de peso específico. Las membranas con alto MWCO (20–100 kDa), están adaptadas para separar péptidos y proteínas no hidrolizadas o enzimas de proteólisis, mientras que las membranas de ultrafiltración con MWCO intermedio o bajo se aplican principalmente para el fraccionamiento de péptidos; las fracciones obtenidas representan una mezcla entre moléculas activas e inactivas con pesos moleculares similares (69).

2.2.2 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos se han definido como fragmentos de proteínas específicas, como se muestra en la Figura 5, que pueden actuar como moduladores fisiológicos del metabolismo (70,71), la bioactividad específica de los péptidos depende principalmente de sus propiedades estructurales, como la longitud de la cadena y características fisicoquímicas, como la hidrofobicidad y carga molecular (72,73).

No obstante, se debe tener en cuenta lo siguiente:

1. Para ser considerado “bioactivos”, un componente dietético debe tener un efecto biológico medible a un nivel fisiológico (71);
2. La “bioactividad” evaluada debe tener el potencial de afectar la salud de manera beneficiosa, excluyendo los efectos potencialmente dañinos como toxicidad, alergenicidad y mutagenicidad (71).

Se ha demostrado que los alimentos de origen animal y vegetal son fuentes importantes de péptidos bioactivos. Las fuentes vegetales incluyen los cereales (trigo, cebada, arroz), pseudocereales (quínoa y amaranto) o las legumbres (soya, frijol, guisante). La presencia de los péptidos bioactivos aumenta el valor de la calidad de las proteínas de los alimentos (3).

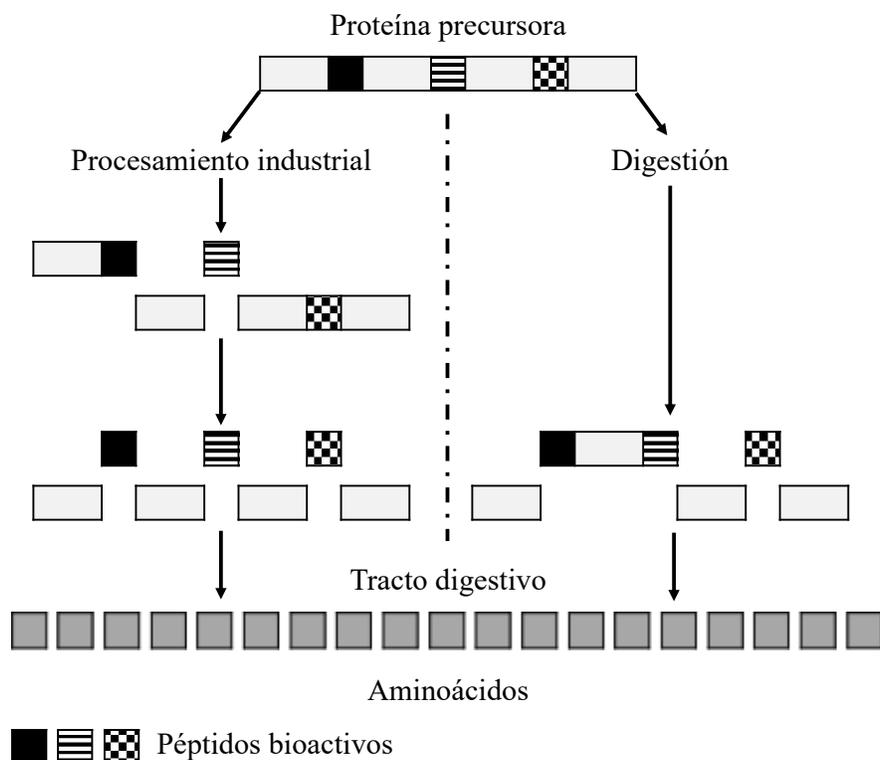


Figura 5 Esquema de liberación de péptidos bioactivos a partir de proteína precursora (71).

2.2.2.1 Péptidos bioactivos en la semilla de amaranto

Además de los componentes nutricionales, las semillas de amaranto también contienen sustancias que desempeñan diversas funciones biológicas, la semilla de amaranto contiene el péptido similar a la lunasina (encontrado previamente en la soya), este péptido y la fracción proteica de las glutelinas tienen una concentración relativamente alta de ácido aspártico; lo que ha sugerido que las regiones ácidas puedan estar relacionadas con un epítipo de lunasina en las fracciones proteicas de la semilla (14,74). La fracción proteica de las glutelinas hidrolizada con tripsina demostraron actividad apoptótica contra células cancerosas cervicales (HeLa); el análisis *in silico* reveló que los péptidos más frecuentes en el amaranto son antihipertensivos especialmente en la proteína globular 11S mostrando un potencial para inhibir la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) reduciendo la presión arterial (75); en las fracción de las glutelinas se han descrito péptidos con actividades biológicas como antiinflamatorias o inhibidores de dipeptidil aminopeptidasa (DPP) IV enzima clave en la activación de hormonas controladoras de la liberación de insulina por las células endocrinas (76–78).

2.2.2.2 Actividades biológicas de los péptidos bioactivos

2.2.2.2.1 Efecto anticancerígeno/antiproliferativa

Diferentes péptidos bioactivos han demostrado efectos antiproliferativos en diferentes modelos cancerosos, entre los péptidos anticancerígenos la lunasina es uno de los más reportados; es un péptido de 43 aminoácidos encontrado en primer lugar en la soya y posteriormente en otros cereales y pseudocereales como el trigo, cebada, arroz, centeno y amaranto (14,74,79); la lunasina se caracteriza por una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), seguida de ocho residuos de Asp (D) en su extremo carboxil, demostrado que la secuencia RDG es responsable de la adhesión a la matriz extracelular, mientras que la secuencia de aspartatos es la clave en la unión a cromatina, la primera evidencia sobre su efecto antiproliferativo fue reportada por Gálvez y de Lumen en donde transfretaron *E. coli* con ADNc codificador de lunasina que mostró el arresto en mitosis; además el gen de la lunasina se transfectó en células de cáncer causando la detención de la división celular, la fragmentación cromosómica y la lisis celular (80). En los fibroblastos de ratón, un tratamiento con lunasina 100 nM inhibió la transformación en focos cancerosos inducidos por carcinógenos químicos como el 3-metilcolantreno (MCA); adicionalmente demostró la acetilación de histonas H3 y H4 en células de cáncer de mama (MCF-7) y en un modelo de cáncer de piel de ratón (SENCAR) una aplicación tópica de lunasina (250 µg/semana) redujo la incidencia de tumor de piel inducida por 7,12-dimetilbenz (a) antraceno (DMBA) aproximadamente un 70% (81).

Se ha demostrado que la lunasina inhibe la acetilación de la histona H3, los genes supresores de tumores p53 y Rb, activan la histona desacetilasa para suprimir los genes implicados en la carcinogénesis, por el contrario los oncogenes virales como el virus del papiloma humano (VPH) actúan interrumpiendo la interacción entre las histonas desacetilasas y p53 o Rb, lo que da como resultado la activación de la proliferación celular de las células transformadas; por lo que se propone un mecanismo de que la lunasina se une a las histonas desacetilasas actuando como supresor tumoral explicando la capacidad de la lunasina de inhibir la proliferación celular de células transformadas (79,82).

Otro modelo propuesto para explicar la actividad quimiopreventiva de lunasina, es la citotoxicidad (IC₅₀ 14 µM) en células leucémicas (L1210), demostrando además una detención del ciclo celular en la fase G2/M como la apoptosis a través de la activación de la

caspasa-3 de una manera dependiente de la dosis (83), otro estudio en células de cáncer de colon (HT29) con concentraciones de lunasina de 10-50 μM indujo apoptosis por medio de la activación de caspasa-3 por una vías mitocondriales apoptóticas (84).

Aunque la lunasina es uno de los péptidos con más reportes de actividad anticancerígena, otras moléculas han sido aisladas de leguminosas y cereales con actividades anticancerígenas reportadas.

Kannan *et al.* (85), aislaron un pentapéptido del salvado de arroz resistente al jugo gastrointestinal con una secuencia (Glu-Gln-Arg-Pro-Arg) que en concentraciones de 600-700 mg/mL, causó una inhibición del 84% en el crecimiento de las células de cáncer de colon (Caco-2 y HCT-116), el 80% en el crecimiento de las células de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y 84 % de crecimiento de células de cáncer de hígado (HepG-2).

Otro grupo significativo de proteínas bioactivos presentes en muchos cereales, pseudocereales y leguminosas son las lectinas, la propiedad más reportada sobre las lectinas es la capacidad de aglutinar la células debido a su unión a residuos de carbohidratos específicos en la superficie celular (86), las lectinas de soya y otras leguminosas sobreviven a través de la digestión en el tracto gastrointestinal, estas interfieren con la absorción de nutrientes y se ha reportado que ingresan en la circulación sistémica (87), por lo que las lectinas se consideran como un factor antinutricional (88); Liner (89), demostró que la lectina de soya podría inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de rata mientras que Boland *et al.* (90) demostraron que estas mismas lectinas mejoraron la esperanza de vida en un modelo de ratón con linfoma y García-Gasca *et al.* (91) demostraron que las lectinas, de *Phaseolus acutifolius*, exhibían un efecto antiproliferativo diferencial en células no transformadas y en diferentes líneas celulares de cáncer.

2.2.2.2.2 Propiedades anti-inflamatorias

Otra de las propiedades reportada para los péptidos bioactivos es la modulación de los procesos inflamatorios, Día *et al.* (92) purificaron tres péptidos similares a la lunasina de la harina de soya, se trató la línea celular de macrófagos RAW 264.7 inducida por lipopolisacárido (LPS) con lunasina (100 μM) resultando en la inhibición de biomarcadores pro inflamatorios como la producción de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1beta (IL-1 β), activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B), expresión de ciclooxygenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y producción de prostaglandina E2; reportando que

los efectos sobre las vías de transducción de las señales inflamatorias se debió a la inhibición de la translocación nuclear de las subunidades p65, p50 y NF- κ B.

2.2.2.2.3 *Propiedades protectoras cardiovasculares*

Algunos péptidos bioactivos derivados de los cereales ejercen un efecto antihipertensivo al inhibir la enzima convertidora de angiotensina I (ECA). Quiroga *et al.* (93) hidrolizó mediante la enzima alcalasa péptidos entre 1.355 y 0.179 kDa derivados de *A. hypochondriacus* que probaron inhibir la renina en un efecto dosis-respuesta relacionado con la hidrofobicidad del péptido; mientras Vilcacundo *et al.* (94) mostraron que tres péptidos (FLISCLL, SVFDEELS y DFIILE) hidrolizados mediante pancreatina de *A. caudatus* mostraron actividad inhibidora de ECA; al igual que Matsui *et al.* (95) que identificaron un péptido (Ile-Val-Tyr) hidrolizado de germen de trigo por la proteasa alcalasa con actividad inhibidora de ECA; por otro lado Motoi *et al.* (96) identificaron un péptido hidrolizado por la proteasa ácida gliadina (Ile-Ala-Pro) con actividad inhibidora de ECA del germen de trigo; los efectos del péptido Ile-Ala-Pro se evaluaron en ratas hipertensas al aplicar una inyección intraperitoneal, disminuyó la presión arterial sistólica. Otro de los péptidos a partir de proteínas de arroz hidrolizados por alcalasas (Thr-Gln-Val-Try), con una metodología similar obtuvieron resultados de disminución de la actividad inhibidora de ECA (97).

Además de los efectos hipotensores e inhibidores de la ECA descritos para la protección cardiovascular de los péptidos bioactivos de soya y trigo han reportado un efecto reductor de colesterol y lípidos. Pak *et al.* (98) reportaron un péptido (Ile-Ala-Val-Pro-Gly-Glu-Val-Ala) aislado de la fracción de las globulinas de soya hidrolizada con pepsina, ejerció un efecto hipocolesterolémico al unir las sales biliares y reducir la absorción de colesterol y la reabsorción de sales biliares; Ferreira Ede *et al.* (99) suplementaron β -conglucina (globulina 7S) de soya durante 28 días (200 mg/día) redujo tanto el colesterol y los triglicéridos en plasma como la proporción de lipoproteínas de baja densidad/alta densidad (LDL / HDL).

2.2.2.2.4 *Propiedades antioxidantes*

El estrés oxidativo es un factor importante en la progresión de varias enfermedades crónicas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden dañar todas las macromoléculas, como los lípidos, las proteínas y el ADN. Los péptidos antioxidantes obtenidos por hidrólisis mostraron que algunos aminoácidos como His, Trp, Tyr y Lys tienen propiedades antioxidantes mientras que los aminoácidos básicos (Arg, His y Lys) pueden quelar los iones

metálicos (100); Medina *et al.* (101) demostraron que Val y Leu cuando se encuentran en el N-terminal y Tyr y Trp en el C-terminal ejercen propiedades antioxidantes, Chen *et al.* (102) analizaron el efecto antioxidante de 28 péptidos sintéticos diseñados a partir del péptido antioxidante Leu-Leu-Pro-His-His que se encuentra en la soya, demostrando que la combinación de los aminoácidos Pro-His-His demostraban mayor actividad antioxidante; en estudios *in vitro* se ha evaluado la actividad antioxidante de péptidos de germen de trigo mediante los ensayos de 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH), superóxido, hidroxilo, eliminación de radicales, poder reductor de iones ferrosos y actividad quelante, demostrando que la actividad antioxidante es comparable al α -tocoferol (control); la actividad antioxidante también se confirmó en péptidos de trigo, guisante y soya (103,104)

Jeong *et al.* (105) reportaron las propiedades antioxidantes de la lunasina demostrando que es capaz de quelar iones de Fe^{2+} , evitando la formación de radicales hidroxilo, así como estudios *in vitro* demostraron que la lunasina elimina los radicales peroxilo y superóxido, también se demostró que es capaz de proteger las defensas antioxidantes de células epiteliales colorectales de adenocarcinoma (Caco-2) tratadas con peróxido de hidrógeno y hidroperóxido de terc-butilo con concentraciones fisiológicas de lunasina (0.5–25 μ M por 24 h) (106).

2.2.2.2.5 Propiedades antimicrobianas

Los péptidos antimicrobianos son moléculas muy diversas, que pueden dividirse en cuatro grupos en función de las características estructurales: péptidos α -helicoidales, β -hoja, extendidos y de bucle. La mayoría de los AMP comparten un carácter anfipático con una carga neta positiva y un alto contenido de residuos hidrófobos (107). Moyer *et al.* (108) describieron un peptido de 1.7 kDa (Atr-AMP) rico en prolamina derivado de *A. tricolor* con actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* lo que demuestra su actividad contra especies bacterianas gram negativas y positivas.

3 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

El cáncer sigue siendo una de las enfermedades que más muertes causa en el mundo, México reportó 9.5 millones de casos en 2018. El cáncer es causado por un crecimiento celular anormal de manera descontrolada, con la capacidad de invadir otros tejidos, lo que lleva a la formación de masas tumorales, neo-vascularización (angiogénesis) y metástasis. El cáncer de mama, colorrectal, de pulmón y de cérvix son las formas más diagnosticadas de esta enfermedad entre mujeres (18,21,109).

Actualmente los tratamientos utilizados varían y dependen de factores como: el tipo, la localización y la extensión de la enfermedad, así como del estado de salud del paciente. Son diseñados para matar/eliminar las células cancerígenas o para producir eventualmente su muerte al privarlas de las señales celulares necesarias para su división celular. Los tratamientos generales disponibles son: radioterapia, quimioterapia y la resección quirúrgica. En la mayoría de los casos se aplican diferentes opciones de tratamiento, pero ninguna es completamente eficaz al ser incapaz de focalizar su efecto lo que genera un daño en tejido circundante (24,25,110).

Debido a los efectos devastadores del cáncer, así como las limitantes de los tratamientos, existe la necesidad de evaluar el efecto citotóxico, de proteínas alimentarias derivadas de pseudocereales, sobre la viabilidad, supervivencia y muerte de células tumorales, con el fin de encontrar diferentes y mejores alternativas de tratamiento. El amaranto es una planta dicotiledónea clasificada como pseudocereal, que produce semillas con un contenido proteico de alta calidad, y compuestos promotores de salud, considerada como una planta “biofarmacéutica natural”, que podría aportar métodos seguros y efectivos contra algunas enfermedades (74,111).

Por lo que la presente investigación se plantea si; **¿Las proteínas y los péptidos que se obtienen a partir de la semilla de la especie *Amaranthus hypochondriacus* lograrán generar un efecto citotóxico en las líneas celulares cancerígenas de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa)?**

4 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha progresado en la comprensión de la etiología del cáncer; sin embargo a pesar de este progreso, el cáncer continúa aumentando en el mundo debido, en parte a sus características metastásicas, altas tasas de replicación y su capacidad de adaptación escapando del sistema inmune con diversas acciones. Los tratamientos actuales contra el cáncer presentan toxicidad sistémica y muerte no equitativa de células cancerosas, causando una gran variedad de efectos secundarios. Debido a estas limitaciones existe una necesidad de encontrar tratamientos alternativos menos agresivos y más selectivos, entre estas alternativas, se encuentra el uso de alimentos que contengan compuestos bioactivos que en sinergia con los tratamientos actuales generen mejores resultados.

El presente estudio pretende enfatizar que las proteínas y péptidos bioactivos presentes en las semillas de *A. hypochondriacus* demostrarán ser un agente promotor de salud que protejan contra el desarrollo de cáncer, exaltando sus propiedades como el breve marco de tiempo de interacción, baja toxicidad, alta especificidad y buena solubilidad, que lo haga una opción estratégica en el tratamiento como anticancerígeno y que ayude ante las deficiencias presentes en las terapias actuales, así como también ampliando la comprensión del efecto de estos péptidos sobre las células cancerígenas, para lograr una mejora en la supervivencia y en la calidad de vida de los pacientes diagnosticadas con esta enfermedad.

5 HIPÓTESIS

El aislado proteico y los péptidos bioactivos de las semillas de la especie *A. hypochondriacus* demostrarán efecto anticancerígeno en las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cérvix (SiHa).

6 OBJETIVO(S)

6.1 General

Evaluar el efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y de los péptidos bioactivos obtenidos de las semillas *A. hypochondriacus* en líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa).

6.2 Específicos

1. Obtener apartir de la semilla de *A. hypochondriacus* un aislado proteico; preparar y separar los péptidos a partir del aislado proteico mediante hidrólisis enzimática y ultrafiltración.
2. Evaluar la actividad hemaglutinante y hemolítica presente en el aislado proteico y péptidos bioactivos de la semilla de *A. hypochondriacus*.
3. Cuantificar el contenido de compuestos de origen fenólico presentes en el aislado proteico y péptidos bioactivos de la semilla de *A. hypochondriacus*.
4. Evaluar la actividad antioxidante en presente en el aislado proteico y péptidos bioactivos de la semilla de *A. hypochondriacus*.
5. Evaluar la citotoxicidad y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos en líneas celulares MDA-MB-231 y SiHa.
6. Identificar los cambios morfológicos de las células MDA-MB-231 y SiHa inducidos por el compuesto que presente mayor efecto citotóxico en las líneas celulares, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Ensayo experimental *in vitro* con diseño longitudinal prospectivo.

7.2 Evaluación de protocolo por el comité de ética

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con el numero CEEI-000011-2019 (Anexo 16.2)

7.3 Diagrama de diseño experimental

7.3.1 Extracción de proteínas

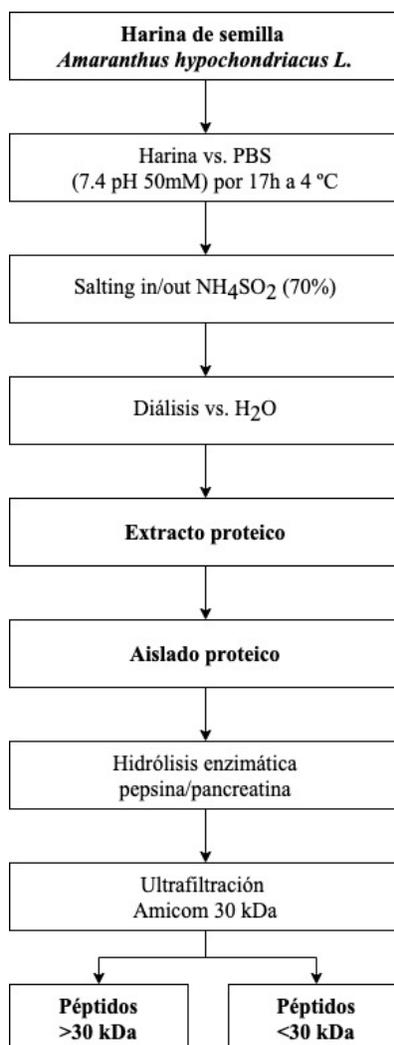


Figura 6 Esquema metodológico de la separación de péptidos a partir de la semilla de *A. hypochondriacus*.

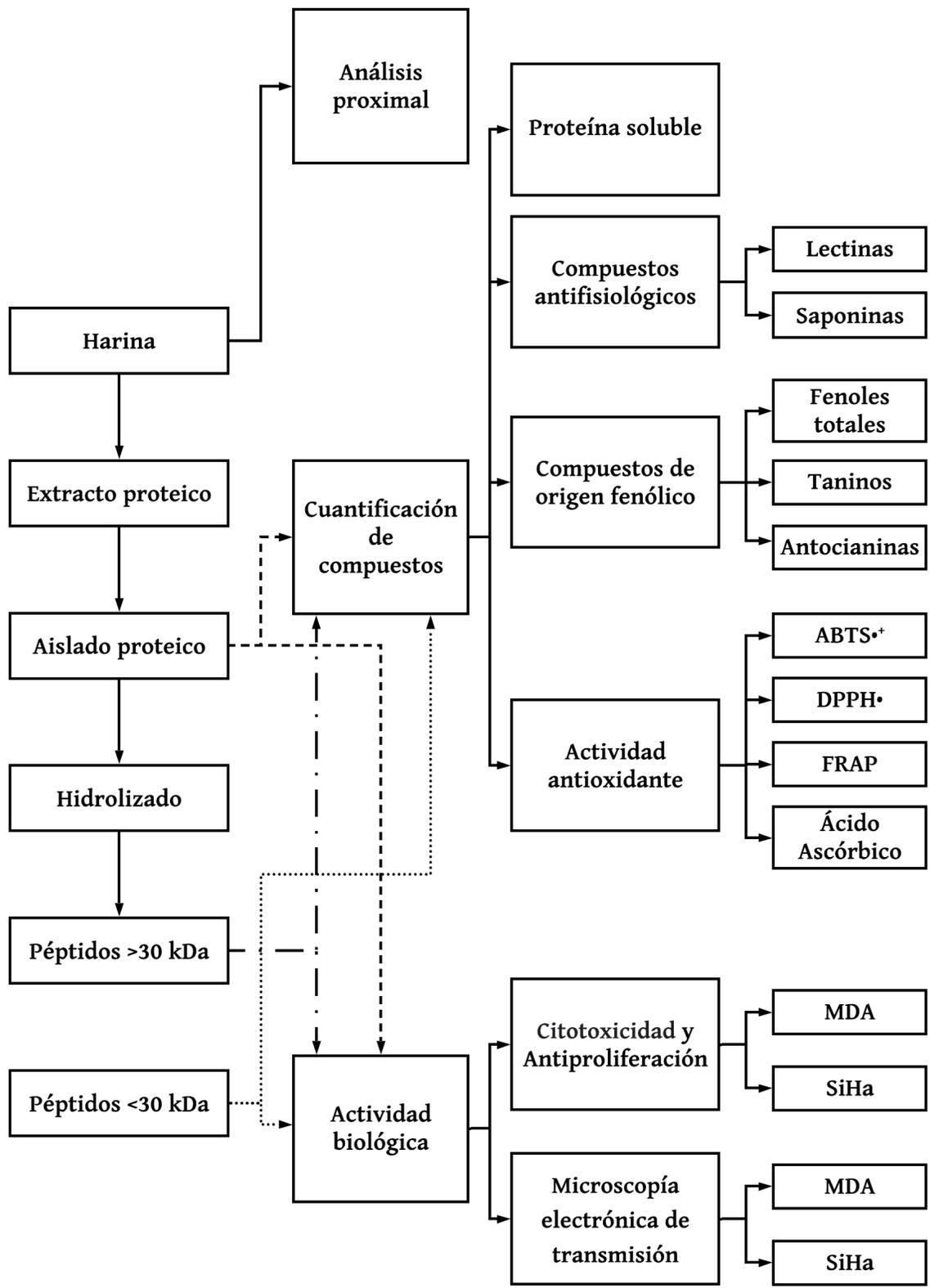


Figura 7 Esquema metodológico.

— Harina - - - Aislado proteico - . - - Péptidos >30 kDa Peptidos <30 kDa

8 METODOLOGÍA

8.1 *Material vegetal*

Las semillas de amaranto (*A. hypochondriacus*) se adquirieron de un productor local del Estado de México, las semillas provienen del mismo lote, se limpiaron manualmente retirando materia extraña, granos dañados y se almacenaron a temperatura ambiente.

8.2 *Preparación de muestra*

8.2.1 *Harina*

Antes de cada prueba se molió la cantidad necesaria de harina en un molino de granos (Molino seco IKA A10) y tamizado en una malla del #60.

8.2.2 *Extracto-Aislado proteico*

8.2.2.1 *Precipitación de proteínas con sulfato de amonio*

De la harina previamente preparada; se extrajeron las proteínas con una solución reguladora de fosfato salino (PBS) a una concentración de 0.01 M y pH de 7.4, en una relación 1:10, la mezcla se agitó durante 16-18 h a 4 °C, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/60 min; al sobrenadante se le añadió sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 70% a 4 °C; a continuación la proteína precipitada fue recuperada mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 60 min a 4°C; el precipitado obtenido fue resuspendido en PBS y se sometió a diálisis contra H_2O con tres cambios durante 24 h a 4 °C, obteniendo el extracto proteico seguido de una liofilización (112).

8.2.2.2 *Liofilización*

La liofilización se basa en el fenómeno físico de la sublimación del agua presente; el extracto proteico se colocó en contenedores de 10 mL y se liofilizo en una liofilizadora (Labconco Corporation); con las siguientes condiciones: temperatura del condensador: -52 °C, vacío: 0.045 mbar, velocidad de congelación: -36 °C; y temperatura final de secado de entre 25 y 31°C por 72 h, obteniendo el aislado proteico (113).

8.2.3 *Fracciones peptídicas*

8.2.3.1 *Hidrolisis enzimática*

Se realizó un tratamiento enzimático secuencial con pepsina y pancreatina descrito por Mora-Escobedo (114), tomándose 2.5g de aislado proteico y 50 mL de agua destilada ajustando el

pH a 2 con HCl (1.0 N). La muestra se hidrolizó con 100 mg de pepsina por 60 min a 37 °C en agitación constante, posteriormente se ajustó el pH a 5.3 con NaHCO₃ (0.9 M) adicionándole 100 mg de pancreatina una vez disuelta se ajustó nuevamente el pH a 7.5 con NaOH (1 N), dejándose en constante agitación por 120 min a 37 °C; para detener la hidrólisis la muestra se colocó en un baño a por 5 min a temperatura de ebullición.

El hidrolizado se almacenó a 4 °C, pasadas 24 h la muestra se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min y se prosigue al protocolo de ultrafiltración para la separación de las fracciones peptídicas (114).

8.2.3.2 Ultrafiltración

El sobrenadante con las fracciones solubles de la muestra se colocó en una celda de ultrafiltración equipada con un agitador magnético (Amicon 8050 de 50 mL, Millipore). Se usó una membrana de celulosa con un límite de peso molecular (MWCO) de 30 000 (30 kDa) obteniendo dos fracciones peptídicas la primera de >30 kDa y la segunda ≤30 kDa, la ultrafiltración se realizó a temperatura ambiente (28 ± 2°C) y se empleó O₂ para mantener la presión transmembrana, una vez que se realizó la separación las muestras se liofilizaron siguiendo la metodología previamente descrita y se almacenaron a 4 °C para las posteriores pruebas (115).

8.3 Análisis químico proximal

El análisis químico proximal se realizó en las semillas de *A. hypochondriacus* mediante el uso de los métodos oficiales de análisis (AOAC) (116), los contenidos de humedad, grasa y ceniza se determinaron por los métodos 950.46, 960.34 y 920.153, respectivamente; la proteína total fue determinada por el método de Kjeldahl con el método 928.08, utilizando como factor de conversión de nitrógeno 5.85 (32); el contenido total de carbohidratos se calculó por diferencia. Los resultados se expresaron en porcentaje.

8.4 Ensayo de Bradford para determinación de proteínas solubles totales

Ensayo colorimétrico descrito por Bradford (117) basado en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas, en concreto a los residuos de aminoácidos y a sus bases aromáticas. Se realizó una curva de calibración de seroalbúmina bovina en concentraciones (0-0.5 mg/mL). La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (Epoch 2, Biotek) a una longitud de onda de 595 nm. Se tomó como

válidas las curvas del calibrador con una $R^2 \geq 0.995$. Expresando los resultados en mg/mL de proteína.

8.5 *Cuantificación de metabolitos secundarios*

8.5.1 *Determinación de actividad hemaglutinante (Lectinas)*

8.5.1.1 *Preparación de eritrocitos*

Se emplearon eritrocitos humanos tipo “A”, “B”, “AB” y “O” (+) de donadores sanos quienes firmaron un consentimiento informado previamente (Anexo 16.3), los procedimientos para la extracción de sangre periférica realizaron de acuerdo a las normas oficiales mexicanas NOM-007-SSA3-2011 y NOM-253-SSA1-2012, la sangre se depositó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2% como anticoagulante y se centrifugó (10 min/2000 rpm); un vez separados fueron lavados y resuspendidos con PBS para tener una solución al 2%.

8.5.1.2 *Identificación*

La detección de la actividad de las lectinas se basa en la aglutinación debido a la unión a los carbohidratos específicos presentes en membrana, empleando el método descrito por Jaffé (118). Las lectinas se extrajeron de las muestras con PBS durante 16 h a 4°C en agitación, a continuación fueron centrifugadas (20 min/10 000 rpm) y el sobrenadante fue empleado para la identificación de lectinas. Empleando una placa de 96 pozos fondo plano, a cada pozo se le añadieron 50 μ L de PBS, en el primer pozo se añadieron 50 μ L de muestra realizándose diluciones seriadas de orden 2, a continuación, a cada pozo se le agregaron 50 μ L de la preparación de eritrocitos dejándolos incubar por una hora a temperatura ambiente. Las unidades reportadas de hemaglutinina se definen como el inverso de la última dilución que presenta aglutinación; calculándose al dividir el título de aglutinación entre los mg de proteína soluble presentes en 50 μ L de la muestra determinada por el método de Bradford previamente descrito. Los resultados se expresaron en actividad hemaglutinante por mg de proteína (AH/mg).

8.5.2 *Determinación de actividad hemolítica (Saponinas)*

Se empleó la técnica descrita por Giron (119), la cual se fundamenta en la propiedad hemolítica independiente al tipo de sangre; que presentan las saponinas al interactuar con la membrana generando una alteración en el transporte de la bomba Na^+/K^+ (120).

8.5.2.1 Preparación de eritrocitos

Se emplearon eritrocitos humanos tipo “AB”(+) de donador sano el cual firmó un consentimiento informado previamente (Anexo 16.3), los procedimientos para la extracción de sangre periférica realizaron de acuerdo a las normas oficiales mexicanas NOM-007-SSA3-2011 y NOM-253-SSA1-2012, la sangre se depositó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2% como anticoagulante y se centrifugó (10 min/2000 rpm); un vez separados fueron lavados con una solución salina isotónica y diluidos al 4% de solución salina isotónica.

8.5.2.2 Identificación

Las saponinas presentes en las muestras se extrajeron pesando 10 mg, adicionándole 1000 µL de etanol y llevándolo a un agitador orbital por 30 min, las muestras fueron llevadas a sequedad y resuspendidas en NaCl 0.9%. Para la determinación de la capacidad hemolítica, se empleó una placa de fondo redondo de 96 pozos, donde a cada pozo se colocaron 50 µL de NaCl (0.9%), a continuación en el primer pozo se adicionaron 50 µL del extracto de saponinas, realizando diluciones seriadas de orden 2, posteriormente se adicionaron 50 µL de la solución eritrocitos a cada pozo, se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Reportando la máxima dilución que presente aglutinación como unidades hemolíticas por miligramo de muestra (UH/mg).

8.6 Cuantificación de compuestos de origen fenólico

8.6.1 Fenoles totales (FT)

El contenido de polifenoles se llevó a cabo por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton (121). Se realizó una curva patrón de ácido gálico en el rango de concentraciones de 0-600 mg/L. A 100 µL de muestra, se le agregaron 500 µL del reactivo de Folin (1:10) y 400 µL de Na₂CO₃ al 7.5%, se dejaron reaccionar por 30 min, la absorbancia se midió a 765nm y los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de muestra (mg EAG/g).

8.6.2 Taninos (TN)

Estos compuestos fueron extraídos de 0.2 g de las muestras adicionando 5 mL de metanol, se agitaron durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 30 min; se realizó una curva patrón empleando +catequina (tomado como válidas

las curvas con una $R^2 \geq 0.995$), siguiendo la metodología de Price modificada por Harris *et al.* (122). Tomando 500 μL del sobrenadante se adicionaron 2.5 mL de vainillina-HCl al 0.5% y se dejándose reaccionar por 45 min a temperatura ambiente. La lectura de absorbancia se realizó a 500 nm. Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de catequina (MEC) por cada gramo de muestra (mgMEC/g).

8.6.3 Antocianinas totales (ANT)

Se cuantificó el contenido de antocianinas mediante el método diferencial de pH, basado en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (123). Las muestras se prepararon con el buffer de cloruro de potasio pH 1.0 (0.025 M) y el buffer de acetato de sodio pH 4.5 (0.4 M), se midió la absorbancia de cada muestra a 510 nm y 700 nm. El contenido de antocianinas de cálculo con la siguiente ecuación:

$$ANT = \frac{[(A_{510} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{pH\ 4.5}][PM][FD][1000]}{[\epsilon * 1]}$$

Donde:

PM: 449.2 peso molecular de cianidina-3-glucósido

FD: factor de dilución

ϵ : 26900 coeficiente de extinción molar

Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por g de muestra (mgCy3gl/g).

8.7 Cuantificación de ácido ascórbico (AA)

El contenido de ácido ascórbico se determinó mediante el método colorimétrico con hidrato de sal sódica de 2,6-dicloroindofenol (DCPI) descrito por Dürüst (124). La muestra se diluyó en ácido oxálico al 0.4% y se filtró; posteriormente se tomaron 100 μL de muestra y se le adicionaron 100 μL de solución amortiguadora de acetato de sodio y 800 μL de DCPI (0.0012 %). La absorbancia se midió a 520 nm. El ácido ascórbico se utilizó como patrón de referencia (0-50 mg/mL) tomando en cuenta como válidas la curva $R^2 \geq 0.995$. Los resultados se expresaron en mg de ácido ascórbico por mg de muestra (mgAA/g).

8.8 *Determinación de actividad antioxidante*

8.8.1 *Ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS^{•+})*

Fundamentada en la decoloración del radical ABTS^{•+}, la reducción en presencia de especies donantes de hidrógeno (125). Se pesaron 100 mg de muestra y se disolvió en 1 mL de agua, la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min; la preparación del radical ABTS^{•+} se realizó 12-16 h previas al uso con una solución de ABTS^{•+} (7 mM) conteniendo persulfato de potasio (2.45 mM), después de 24 h se realizó una dilución con etanol hasta obtener valores de absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Se realizó una curva de calibración con Trolox (0, 40, 80, 100, 120, 160 y 200 $\mu\text{g/L}$); para medir la capacidad antioxidante de las muestras se tomaron 100 μL de cada una y se adicionó 900 μL de la solución de ABTS^{•+}, reaccionaron por 5 min en obscuridad y posteriormente se realizó una lectura de absorbancia a 734 nm (Se tomarán como válidas las curvas del calibrador de Trolox con una $R^2 \geq 0.995$). Los resultados se expresarán en μM de TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox) por gramo de muestra ($\mu\text{M TEAC/g}$).

8.8.2 *Ensayo de decoloración del catión radical α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH[•])*

Se basa en la medición del grado de decoloración que provocan los componentes de la muestra sobre el DPPH[•], mediante el método reportado por Schenk y Brown (126). Se pesaron 100 mg de muestra y se disolvió en 1 mL de agua, la mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min; se preparó una solución de DPPH[•] al 7.5% y se realizó una curva de estándar con Trolox (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 $\mu\text{g/L}$). A 900 μL de la solución de DPPH[•] se le agregó 100 μL de cada muestra, se dejó en reposo por una hora y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 520 nm (Únicamente la curva con $R^2 \geq 0.995$ fue tomada como válida). Los resultados se expresarán en μM de TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox) por gramo de muestra ($\mu\text{M TEAC/g}$).

8.8.3 *Ensayo de poder antioxidante reductor férrico (FRAP)*

El análisis se realizó siguiendo el método modificado de Benzie y Strain (127) fundamentado en la capacidad de un compuesto para reducir el hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}). La muestra se preparó previamente pesando 100mg en 1 mL de agua, se agitó durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min; el reactivo FRAP se preparó mezclando una solución amortiguadora de acetato (300 mM), solución de TPTZ

(10 mM) y FeCl₃ (20 mM) en proporción 10:1:1, y se realizó una curva estándar de FeSO₄ (0-50 mg/mL), el potencial reductor se midió tomando 30 µL de muestra más 90 µL de agua y 900 µL del reactivo FRAP, se incubó a 37 °C por 10 min y posteriormente se realizó la lectura a un absorbancia de 590 nm. Únicamente la curva $R^2 \geq 0.995$ fue tomada como válida. Los resultados se expresarán en µM Fe²⁺/g de muestra.

8.9 Determinación de actividad anticarcinogénica

8.9.1 Líneas celulares, cultivo y siembra.

Las líneas celulares de cáncer empleadas en el presente estudio son: la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) y línea celular de cáncer de cérvix (SiHa); cuyas características se muestran en la Tabla 7, las líneas celulares fueron donadas por el Dr. Alejandro García Carrancá, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Tabla 7 Características de líneas celulares (128,129)

Línea celular	Organismo	Tejido	Morfología	Clasificación	Características
MDA-Me231	<i>Homo sapiens</i>	Glándula mamaria	Epitelial	Adenocarcinoma	Mujer caucásica 51 años
SiHa	<i>Homo sapiens</i>	Cérvix	Epitelial	Grado II, carcinoma de células escamosas	Mujer asiática 55 años VPH 16

Las líneas celulares se cultivaron en el medio esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), complementándose con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1 % penicilina y estreptomycinina para obtener medio de cultivo completo (MCC). Las células se transfirieron a frasco de cultivo estéril de 75 cm² con 10 mL de MCC incubándose a 37 °C a 4% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Una vez que las células alcanzaron 80-90 % de confluencia, se trataron con 5 mL ácido etilendiaminotetraacético (EDTA-PBS, 1mM y pH 7.4) se incubaron entre 5-10 min hasta que la monocapa celular se separó y se prosiguió al protocolo de conteo y siembra.

8.9.2 Conteo celular y protocolo de siembra

Las células se contaron en un hemocitómetro utilizando tinción con azul de tripán. El número de células por mL se calculó utilizando la fórmula:

$$\frac{N \text{ de células}}{\text{mL}} = \left(\frac{x}{8}\right) (5)(\text{vol total de células})(10000)$$

Donde:

X = número de células contadas en el hemocitómetro

8 = número de cuadrantes contados

5 = factor de dilución de células en azul tripán

8.9.3 *Ensayo de citotoxicidad y antiproliferativo en líneas celulares con aislado proteico y péptidos bioactivos.*

Después del recuento, se calculó el volumen de células y MCC necesario para cada ensayo, las células se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pozos con densidades de 10,000 células/200 µL, para el ensayo de citotoxicidad con 24 h de incubación y 5,000 células/200 µL para los ensayos antiproliferativos de 48 h y 72 h de incubación. Después de 24 h de incubación, las células se trataron por triplicado con diferentes concentraciones, en caso del aislado con 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1500 y 2500 mg/mL; los péptidos >30 kDa con 0, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 mg/mL y con los péptidos <30 kDa con 0, 500, 800, 1000, 1300, 1500, 2000 y 3000 mg/mL en ambas líneas celulares, durante 24, 48 y 72 h. Además, se incluyeron controles positivos paclitaxel a una concentración de 34.2 y 25.65 y cisplatino de 30 y 24 µg/mL y para células MDA-MB-231 y SiHa respectivamente. Al finalizar el periodo de tratamiento, se realizó el ensayo de citotoxicidad (ensayo de MTT).

8.9.4 *Citotoxicidad (Ensayo de MTT)*

Se basa en la reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Después de los tiempos de incubación de 24, 48 y 72 h, se agregaron 10 µL de una solución MTT (5mg/mL) a cada pozo y la placa se incubó a 37 ° C durante 3 h; posteriormente, se eliminó el MTT y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pozo, la placa se colocó en un agitador orbital por 5 min para disolver los cristales de formazán formados; se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 540 nm en un lector de microplacas EPOCH (Bio-Tek Instruments Inc.) (130).

8.10 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Con los resultados previos del ensayo de citotoxicidad y antiproliferación, previamente descrito, se seleccionó el compuesto y el tiempo de exposición con el mayor efecto citotóxico; las células de MDA-MB-231 y SiHa fueron tratadas con el aislado proteico a la concentración de DI_{50} del tiempo de 72 h; lavadas tres veces con PBS; posteriormente se fijaron en glutaraldehído al 2.5% con cacodilato de sodio (0.1 M) en $CaCl_2$ (5mM), y se almacenaron a 4 °C. Se les añadió resina LR White polimerizándolos bajo UV a 4 ° C durante 48 h. A partir de los bloques obtenidos de resina se realizaron cortes finos y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo elaborando cortes finos que se observaron con un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011 (131).

8.11 Definición de variables

Tabla 8 Definición de variables

Variable	Tipos de variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Ácido Ascórbico	Cuantitativa	Cuantificación del contenido de ácido ascórbico	Reducción de 2,6-dicloroindofenol	mg de ácido ascórbico por gramo de muestra
Actividad citotóxica	Cuantitativa	Determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas	Reacción del tetrasolium, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 y 1)-2-5-difeniltetrazolium (MTT)	% de disminución vs control (100%)
Antocianinas	Cuantitativa	Cuantificación del contenido de antocianinas	Diferencial de pH	mg cianidina-3-glucósido por gramo de muestra
Capacidad antioxidante	Cuantitativa	Capacidad de captar radicales libres y neutralizados	Inhibición del radical ABTS ^{•+} y DPPH [•]	μM TEAC por ml de muestra
	Cuantitativa	Potencial reductor	Reducir Fe ³⁺ a Fe ²⁺	μM Fe ²⁺ por gramo de muestra
Composición química proximal	Cuantitativa	Cantidad de carbohidratos, proteínas, grasa, ceniza y humedad	Determinación gravimétrica	% en 100g de muestra
Fenoles	Cuantitativa	Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos totales	Compuestos fenólicos reaccionan al reactivo de Folin-Ciocalteu	mg ácido gálico /gramo de muestra

Tabla 8 Definición de variables -cont.

Variable	Tipos de variables	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición
Hemaglutininas	Cuantitativa	Cantidad de hemaglutininas	Aglutinación de eritrocitos	AH / mg de proteína soluble presentes en 50 µl de la muestra determinada por el método de Bradford
Péptidos bioactivos	Cuantitativa	Extracción de las diferentes fracciones proteicas	Extracción de acuerdo a solubilidad	(g de proteína extraída en la fracción / g de proteínas totales en harina) x 100
Proteínas solubles	Cuantitativa	Cantidad de proteínas	Formación de complejo entre azul brillante de coomassie G-250 y las proteínas	mg de proteínas por mL de muestra
Saponinas	Cuantitativa	Cuantificar las saponinas presentes	Aglutinación de los glóbulos rojos	UHE / mg de muestra
Taninos	Cuantitativa	Determinar la cantidad de taninos	Decoloración del compuesto de catequiza	MEC / 100 g de muestra

8.12 Análisis estadístico

Los datos se almacenaron en una base de datos creada en el programa Microsoft Excel (Microsoft Office, USA) y se analizaron estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA); presentándose como la media \pm desviación estándar de la media (DE).

9 RESULTADOS

9.1 Análisis químico proximal de la harina de Amaranto (*A. hypochondriacus*)

Con la finalidad de conocer los componentes de harina de la semilla amaranto se realizó un análisis químico proximal, cuyos resultados se presentan en la Tabla 9, donde los carbohidratos y las proteínas son los componentes predominantes. Los resultados muestran que la semilla de amaranto es una fuente de proteína, lo cual justifica el proceso de separación de los péptidos para su análisis.

Tabla 9 Composición química proximal de harina de semilla de *A. hypochondriacus*.

Componente	%
Ceniza	7.11±0.07
Humedad	3.25±0.32
Grasa	4.21±0.23
Proteína*	15.80±0.38
Carbohidratos totales**	69.62±0.68

* Factor de conversión de nitrógeno (F.N.C) = 5.85

** Calculado por diferencia.

Los valores representan la media ± DE. Determinación por triplicado.

9.2 Cuantificación de proteína soluble de la harina de semilla de *A. hypochondriacus* durante el proceso de separación de los péptidos.

La cuantificación de proteína soluble durante el proceso de extracción de los péptidos se observa en la Figura 8, donde se muestra una disminución significativa entre el extracto proteico (182.6 ± 2.3 mg/g) y los pasos subsecuentes, el aislado proteico (169.8 ± 3 mg/g), hidrolizado (153.1 ± 3.1 mg/g), péptidos >30kDa (132.8 ± 3.1 mg/g) y péptidos <30kDa (119.4 ± 4.6 mg/g), el porcentaje de recuperación proteica disminuyó 7% del extracto proteico al aislado proteico, 16% al hidrolizado, 27% a los péptidos >30kDa y 35% a los péptidos <30kDa.

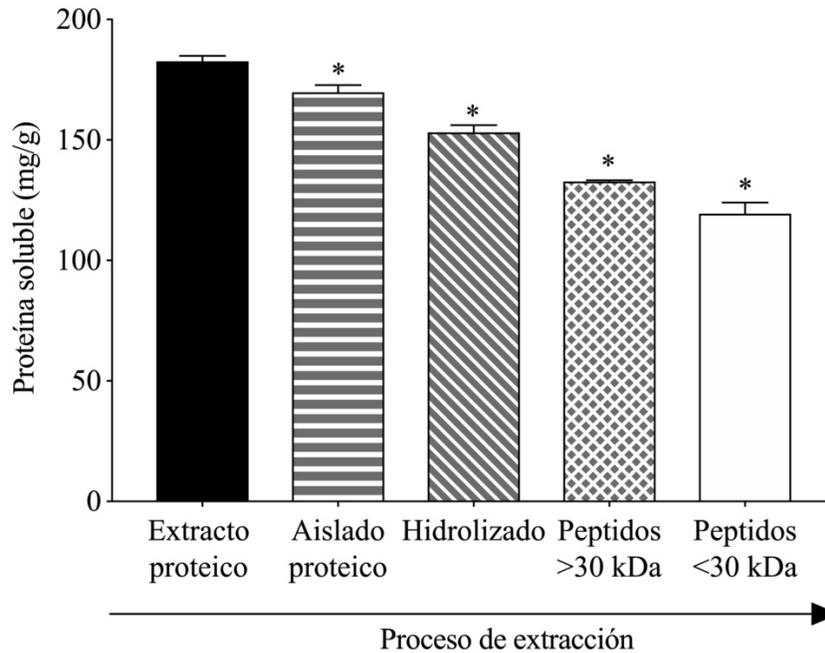


Figura 8 Cuantificación de proteínas solubles durante el proceso de extracción. El * indica diferencias significativas entre extracto proteico (control) con respecto a las muestras ($p < 0.05$). Los valores representan la media \pm DE. Determinación por triplicado.

Se realizó el análisis de coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 1) entre la proteína soluble en cada una de las muestras y los metabolitos secundarios evaluados, mostrando una correlación fuerte y estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Entre el extracto proteico y las lectinas ($R^2 = 0.999$), FT ($R^2 = 0.939$), y los ensayos de actividad antioxidante $ABTS^{\bullet+}$ ($R^2 = 0.98$) y FRAP ($R^2 = 0.915$); y entre el aislado proteico y las lectinas ($R^2 = 0.999$), saponinas ($R^2 = 0.974$), FT ($R^2 = 0.997$) y el ensayo de actividad antioxidante $ABTS^{\bullet+}$ ($R^2 = 0.982$).

9.3 Metabolitos secundarios

9.3.1 Actividad hemaglutinante del extracto proteico, aislado proteico y péptidos

La Figura 9 muestra la evaluación de la actividad hemaglutinante en cuatro tipos de eritrocitos humanos; se evaluó el extracto proteico, aislado proteico y ambos péptidos (>30 kDa y <30 kDa), solo registrando actividad el extracto y aislado proteico; mostraron mayor afinidad hacia los eritrocitos tipo AB+ con 7 ± 0.1 y 60.3 ± 1.1 AH/mg proteína respectivamente, y menor afinidad a los eritrocitos tipo B+ en extracto (1.75 ± 0.02 AH/mg) y en el aislado proteico (15.1 ± 0.3 AH/mg) con una disminución del 25% en comparación de los eritrocitos AB+. La actividad hemaglutinante presentó diferencias significativas

($p < 0.05$) entre el aislado proteico y el extracto proteico en los cuatro tipos de eritrocitos; se estableció que existe correlación fuerte entre la actividad hemaglutinante y el contenido de proteína soluble del extracto proteico ($R^2 = 0.999$) y con el aislado proteico ($R^2 = 0.999$) (Anexo 1).

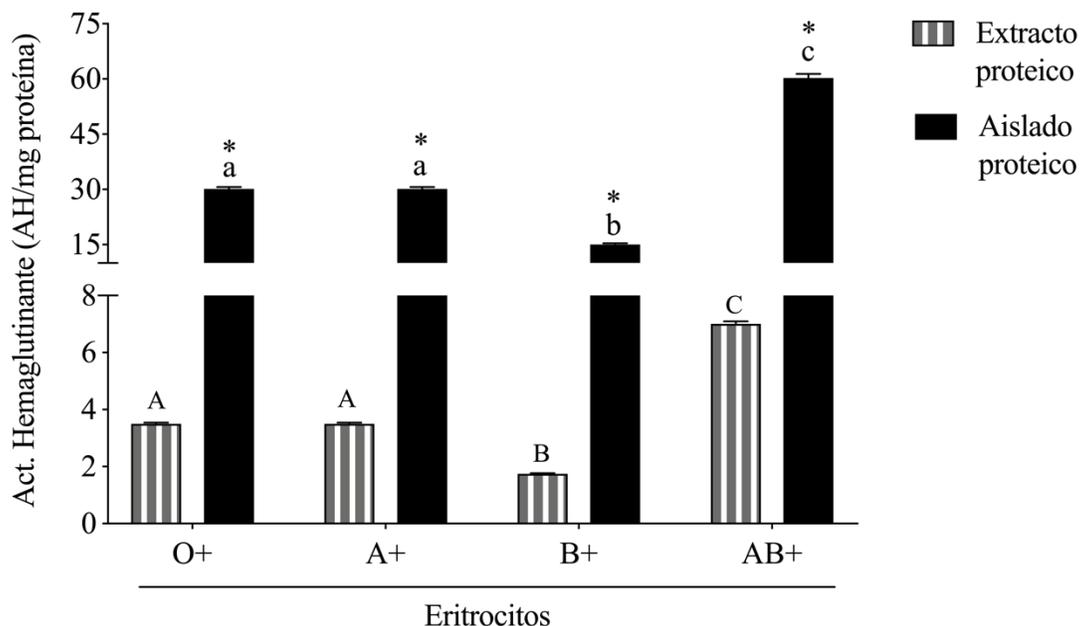


Figura 9 Actividad hemaglutinante de lectinas presentes en proteínas y péptidos obtenidos de la semilla de *A. hypochondriacus* en 4 tipos de eritrocitos. **A B C:** Letras mayúsculas indican diferencias entre los tipos de eritrocitos en el extracto proteico ($p < 0.05$). **a b c:** Letras minúsculas indican diferencias entre los tipos de eritrocitos en el aislado proteico ($p < 0.0001$). El * indica diferencias entre extracto proteico y aislado proteico en cada tipo de eritrocito ($p < 0.0001$). Los valores representan la media \pm DE. Determinación por triplicado.

9.3.2 Actividad hemolítica del extracto proteico, aislado proteico y péptidos

Las saponinas presentes se evaluaron mediante la prueba de hemólisis en eritrocitos tipo AB+, se evaluaron las muestras de extracto proteico, aislado proteico y ambos péptidos (>30 kDa y <30 kDa). Los péptidos no mostraron actividad hemolítica, como se muestra en la tabla 10, sin embargo, en el caso del extracto proteico, la actividad disminuyó significativamente hasta 70.2% con respecto al aislado proteico.

9.3.3 Constituyentes de origen fenólico y ácido ascórbico en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos

La Tabla 10 muestra la cuantificación de los constituyentes de origen fenólico; los taninos (TAN) presentan una mayor concentración en el extracto proteico (1.46 ± 0.75 mg MEC/g) con una disminución significativa ($p < 0.05$) durante el proceso de obtención de los péptidos disminuyendo 94% entre el extracto proteico y los péptidos < 30 kDa. Se realizó el análisis de coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 1) entre los TAN y la presencia de saponinas en el aislado proteico mostrando una correlación fuerte ($R^2 = 0.964$) y estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 10 Metabolitos secundarios evaluados en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos

		Extracto proteico		Aislado proteico		Péptidos >30 kDa		Péptidos <30 kDa	
Saponinas	UH/mg	23.810 \pm 0	a	80 \pm 0	b	s/a		s/a	
FT	mg EAG/g	129.4 \pm 2.4	a	28.01 \pm 0.03	b	11.78 \pm 0.08	c	11.49 \pm 0.2	c
TAN	mg ECAT/g	146.9 \pm 1.75	a	24.62 \pm 1.74	b	13.95 \pm 2.29	c	8.99 \pm 3.67	c
ANT	mg Cy3gl/g	11.42 \pm 1.05	a	9.25 \pm 0.34	a	2.85 \pm 0.86	b	0.91 \pm 0.86	b
AA	mg AA/kg	25.7 \pm 6.9	a	2.04 \pm 1.6	b	0.43 \pm 0.22	b	0.11 \pm 0.3	b

s/a: Sin actividad detectada **a b c**: Letras diferentes muestran diferencias entre muestras en el mismo ensayo ($p < 0.0001$). FT: Fenoles totales, TAN: Taninos, ANT: Antocianinas y AA: Ácido ascórbico. Los valores representan la media \pm DE. Determinación por triplicado.

Otro constituyente evaluado fueron las antocianinas (ANT) que pertenecen al grupo de los flavonoides mostrando que el extracto proteico contiene la mayor cantidad (11.42 ± 1.05 mg Cy3gl/g) en comparación del aislado proteico, péptidos > 30 kDa y < 30 kDa, disminuyendo significativamente ($p < 0.05$) la concentración de estos compuestos durante el proceso de separación de los péptidos.

Se evaluó la presencia de compuestos fenólicos, englobando todas aquellas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo; señalando que el extracto proteico, al igual que en las dos pruebas anteriores, contenía la mayor cantidad de compuestos fenólicos (12.94 ± 2.4 mg EAG/g) disminuyendo

significativamente en un 78% en el aislado proteico y 91% en ambos péptidos (>30 kDa y <30 kDa).

Se observó una correlación Pearson fuerte y estadísticamente significativa ($p<0.05$) (Anexo 1), en el extracto proteico, entre los fenoles totales (FT) y la presencia de lectinas ($R^2=0.950$) y presencia de saponinas ($R^2=0.971$); así mismo, dicha correlación fue fuerte en el aislado proteico entre FT y la presencia de lectinas ($R^2=0.999$).

Se cuantificó la cantidad de ácido ascórbico (AA) en las diferentes muestras durante el proceso de separación de los péptidos, mostrando que ésta disminuye significativamente en comparación del extracto proteico (25.78 ± 6.9 mg AA/kg), en 92% en el aislado proteico, 98% en los péptidos >30 kDa y 99% en los péptidos <30 kDa.

9.3.4 Actividad antioxidante en extracto proteico, aislado proteico y péptidos

En la Tabla 11 se muestra la actividad antioxidante mediante mecanismos de transferencia de átomos de hidrógeno y electrones. En los ensayos de ABTS \bullet^+ y DPPH \bullet el extracto proteico reportó la mayor actividad 104.59 ± 0.69 y 75.62 ± 0.21 $\mu\text{M TEAC/g}$ respectivamente, en los pasos subsecuentes del proceso de separación la actividad antioxidante se ve disminuida significativamente ($p<0.05$) hasta perder 88-92% de su actividad antioxidante en los péptidos en comparación del extracto proteico. La capacidad para reducir el ión férrico se evaluó mediante en ensayo FRAP, observándose que el extracto proteico mostró el mayor resultado (47.8 ± 0.9 $\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$), disminuyendo dicha capacidad significativamente ($p<0.05$), a través del proceso de obtención de aislado proteico, péptidos >30 kDa y los péptidos <30 kDa, siendo dicho decremento del 13, 74 y 78% respectivamente.

Tabla 11 Actividad antioxidante en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos

		Extracto proteico		Aislado proteico		Péptidos >30 kDa		Péptidos <30 kDa	
ABTS\bullet^+	$\mu\text{M TEAC/g}$	104.5 ± 0.69	^a	19.4 ± 0.05	^b	9.82 ± 0.10	^c	8.04 ± 0.05	^d
DPPH\bullet	$\mu\text{M TEAC/g}$	75.62 ± 0.21	^a	17.1 ± 0.14	^b	9.42 ± 0.04	^c	7.53 ± 0.04	^d
FRAP	$\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$	47.8 ± 0.92	^a	41.7 ± 0.95	^b	12.3 ± 0.26	^c	10.7 ± 0.18	^c

a b c: Letras diferentes muestran diferencias entre muestras en el mismo ensayo ($p<0.0001$). Los valores representan la media \pm DE. Determinación por triplicado

El análisis de coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 1) entre los ensayos de actividad antioxidante y los metabolitos secundarios evaluados mostraron una correlación fuerte y estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el ensayo de actividad antioxidante (ABTS \bullet^+) y la presencia de lectinas ($R^2 = 0.977$) y FT ($R^2 = 0.984$) presentes en el aislado proteico. La capacidad de reducir el el ion férrico (FRAP) mostró una correlación fuerte y estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la capacidad reductora y el ensayo antioxidante ABTS \bullet^+ ($R^2 = 0.977$) en el extracto proteico.

9.3.5 Concentración antioxidante inhibitoria media (IC_{50})

En Figura 10 muestra la concentración inhibitoria media (IC_{50}) definida como la cantidad mínima capaz de inhibir el 50 % del radical empleado, se comparó el valor de la IC_{50} de trolox (control) en el ensayo de DPPH \bullet ($4.60 \pm 0.03 \mu\text{M}/\text{mL}$) y ABTS \bullet^+ ($1.08 \pm 0.08 \mu\text{M}/\text{mL}$) con las muestras, donde se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) de la IC_{50} durante el proceso de extracción de los péptidos, en el ensayo DPPH \bullet aumentaron $5.15 \pm 0.2 \mu\text{M}/\text{mL}$ en el extracto proteico, $11.39 \pm 1.6 \mu\text{M}/\text{mL}$ en el aislado proteico, $165.19 \pm 4.2 \mu\text{M}/\text{mL}$ en los péptidos >30 kDa y $150.9 \pm 7.9 \mu\text{M}/\text{mL}$ en los péptidos <30 kDa en comparación del control; mientras que en el ensayo ABTS \bullet^+ los valores aumentaron $7.1 \pm 0.3 \mu\text{M}/\text{mL}$ en el extracto proteico, $9.82 \pm 0.3 \mu\text{M}/\text{mL}$ en el aislado proteico, $136.4 \pm 0.9 \mu\text{M}/\text{mL}$ en los péptidos >30 kDa y $105.53 \pm 0.1 \mu\text{M}/\text{mL}$ en los péptidos <30 kDa en comparación del control. Para en ensayo de reducción de metales quelantes FRAP el control fue 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ); con IC_{50} de $0.39 \pm 0.01 \mu\text{M}/\text{mL}$, el extracto proteico mostró un aumento significativo de 1955%, el aislado proteico de 2379% y en ambos péptidos 7040% veces más en comparación con el control, mostrando que la actividad antioxidante y la concentración inhibitoria media presentan una relación inversa.

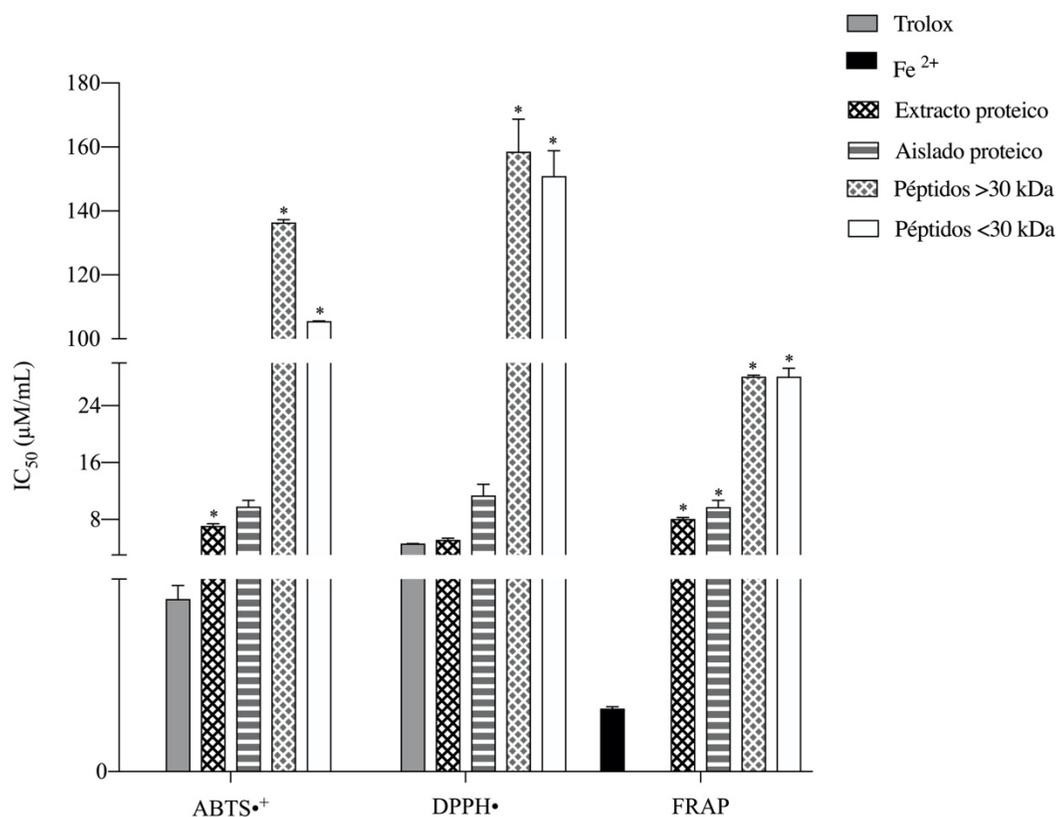


Figura 10 Concentración antioxidante inhibitoria media (IC₅₀). El * indica diferencia entre el control (Trolox/Fe²⁺) y muestras en el mismo ensayo (p<0.0001). Los valores representan la media ± DE. Determinación por triplicado.

9.3.6 Actividad anticarcinogénica

9.3.6.1 Estudios *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231)

9.3.6.1.1 Evaluación del efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto (24 h)

Las pruebas de citotoxicidad que se muestran en la Figura 11 y Tabla 12-A, se observa que, a las 24 h de exposición con el aislado proteico, la viabilidad celular disminuye significativamente por debajo del 50%, a partir de la concentración 500 mg/mL y continúa descendiendo hasta 28.8% a la concentración máxima de 2500 mg/mL, obteniendo la dosis inhibitoria media (DI₅₀) de 573.9 ± 114.4 mg/mL; en los péptidos >30 kDa, la viabilidad celular disminuyó significativamente a partir de la concentración 800 mg/mL alcanzando el 11.8% a la concentración de 1000 mg/mL, para obtener una DI₅₀ de 1162.2 ± 56.06 mg/mL. En los péptidos <30 kDa se observó un aumento significativo en la viabilidad de 28 y 49 %, en las concentraciones 500 y 800 mg/mL respectivamente. El mayor efecto a las 24 h se

observó con una concentración de 3000 mg/mL de péptidos <30 kDa la cual redujo la viabilidad más del 90% en comparación con el control; el decremento en la viabilidad ocasionada por las muestras, estuvo directamente relacionado con el aumento de las concentraciones. En comparación con el cisplatino, los efectos de todas las muestras, fue mayor que la de este fármaco ya que mostró solo una reducción del 45% a las 24 h; por otro lado para el caso del paclitaxel, éste presentó mayor efecto que las muestras ensayadas; sin embargo en los péptidos >30 y < 30 kDa, fue mayor el efecto de estas muestras a concentraciones superiores de 900 mg/mL y 3000 mg/mL respectivamente.

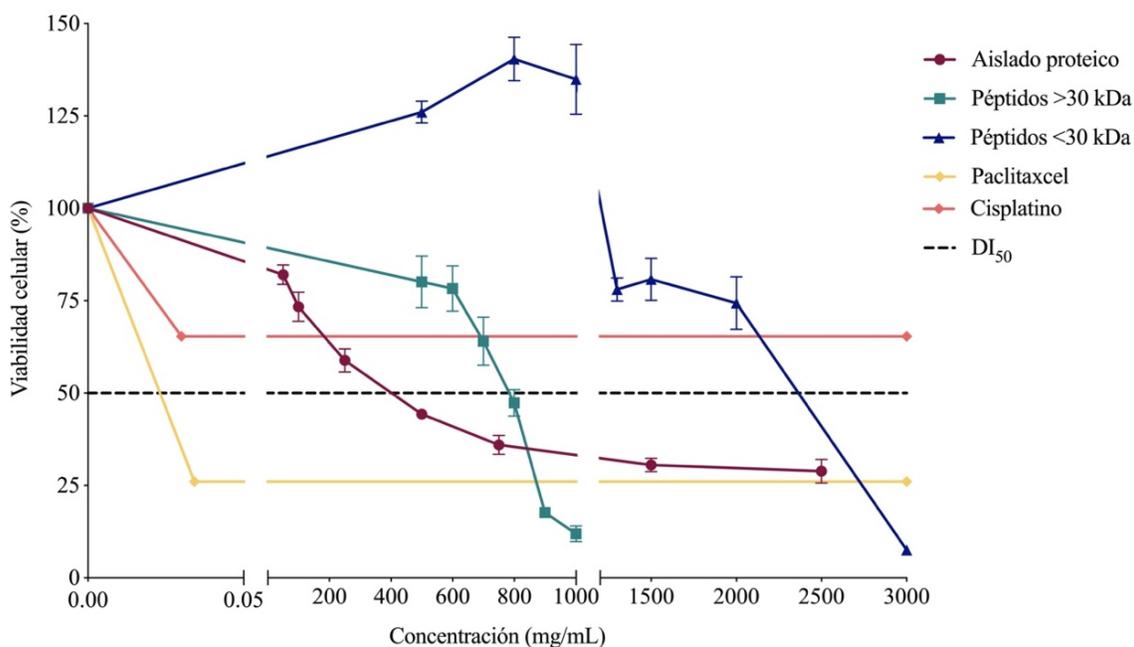


Figura 11 Efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 24 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

9.3.6.1.2 Evaluación del efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto después de 48 y 72 h de exposición

En la Figura 12 y Tabla 12-B se muestra el efecto antiproliferativo, después de las 48 h de exposición de las células a las muestras, evidenciado por la disminución continua en la viabilidad celular con respecto al tiempo. La viabilidad en el aislado proteico disminuyó significativamente menos del 50%, a partir de la concentración de 100 mg/mL hasta llegar a $21.8 \pm 0.044\%$ en la concentración de 2500 mg/mL, obteniéndose una DI_{50} de 190.2 ± 132.3

mg/mL; en los péptidos >30 kDa la viabilidad disminuyó considerablemente a la concentración 900 mg/mL, sin presentar diferencia significativa con la concentración máxima analizada; los péptido <30 kDa mostraron un aumento en la viabilidad entre 20 y 60 %, a las concentraciones de 500 a 1500 mg/mL, con respecto al control, y una disminución significativa a partir de la concentración de 2000 mg/mL. Por otro lado, al comparar las muestras con cisplatino, solamente el aislado proteico y los péptidos <30 kDa, en las concentraciones mayores de 1500 y 2000 mg/mL respectivamente, mostraron mayor efecto que el fármaco a la concentración 30 µg/mL; mientras que en el caso de paclitaxel, solamente los péptidos <30 kDa, a concentraciones superiores de 2000 mg/mL, lograron superar este compuesto.

El efecto antiproliferativo a las 72 h se muestra en la Figura 13 y Tabla 12-C, evidenciado por la disminución de la viabilidad de forma continua en el tiempo; el aislado proteico disminuyó significativamente menos del 50% a partir de la concentración más baja evaluada (50 mg/mL) y continúa disminuyendo hasta aproximadamente 80% a la concentración de 2500 mg/mL, determinándose la DI_{50} de 59.18 ± 12.45 mg/mL; en los péptidos >30 kDa hay un aumento significativo en la viabilidad de 12 a 19% en las concentraciones de 500 a 700 mg/mL y a partir de la concentración 900 mg/mL se observa una disminución importante. Los péptidos de menor tamaño (<30 kDa) lograron una reducción significativa de la viabilidad en las concentraciones más altas evaluadas; por otro lado, los controles positivos, cisplatino y paclitaxel lograron disminuir la viabilidad entre el 80 y 90% respectivamente, cabe hacer notar que solo a las concentraciones máximas analizadas en las muestras, lograron obtener mayor efecto que los controles positivos.

El efecto del tiempo sobre la viabilidad se muestra en la Figura 12, para el aislado proteico (tabla 11-A), las concentraciones 50, 100, 500 y 1500 mg/mL mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h); las concentraciones 250 y 750 mg/mL solo mostraron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a las 24 h de exposición y la concentración máxima sólo mostró diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las 48 y 72 h de exposición. Con respecto a los péptidos >30 kDa (tabla 11-B), las concentraciones de 500 y 600 mg/mL, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a las 24 y 72 h de exposición; a la concentración de 700 mg/mL se mostró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes tiempos de exposición; a 800 mg/mL de éste péptido, mostró diferencia

estadística significativa ($p < 0.05$) entre los tres tiempos de tratamiento y la concentración máxima analizada, se presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre 24 y 48 h, así como entre 48 y 72 h. En el caso de los péptidos < 30 kDa (tabla 11-C), las concentraciones de 800, 1000 y 1500 mg/mL mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tres de exposición, en las concentraciones de 500 y 1300 mg/mL se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre 24 y 48 h, y entre 48 y 72 h; a los 3000 mg/mL de muestra no se observó diferencia significativa en ninguno de los tiempos de estudio.

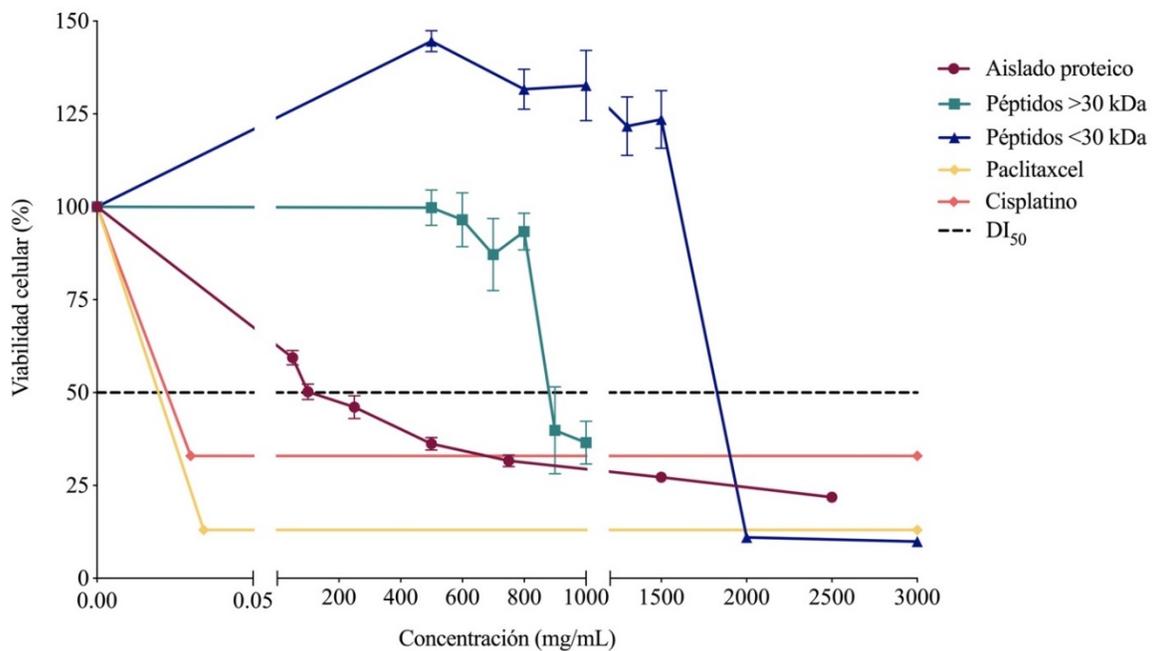


Figura 12 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 48 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

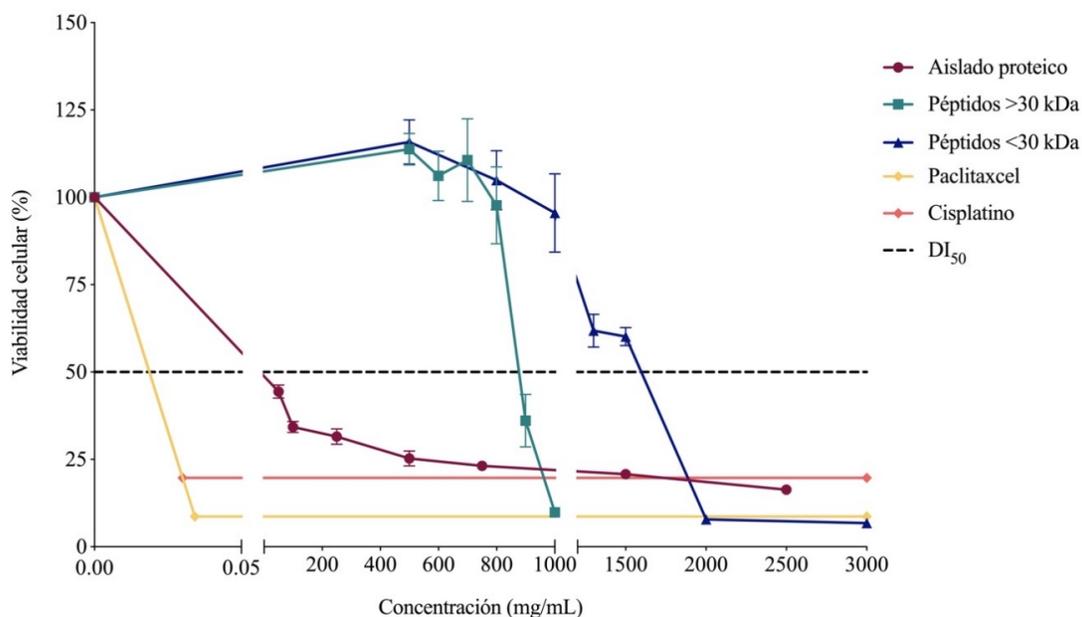


Figura 13 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de 72 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

Tabla 12 Análisis estadístico de los ensayos de citotoxicidad y antiproliferativos, expresados en porcentaje de viabilidad celular, del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231)

A) Aislado proteico

Concentración (mg/mL)	Viabilidad (%)					
	24 h		48 h		72 h	
0	100 \pm 0	a	100 \pm 0	a	100 \pm 0	a
50	82.1 \pm 0.090	b	59.4 \pm 0.068	b	44.4 \pm 0.066	b
100	73.3 \pm 0.13	b	50.2 \pm 0.072	b	34.3 \pm 0.054	c
250	58.9 \pm 0.10	c	46.1 \pm 0.106	c	31.5 \pm 0.077	d
500	44.3 \pm 0.047	c	36.2 \pm 0.059	d	25.3 \pm 0.074	e
750	36 \pm 0.088	d	31.7 \pm 0.054	e	23.2 \pm 0.036	c
1500	30.5 \pm 0.062	d	27.2 \pm 0.032	e	20.8 \pm 0.028	e
2500	28.8 \pm 0.111	e	21.8 \pm 0.044	e	16.4 \pm 0.034	e

B) Péptidos >30 kDa

Viabilidad (%)									
Concentración (mg/mL)	24 h			48 h			72 h		
0		100±0	a		100±0	a		100±0	a
500	A	80.1±0.24	b	AB	99.7±0.16	a	B	119.6±0.24	a
600	A	78.4±0.2	c	AB	96.4±0.25	a	B	112.9±0.30	a
700	A	64±0.22	d	B	87.1±0.33	a	C	113.1±0.43	a
800	A	47.3±0.12	d	B	93.4±0.17	a	B	93.8±0.41	a
900	A	17.5±0.047	e	B	39.6±0.38	b	AB	36±0.25	b
1000	A	11.8±0.07	e	B	36.5±0.19	b	A	9.8±0.028	b

C) Péptidos <30 kDa

Viabilidad (%)									
Concentración (mg/mL)	24 h			48 h			72 h		
0		100±0	a		100±0	a		100±0	a
500	A	128.4±0.150	b	B	157±0.193	b	A	115.9±0.21	a
800	A	149.6±0.29	b	A	131.8±0.18	b	B	104.8±0.29	a
1000	A	134.9±0.31	b	A	132.6±0.31	b	B	95.4±0.38	a
1300	A	78.2±0.08	a	B	121.8±0.26	b	A	61.8±0.16	b
1500	A	80.7±0.16	a	B	123.5±0.24	b	C	60±0.089	b
2000	A	74.3±0.24	ac	B	11±0.036	c	B	7.9±0.018	c
3000	A	7.5±0.042	d	A	11±0.036	c	A	6.7±0.017	d

A B C: Letras mayúscula diferentes indican diferencias entre los diferentes tiempos de tratamiento en la misma concentración ($p < 0.05$). a b c: Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre las diferentes concentraciones en el mismo tiempo ($p < 0.05$). Los valores representan la media \pm DE. Determinación por triplicado.

9.3.6.1.3 Dosis inhibitoria media (DI₅₀) en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231)

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la dosis inhibitoria media (DI₅₀) calculadas para las diferentes muestras estudiadas; el aislado proteico mostró la mayor toxicidad en los tres tiempos de exposición, seguido de los péptidos >30 kDa mientras que los péptidos <30 kDa presentaron menor citotoxicidad. Tanto el aislado proteico como los péptidos disminuyeron la viabilidad celular de manera dependiente al tiempo y a la dosis. De manera general el efecto antiproliferativo y citotóxico fue mayor a las 48 y 72 h de tratamiento con el aislado proteico.

Tabla 13 Dosis inhibitoria media (DI₅₀) determinadas en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) tratada con aislado proteico y péptidos obtenidos de las semillas de *A. hypochondriacus*.

		Viabilidad (%)								
		24 h		48 h		72 h				
Aislado proteico	mg/mL	A	573.9±114.4	a	A	190.2±132.3	a	B	59.18±12.45	a
Péptidos >30 kDa	mg/mL	A	1162.2±56.0	b	AB	791.5±117.6	b	B	744.38±156.4	b
Péptidos <30 kDa	mg/mL	A	2756.1±122	c	A	2328.4±109.5	c	B	1891.4±46.8	c
Paclitaxcel	µg/mL	A	21.72±0.40	d	AB	14.99±0.85	d	B	12.3±0.32	d
Cisplatino	µg/mL	A	3.67±0.06	e	B	22.04±0.425	e	C	16.3±0.55	d

A B C: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre tiempo de tratamiento en el mismo compuesto (p<0.05). **a b c:** Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los compuestos en el mismo tiempo (p<0.05). Los valores representan la media ± DE de tres ensayos realizados independientemente.

9.3.6.2 *Microscopía electrónica de transmisión (MET) en la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) tratadas con aislado proteico.*

El cambio morfológico se considera una de las características más notables de las células cancerosas. Por lo tanto, para evaluar el daño ocasionado por el aislado proteico, se observaron los cambios morfológicos en las células de cáncer de mama (MDA) comparando las células no tratadas y las células tratadas con aislado proteico a una dosis 59.1 mg/mL (DI₅₀) después de 72 h de exposición, en la Figura 14 se muestran los resultados del estudio de MET; en la Figura 14-A se muestra la microfotografía de las células control, en la cual se observa una célula pleomórfica con organelos presentes y una membrana delimitada; mientras que la Figura 14-B muestra una destrucción celular, con la presencia de vacuolas y la pérdida de estructura celulares como mitocondrias, núcleo y membrana plasmática (indicado con flechas).

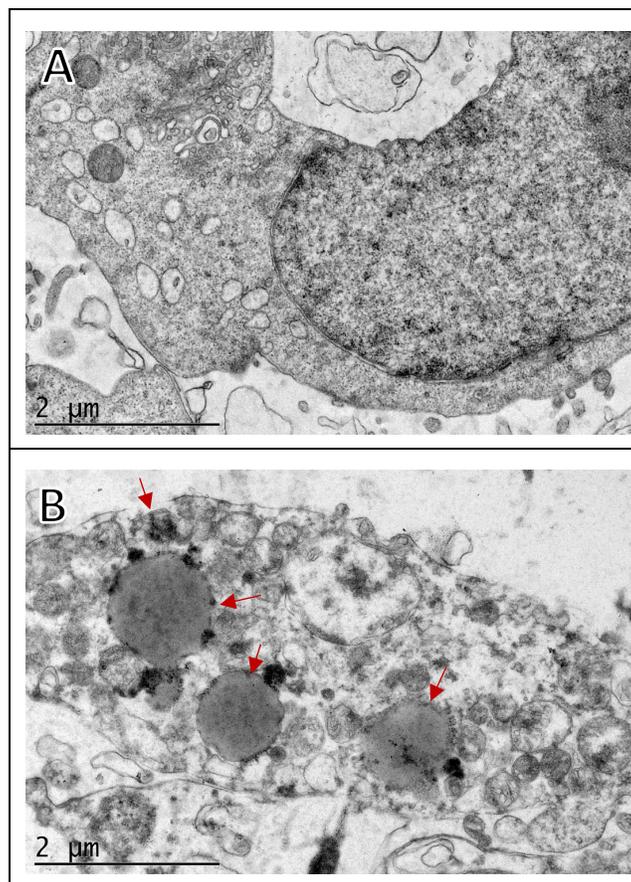


Figura 14 Análisis con microscopio electrónico de transmisión (TEM) de la línea celular de cáncer de mama (MDA-MB-231) cultivada durante 72 h (A) Sin tratamiento (control negativo) y (B) Tratada con el aislado proteico a una dosis 59.1 mg/mL (DI₅₀).

9.3.6.3 Estudios *in vitro* en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa)

9.3.6.3.1 Evaluación del efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto (24 h)

En la Figura 14 y Tabla 14-A se muestran las pruebas de citotoxicidad a las 24 h de exposición con el aislado proteico, la viabilidad disminuyó significativamente por debajo del 50%, a partir de la concentración 750 mg/mL y continúa descendiendo hasta 28.8% a la máxima concentración, obteniendo la dosis inhibitoria (DI_{50}) de 768.64 ± 73.88 mg/mL; en los péptidos >30 kDa la viabilidad celular disminuyó significativamente en la concentración 900 mg/mL alcanzando el 31.5% a la concentración de 1000 mg/mL, para obtener una DI_{50} de 1086.7 ± 70.66 mg/mL. Los péptidos <30 kDa obtuvieron un DI_{50} de 5345.12 ± 265.5 mg/mL. El mayor efecto a las 24 h se observó con una concentración de 2500 mg/mL de aislado proteico la cual redujo la viabilidad más del 70%; el decremento en la viabilidad ocasionada por las muestras, estuvo directamente relacionado con el aumento de las concentraciones. En comparación con el cisplatino, los efectos del aislado proteico y los péptidos >30 kDa, fueron mayores que los de este fármaco ya que mostró solo una reducción del 44.2% a las 24 h; por otro lado para el caso del paclitaxcel, éste presentó mayor efecto que las muestras estudiadas.

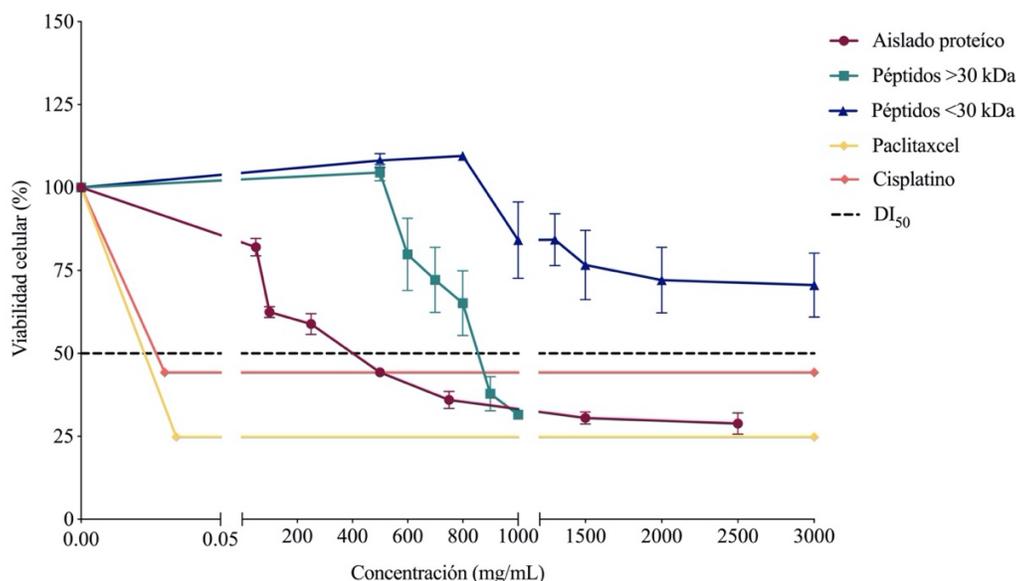


Figura 15 Efecto citotóxico del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 24 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

9.3.6.3.2 Evaluación del efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto (48-72 h)

En la Figura 15 y la Tabla 14-B se muestra el efecto antiproliferativo, después de las 48 h de exposición, evidenciando por la disminución continua en la viabilidad con respecto al tiempo. Con el aislado proteico la viabilidad disminuyó menos del 50%, a partir de la concentración de 500 mg/mL hasta llegar a 36.8% en la concentración de 2500 mg/mL, obteniéndose una DI_{50} de 439.7 ± 151 mg/mL; en los péptidos >30 kDa la viabilidad disminuyó considerablemente a la concentración 900 mg/mL, reportando un DI_{50} de 1004.89 ± 76 mg/mL; los péptido <30 kDa mostraron un aumento en la viabilidad de 10%, a la concentración de 500 mg/mL, con respecto al control, y una disminución significativa a partir de la concentración de 1500 mg/mL. Comparando las muestras con cisplatino, solo los péptidos <30 kDa, en la concentración mayor de 3000 mg/mL, mostró mayor efecto que el fármaco a la concentración 30 μ g/mL; mientras que en el caso de paclitaxcel, ninguna de las muestras logró superar este compuesto.

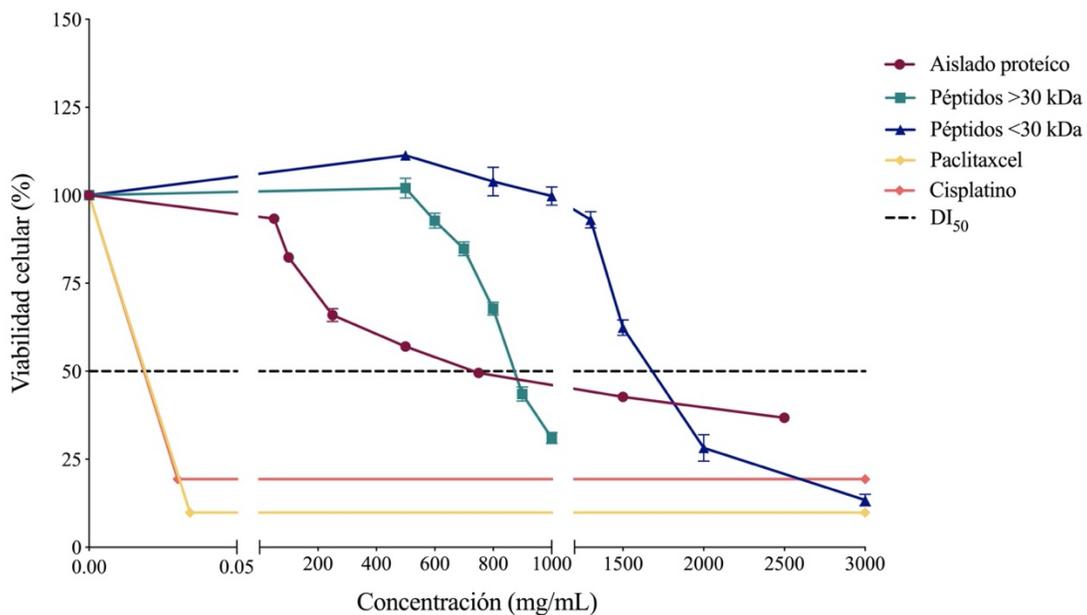


Figura 16 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 48 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

El efecto antiproliferativo a las 72 h de exposición se muestran en la Figura 16 y Tabla 14-C, evidenciando que la disminución de la viabilidad es continua al paso del tiempo; el aislado proteico disminuye significativamente menos del 50% a partir de la concentración 100 mg/mL y continúa disminuyendo hasta aproximadamente 80% a la concentración de 2500 mg/mL, determinándose la DI_{50} de 82.916 ± 16.08 mg/mL; en los péptidos >30 kDa hay una disminución continua hasta disminuir más de 50% a partir de la concentración 900 mg/mL. Los péptidos <30 kDa lograron una reducción significativa de la viabilidad en las concentraciones más altas evaluadas; en comparación de los controles positivos, cisplatino y paclitaxel lograron disminuir la viabilidad entre el 80 y 90% respectivamente, solo a las concentraciones máximas analizadas de aislado proteico y péptidos <30 kDa, lograron obtener un efecto similar al mostrado por los controles positivos.

El efecto del tiempo sobre la viabilidad se muestra en la Tabla 14, para el aislado proteico (tabla 14-A), las concentraciones 100, 500 y 1500 mg/mL mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tres tiempos de exposición (24, 48 y 72 h); las concentraciones 250 y 750 mg/mL sólo mostraron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a las 24 h de exposición y la concentración máxima sólo mostró diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las 48 y 72 h de exposición. Con respecto a los péptidos >30 kDa (Tabla 14-B), las concentraciones de 500 y 600 mg/mL, mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a las 24 y 72 h de exposición; a la concentración de 700 mg/mL se mostró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes tiempos de exposición; a 800 mg/mL de éste péptido, mostró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los tres tiempos de tratamiento y a la concentración máxima analizada, se presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre 24 y 48 h, así como entre 48 y 72 h. En el caso de los péptidos <30 kDa (Tabla 14-C), las concentraciones de 1000 y 1500 mg/mL mostraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tres tiempos de exposición, en las concentraciones de 3000 mg/mL de muestra no se observó diferencia significativa en ninguno de los tiempos de estudio.

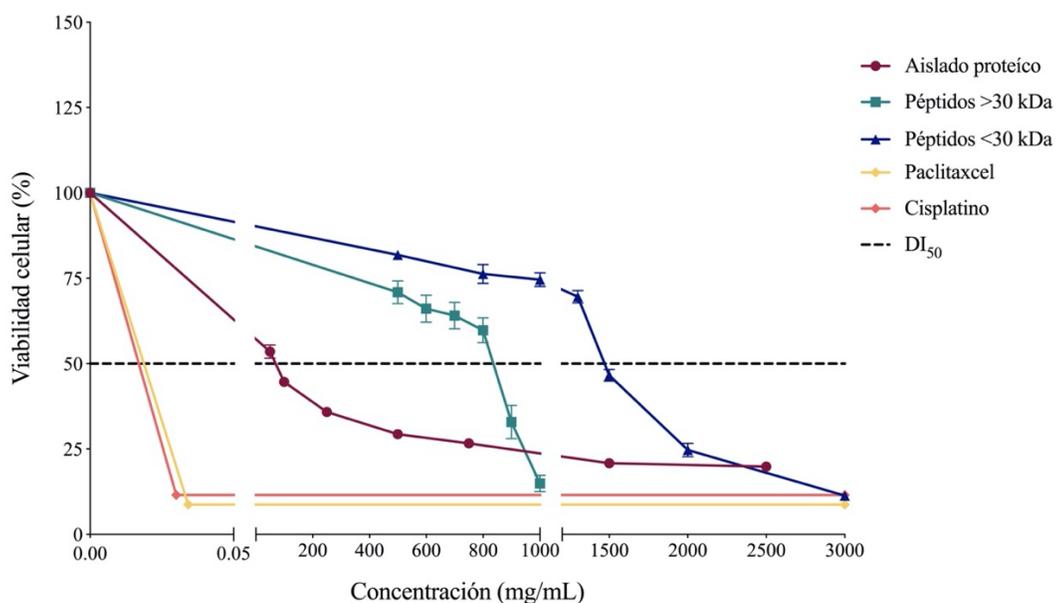


Figura 17 Efecto antiproliferativo del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto y controles positivos en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) después de 72 h de exposición. Los valores representan la media \pm DE, de tres experimentos independientes.

Tabla 14 Análisis estadístico de los ensayo de citotoxicidad y antiproliferativos en porcentaje de viabilidad celular del aislado proteico y péptidos obtenidos de semilla de amaranto en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa)

A) Aislado proteico

Concentración (mg/mL)	Viabilidad (%)					
	24 h		48 h		72 h	
0	100 \pm 0	a	100 \pm 0	a	100 \pm 0	a
50	A 82.1 \pm 0.91	b	B 93.4 \pm 4.5	b	C 53.5 \pm 6.8	b
100	A 62.5 \pm 5.7	b	B 82.4 \pm 3.8	b	C 44.6 \pm 4.6	c
250	A 58.9 \pm 10.8	c	A 66 \pm 6.3	c	B 35.9 \pm 3.3	d
500	A 44.3 \pm 4.7	c	B 57 \pm 2.7	d	C 29.3 \pm 2.3	e
750	A 36 \pm 8.8	d	A 49.5 \pm 3.8	d	B 26.7 \pm 3.4	e
1500	A 30.5 \pm 6.3	d	B 42.7 \pm 2.8	e	C 20.8 \pm 1.9	e
2500	A 28.8 \pm 11.2	e	A 36.8 \pm 1.59	E	B 19.9 \pm 2.3	e

B) Péptidos >30 kDa

Viabilidad (%)									
Concentración (mg/mL)	24 h			48 h			72 h		
0		100±0	a		100±0	a		100±0	a
500	A	104.5±8.7	b	AB	102±9.8	a	B	70.9±11.6	b
600	A	79.8±37.7	c	AB	92.8±6.7	a	B	66.1±13.7	b
700	A	72.2±34.1	d	B	84.8±6.2	b	C	64.1±12.3	b
800	A	65.2±32.5	d	B	67.8±5.7	b	B	59.8±11.5	b
900	A	37.8±17.9	e	B	43.5±6.5	c	AB	32.9±15.4	c
1000	A	31.5±2.5	e	A	31±5.6	c	B	14.9±7.8	c

C) Péptidos <30 kDa

Viabilidad (%)									
Concentración (mg/mL)	24 h			48 h			72 h		
0		100±0	a		100±0	a		100±0	a
500	A	108.2±7.2	b	B	111.3±1.6	b	A	81.8±2.9	a
800	A	109.5±5.1	b	A	103.9±14.1	b	B	76.3±9.6	a
1000	A	84.2±39.8	b	A	99.8±8.1	b	B	74.6±6.3	a
1300	A	84.3±27.3	a	B	93±7.4	b	A	69.6±5.8	b
1500	A	76.7±36.2	a	B	62.4±6.9	b	C	46.6±5.4	b
2000	A	72.1±34.2	c	B	28.2±11.8	c	B	24.7±6.1	c
3000	A	70.6±33.3	d	A	13.4±5.7	c	A	11.3±2.6	d

A B C: Letras mayúscula diferentes indican diferencias entre los diferentes tiempos de tratamiento en la misma concentración ($p < 0.05$). a b c: Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre las diferentes concentraciones en el mismo tiempo ($p < 0.05$). Los valores representan la media \pm DE de tres ensayos realizados independientemente.

9.3.6.3.3 Dosis inhibitoria media (DI₅₀) en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa).

En la Tabla 15 se muestra el cálculo de la DI₅₀ para las muestras estudiadas; el aislado proteico mostró la mayor toxicidad en los tres tiempos empleados de exposición, seguido de los péptidos >30 kDa y los que mostraron menor toxicidad fueron los péptidos <30 kDa. La disminución de la viabilidad tanto en el aislado como en los péptidos fue de manera dependiente al tiempo y a la dosis utilizada. Se observa que el efecto antiproliferativo y citotóxico fue mayor a las 48 y 72 h de tratamiento.

Tabla 15 Dosis inhibitoria media (DI₅₀) determinadas en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) tratada con aislado proteico y péptidos obtenidos de las semillas de *A. hypochondriacus*.

		Viabilidad (%)								
		24 h			48 h			72 h		
Aislado proteico	mg/mL	A	768.6±73.8	a	B	439.7±151	a	C	82.916±16.08	a
Péptidos >30 kDa	mg/mL	A	1086.7±70.6	b	A	1004.89±76	b	B	631.56±23.57	b
Péptidos <30 kDa	mg/mL	A	5345.1±265	c	B	1827.52±143	c	C	1498.33±95.1	c
Paclitaxel	µg/mL	A	21.06±1.53	d	A	13.09±0.343	d	A	12.32±0.43	a
Cisplatino	µg/mL	A	30.93±0.75	d	A	18.39±0.292	d	A	14.09±0.30	a

A B C: Letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre tiempo de tratamiento en el mismo compuesto (p<0.05). **a b c:** Letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los compuestos en el mismo tiempo (p<0.05). Los valores representan la media ± DE de tres repeticiones realizadas independientemente.

9.3.6.4 *Microscopía electrónica de transmisión (MET) en la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) tratadas con aislado proteico.*

El cambio morfológico es una de las características de las células cancerosas, por lo tanto, para evaluar el daño ocasionado por el aislado proteico, se observaron los cambios morfológicos en las células de cáncer de cérvix (SiHa) comparando las células no tratadas y las células tratadas con aislado proteico a una dosis 82.9 mg/mL (DI₅₀) después de 72 h de exposición, en la Figura 18 se muestran los resultados del estudio de MET; en la Figura 18-A se muestra la microfotografía de las células control, en la cual se observan un grupo de células pleomórficas, con presencia de mitocondrias, núcleo, citoplasma y membranas delimitadas; mientras que la Figura 18-B muestra la destrucción celular, ya que hay una pérdida de organelos como núcleo, mitocondrias y una destrucción de la membrana celular, los cuales son señalados por flechas.

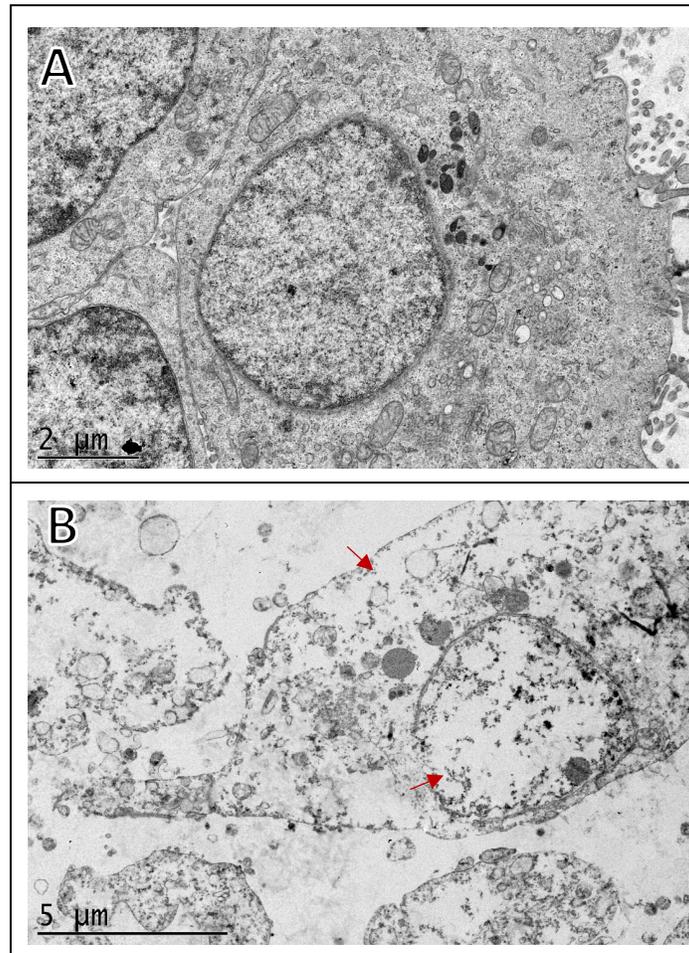


Figura 18 Análisis con microscopico electrónico de transmisión (TEM) de la línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) cultivada durante 72 h (A) Sin tratamiento (control negativo) y (B) Tratada con el aislado proteico a una dosis 59.1 mg/mL (DI₅₀).

10 DISCUSIÓN

10.1 Análisis proximal

La composición química proximal de las semillas empleadas mostraron que la humedad presentó un valor de $3.25 \pm 0.32\%$ menor al reportado de 9.6% , como media para las cuatro especies predominantes de amaranto *A. cruentus*, *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*, y *A. hybridus* (32), y al valor reportado en la quínoa (7.8%) (37); por otro lado fue mayor que el reportado para el frijol lima *Phaseolus lunatus* (3.17%) (132); la humedad es uno de los factores principales para la calidad y conservación de los componentes presentes en las semillas, lo que es un indicativo en la calidad y vida media la semilla de las semillas empleadas (133).

Los niveles de carbohidratos fueron de $69.62 \pm 0.68\%$, el cual es similar a los reportados en la misma especie ($62-69\%$) (61,134,135) y menor a lo reportado para otros cereales como el maíz (72.8%), trigo (65.7%) y sorgo (70.1%) (136), los carbohidratos constituyen la principal parte de la semilla, siendo el almidón el carbohidrato más importante presente en las semillas empleadas (50). Por otro lado, la concentración de lípidos fue de $4.21 \pm 0.23\%$, lo cual se encuentra en el rango de los reportados en la especie de Amaranto ($4.1-8.1\%$) (137,138), con valores más altos en comparación del maíz (5.2%), y más bajos que el trigo (2.7%) y sorgo (4%) (136).

La concentración de proteínas totales con un valor de $15.8 \pm 0.38\%$ se encontró en el rango reportado por Rodas y Bressani (139) para la especie *Amaranthus* el cual se reportó en el rango de $14.5-15.9\%$, y con un valor más alto a otros tipos de cultivos como maíz (9%), centeno (13%), trigo sarraceno (12%), arroz (7%) y la quínoa (15%), por lo que como se ha indicado en diversos reportes, el grano de amaranto es una buena fuente de proteínas al cumplir con los requisitos diarios recomendados para los humanos para el consumo de proteínas. Debido a alto porcentaje proteico, la semilla de amaranto se considera una buena fuente de proteínas de alta calidad y es una materia prima óptima para la obtención de concentrados proteicos (extractos, aislados o péptidos) (50).

Como se pudo observar, los resultados en el análisis proximal de la semilla utilizada en este trabajo, se encontraron valores similares a los reportados previamente por otros autores, destacando que el porcentaje de proteína es más alto que el de otros cereales, por lo que fue una materia prima óptima para la obtención del aislado proteico y péptidos con alto valor

biológico sin embargo, las variaciones encontradas se pueden atribuir a la procedencia de la semilla, la variedad, las diferentes en condiciones climáticas en el cultivo, almacenamiento y procesamiento de la semilla (140,141).

10.2 *Proceso de obtención de los péptidos*

Para el proceso de extracción se utilizó el método salting in-out con sulfato de amonio basado en la solvatación preferencial metodología de precipitación selectiva (10,142,143) y se determinó la concentración de proteínas solubles utilizando el ensayo de Bradford, en el extracto proteico se obtuvo un valor de 182.6 ± 2.3 mg/g, lo cual es esperado, dicho resultado concuerda con lo reportado por Singh *et al.* (144) quienes realizaron un proceso de extracción similar ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80%) en las especies de amaranto *A. spinosus* y *A. caudatus* reportándose valores de 108 y 194.4 mg/g respectivamente; las diferencias observadas podrían deberse a las especies estudiadas y a la metodología utilizada para la cuantificación proteica.

Las proteínas vegetales albúminas y globulinas, las cuales son las más abundantes en la semilla de amaranto, han mostrado mayor solubilidad en soluciones acuosas y salinas, respectivamente (10,38,39,142,145), estos estudios respaldan que el aislado proteico obtenido en el presente estudio contiene un alto contenido de globulinas, ya que se obtuvo mediante una extracción en solución salina amortiguada, por lo que preferentemente se obtuvieron este tipo de proteínas, las cuales fueron las de interés en este trabajo, ya que es donde se encuentra un mayor número de proteínas y péptidos bioactivos, como enzimas, lectinas, lunasina, inhibidores enzimáticos entre otras (44,46,146,147); se obtuvo una concentración de 182.6 ± 2.3 mg/g en el extracto proteico y 169.8 ± 3 mg/g en aislado proteico, el cual es mayor a lo reportado por Kaur *et al.* (148), en donde se reportó 36.94 y 25.20 mg/g de proteína soluble para el extracto y aislado proteico respectivamente en la variedad de *A. viridis*. Avanza y Añón (147) reportaron valores menores empleando precipitación isoeléctrica, el cual es uno de los métodos más utilizados para la obtención de aislados proteicos, en donde se reportó 92.0-98.0 mg/g en la misma variedad de amaranto (146); por otro lado, la separación secuencial basado en la polaridad de las proteínas (145) informó una concentración de 173.5 mg/g en las semillas de *A. hypochondriacus*, lo cual deja ver que las diferencias entre los valores dependen del proceso y condiciones en la cual se obtiene el aislado proteico, indicando que el método empleado en el presente trabajo obtiene mayor rendimiento; esto fue confirmado por Bejarano-Luján y Netto (149), quienes

concluyeron que la precipitación isoelectrica tiene efectos negativos sobre la composición, solubilidad y estabilidad térmica, afectando la estructura molecular de la proteína, y dando como resultado alteraciones en las propiedades funcionales, lo que evidencia que la metodología empleada reporta correlaciones fuertes entre la solubilidad y las propiedades intrínsecas de las proteínas (142); por otra parte Bojórquez-Velázquez *et al.* (145) demostraron que el *A. hypochondriacus* contiene una mayor fracción de proteínas hidrofílicas que el de otras especies como *A. powellii*, *A. hybridus* o *A. cruentus*; mientras que Segura-Nieto *et al.* (150) reportaron que la fracción de proteínas solubles está compuesta principalmente por albúminas-globulinas (51%) y globulinas (15.9%) y la fracción insoluble es cuantitativamente insignificante con respecto a la proteína total aislada.

Los aislados proteicos pueden modificarse enzimáticamente mediante el proceso de hidrólisis, paso fundamental para la obtención de péptidos bioactivos (151). En el presente estudio, el rendimiento en masa (peso de hidrolizado en gramos / peso del aislado proteico en gramos) del hidrolizado (99%), fue mayor, en comparación al reportado por Montoya-Rodríguez *et al.* (152) de 31% p/p en la misma especie de amaranto; dichas variaciones podrían deberse al tiempo de hidrólisis empleado y a las modificaciones realizadas en la metodología de hidrólisis; por otro lado Ayala-Niño *et al.* (153) describieron que una hidrólisis con enzimas combinadas aumentan la concentración de péptidos, en comparación de hidrólisis con una sola enzima; y que el grado de hidrólisis depende de la naturaleza de la proteína empleada y de la especificidad de las enzimas utilizadas. En un trabajo reportado por Montoya-Rodríguez *et al.* (4) recopila información de péptidos ya descritos en la literatura, clasificados por su peso molecular, frecuencia de ocurrencia y su actividad biológica; mostrando péptidos que presentaron actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), seguida de la actividad inhibitoria de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) y actividad antioxidante, otras de las actividades reportadas pero con menos frecuencia son anticancerígenas, antitrombóticas y estimulantes de la captación de glucosa (4); dicha información deja en claro que péptidos obtenidos por hidrólisis pueden presentar diversas funciones biológicas, por lo que se podría asumir que los péptidos obtenidos en el presente trabajo podrían reportar algunas de las actividades biológicas antes descritas.

10.3 Caracterización de compuestos presentes en el extracto proteico, aislado proteico y péptidos de *A. hypochondriacus*.

10.3.1 Actividad hemaglutinante

Las lectinas son un complejo de proteínas de origen globular, con la propiedad de unirse de forma específica y reversible a carbohidratos, con la característica de aglutinar las células con las que se unen (154). Las lectinas de origen vegetal constituyen entre el 2 y el 10 %, de las proteínas totales, almacenadas principalmente en los cotiledones y endospermo de la semilla (155). Se evaluó la actividad hemaglutinante en eritrocitos humanos mostrando el título de hemaglutinación más alto en eritrocitos humanos tipo AB+, Singh *et al.* (144) reportaron actividad hemaglutinante en eritrocitos AB, de dos especies de amaranto *A. Caudatus* (14.08 AH/g) y *A. spinosus* (12.74 AH/g), siendo estos resultados mayores a los obtenidos en el presente trabajo (7 ± 0.1 AH/g); mientras que otro estudio realizado en *A. Caudatus* empleando eritrocitos A y O, reportaron una actividad de 2.6 AH/g en ambos tipos de eritrocitos, mientras que en eritrocitos AB los valores fueron similares (3.50 ± 0.04 AH/g) a los del presente trabajo (156); en comparación con semillas de leguminosas como chícharo (546.13 AH/mg) y frijol tipo flor de mayo (8573.1 AH/mg) se obtuvieron valores mayores a los encontrados (157). Estos resultados respaldan lo reportado en el presente estudio sobre que las lectinas presentes en extracto y aislado proteico obtenido de las semillas de amaranto tienen considerablemente importante actividad hemaglutinante.

Para evaluar la afinidad a los residuos de carbohidratos se emplearon eritrocitos humanos tipo O+, A+ y B+, con lo cual se comprobó que lo reportado anteriormente y lo obtenido en el presente trabajo indicando que las lectinas que se encuentran presentes en las semillas de amaranto presentan especificidad hacia N-acetilgalactosamina (156,158,159), carbohidrato presente en los eritrocitos humanos tipo A+, con una actividad mayor a la reportada para la lectina de *Vicia villosa* (3.50 AH/mg) (39), lectina con afinidad hacia el mismo tipo de azúcar. Lo que indica que las lectinas obtenidas en el presente estudio corresponden a la familia de lectinas específicas del amaranto (Amarantina) que representan entre 3-5% de la proteína soluble total (156), y que las diferencias ente los valores obtenidos de las diversas fuentes implican que aunque ambas son inmunoquímicamente reactivas y con una afinada al mismo carbohidrato, está difieren en la forma en la que se acoplan al carbohidrato, debido a su conformación: estructura y sitios de unión (160). En el caso de los péptidos la actividad

hemaglutinante no fue detectada, lo que podría deberse al proceso de obtención de los mismos y a la pérdida de la estructura por lo que la unión al carbohidrato no puede realizarse.

10.3.2 Actividad hemolítica

Los efectos biológicos de las saponinas son atribuibles a su capacidad para permeabilizar membranas celulares (161), en la semilla de amaranto estas representan entre el 0.09-0.10 % de la composición total (162). En el presente trabajo se evaluó la actividad hemolítica en eritrocitos humanos reportando 80 UH/mg; resultado similar fue reportado por Zehring *et al.* (163) quienes purificó mediante HPLC de un extracto crudo de las semillas de *A. hypochondriacus* el cual presentó actividad hemolítica en eritrocitos humanos; en comparación con otras leguminosas como la alfalfa, Oleszek (164) reportó 36 UH/mg en eritrocitos de ratón, mientras que Gestetner *et al.* (165) reportaron 57 UH/mg en un extracto acuoso de soya en eritrocitos de carnero, siendo la capacidad hemolítica de estos cereales menor al reportado por el amaranto. Las diferencias encontradas entre el presente trabajo y los resultados reportados por otros autores, están relacionados con las características estructurales, ya que la actividad hemolítica no puede atribuirse a una sola parte de la estructura (aglicona + azúcar) si no a la combinación de ambos (166); en las semillas de amaranto se han descrito alrededor de 7 tipos diferentes de saponinas triterpenoides con restos de azúcar idénticos que consisten en ramnosa, glucosa y ácido glucurónico (163); lo que respalda que los efectos observados en la prueba de hemólisis son debido a las características estructurales reportadas previamente y que las saponinas presentes en el extracto y aislado proteico logran interactuar con el colesterol de la membrana lipídica, formando complejos insolubles y reorganizando la arquitectura de la membrana para generar poros y aumentar la permeabilidad provocando la alteración del equilibrio Na^+/K^+ (161,163). En el caso de los péptidos la actividad hemolítica no fue detectada, lo que podría deberse al proceso de obtención de los mismos y a la pérdida de la estructura de saponina la cual se ha descrito anteriormente que es fundamental para lograr su función hemolítica.

10.3.3 Compuestos de origen fenólico

Los compuestos fenólicos comprenden una gran variedad de sustancias con un grupo hidroxilo (-OH) presente en los anillos fenólico. En estudios previos se han identificado diversos ácidos fenólicos y flavonoides, incluidos los taninos (TAN) y antocianinas (ANT), en varias especies de amaranto (50); la semilla empleada resultó contener una mayor cantidad

de fenoles totales (FT) a lo reportado anteriormente, respaldado por Milán-Carrillo *et al.* (70) y Paško *et al.* (167) quienes evaluaron el contenido fenólico total en dos especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* reportando entre 5.66-6.95 y 4.246-4.64 mg EAG/g respectivamente; y con otros cereales como el trigo (3.5-15.05 mg EAG/g), cebada (12.23 mg EAG/g) y avena (10.22-11.93 mg EAG/g) (168), estas diferencias podrían deberse a la variedad de semilla, las condiciones de cultivo, época de cosecha, entre otros factores que pueden influir en la concentración de metabolitos.

Los taninos (TAN) compuestos de origen fenólico de gran peso molecular, a los que se les atribuye la resistencia a las plagas, evitan el deterioro del grano y contribuyen al sabor amargo y a la astringencia (169,170). Mustafa *et al.* (171) reportaron que la totalidad de la concentración de taninos en la especie *A. hypochondriacus* es de origen hidrolizable. En el presente estudio se reportaron valores similares a los publicadas por Gorinstein *et al.* (62) en el cual comparan la cantidad TAN en diferentes cereales y pseudo-cereales como la soya (0.034% MEC), arroz (0.035% MEC), trigo sarraceno (0.322% MEC), quínoa (0.051% MEC) y tres especies de amaranto *A. hybridus* (0.087% MEC), *A. cruentus* (0.120% MEC) y *A. hypochondriacus* (0.060% MEC).

Otro de los compuestos de origen fenólico evaluado en el presente trabajo fueron las antocianinas (ANT), estos son responsables de los pigmentos en las plantas, la acumulación principal ocurre en las hojas donde la luz provoca daño celular y estos actúan como protectores (172); el presente estudio reportó valores menores a los publicados López *et al.* (173) en la misma especie de amaranto (35.33 ± 1.70 mg Cy3gl/g), y mayores en comparación con cereales como el arroz negro (3.5 mg Cy3gl/g), cebada (0.27 mg Cy3gl/g), sorgo (0-0.68 mg Cy3gl/g) (174).

Los resultados corroboran que la semilla de amaranto contiene una serie de fitoquímicos, incluidos compuestos fenólicos, taninos, entre otros; Repo-Carrasco-Valencia *et al.* (175) reportaron que la proporción soluble de compuestos de origen fenólico varía entre 7 y 61% en tres especies de granos incluido el amaranto; por lo que se puede considerar que el consumo de amaranto tiene importantes beneficios para la salud en la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer debido al aporte de compuestos fenólicos, además se considera que los extractos de fuentes naturales son fuente de antioxidantes naturales (176); por otro lado la diferencia entre los resultados previamente publicados podrían deberse a las características propias del cultivo como las diferencias entre variedades, el lugar de

procedencia de la semilla, el dinamismo temporal de captura de recursos dentro de la temporada de crecimiento y la coexistencia planta-planta (140,141,177); sin olvidar a la metodología empleada para su extracción, Santos *et al.* (178) informaron que los disolventes orgánicos tales como metanol, etanol, acetona o acetonitrilo son la mejor elección para la extracción de compuestos fenólicos, sin embargo en el presente trabajo, la cuantificación de los compuestos fenólicos se realizaron a partir del extracto y aislado proteico, que fueron obtenidos mediante una base acuosa, lo que implica que hay una pérdida de estos compuestos a lo largo de la obtención, y solamente una fracción de los compuestos fenólicos se conservan. Por otro lado, se ha reportado que, entre los compuestos fenólicos como los taninos, y las proteínas se pueden unir formando complejos fenol-proteicos.

En los compuestos de origen fenólico presentaron correlaciones positivas y fuertes con las lectinas y las saponinas tanto en el extracto como en el aislado proteico, Nagy *et al.* (179) reportaron en un estudio *in vitro* que las proteínas pueden unirse a los compuestos fenólicos de manera no covalente y reversible; por lo que se puede indicar que en el presente trabajo estas estructuras se formaron concluyendo que las características estructurales importantes para la formación del complejo fenol-proteico son: peso molecular, flexibilidad estructural y número de grupos -OH (180–182); la formación de los complejos fenol-proteína se ha relacionado con la disponibilidad limitada de proteínas y de ciertos aminoácidos, cambiando la estructura y afectando su funcionalidad, sin embargo, este efecto depende la fuerza de unión del complejo, por otro lado algunas de estas uniones podrían ser favorables para el transporte de los compuestos de origen fenólico a través del tracto gastrointestinal protegiéndolos de las enzimas degradadoras o reacciones oxidantes (183).

La disminución de la capacidad antioxidante y el estrés oxidativo son factores de riesgo para la evolución o el desarrollo de ciertas enfermedades, los compuestos de origen fenólico son metabolitos secundarios en las plantas y un grupo de antioxidantes naturales que han reportado con datos epidemiológicos evidencia de sus efectos positivos sobre la salud humana (184).

10.3.4 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C, es una molécula de 6 carbonos, y un sustrato para la disminución de las especies reactivas de oxígeno (185). Los valores reportados en el presente estudio fueron similares a los reportados por Tamer *et al.* (186) quienes evaluaron el efecto

de diferentes tratamientos sobre el contenido de ácido ascórbico en las especies *A. caudatus* y *A. cruentus* reportando valores de 29.8 y 23 mg AA/kg respectivamente, mientras que en comparación de otros cereales como la quínoa (23.39 mg AA/kg), el trigo (11.97 mg AA/kg) y un aislado proteico de *Lupinus albus* var. *Multolupa* (fabaceae) (0.65 mg AA/kg), los valores fueron más altos lo que respalda que el amaranto es buena fuente de ácido ascórbico (187–189); el mismo estudio realizado por Tamer *et al.* (186) evidencia que el ácido ascórbico se puede oxidar y descomponer durante los procesos de preservación, almacenamiento y tratamiento; lo que corrobora los bajos valores obtenidos en el presente estudio para las muestras de aislado y los péptidos.

10.3.5 El aislado proteico y péptidos de *A. hypochondriacus* mostraron actividad antioxidante

La capacidad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, debido a su capacidad para reaccionar con los radicales libres (190). El presente trabajo reportó una actividad antioxidante en el aislado proteico menor a la reportada por Repo-Carrasco-Valencia (191) la actividad antioxidante fue cuantificada en dos variedades de amaranto; por el radical DPPH• con 410 μM TEAC/g para *A. Caudatus* “centeno” y 398 μM TEAC/g para *A. Caudatus* “oscar blanco” y por el radical ABTS•⁺ con 827.6 μM TEAC/g para *A. Caudatus* “centeno” y 670.1 μM TEAC/g para *A. Caudatus* “oscar blanco”. En comparación de otros cereales y leguminosas los valores encontrados en el presente estudio para el aislado proteico obtenido de *A. hypochondriacus* fueron menores a los reportados en el trigo sarraceno (ABTS•⁺: 12000 μM TEAC/g) (192); mientras que Buitrago *et al.* (193) reportó valores similares a los obtenidos en quínoa (DPPH•: 72.1 \pm 11.1 μM TEAC/g), de la misma manera que los reportados para el frijol flor de mayo (DPPH• : 82.18 \pm 4.80 μM TEAC/g) (194).

Por otro lado, la capacidad para reducir el ion férrico (FRAP) del aislado proteico obtuvo valores similares a los reportados en la variedad *A. Cruentus* (31.01 μM Fe²⁺/g) (192) y en comparación con otras semillas los valores encontrados en el presente estudio fueron similares a los reportados en quínoa (35.2 \pm 17.79 μM Fe²⁺/g), la lenteja (22.3 \pm 0.51 μM Fe²⁺/g) y mayores a los de la soja (8.34 \pm 0.54 μM Fe²⁺/g) y frijol rojo (19.83 \pm 0.62 μM Fe²⁺/g) (193–196).

Se han realizado diversos reportes sobre propiedades antioxidantes del amaranto, debido a las diferentes metodologías de extracción empleadas y las diversas variedades de amaranto los valores son difíciles de contrastar; por lo que el uso del IC₅₀ es más informativo en razones de comparación. Conforti *et al.* (197) reportaron valores mayores a los obtenidos en el presente trabajo en dos variedades de *A. Caudatus* “victor red” (IC₅₀ de 62 µM /mL) y en *A. Caudatus* “oscar blanco” (IC₅₀ de 50 µM /mL) en el ensayo DPPH•. En comparación a los valores encontrados para el aislado proteico de *A. hypochondriacus* la quínoa reportó valores mayores de IC₅₀ en el ensayo de ABTS•⁺ (2540 µM /mL) y en el ensayo de DPPH• (580 µM /mL), al igual que el reportado por las lentejas (DPPH•: 143.7 µM /mL), alforfón (DPPH•: 76.5 µM /mL) y cebada (DPPH•: >200 µM /mL) (195,197,198). Por lo que se puede concluir que la semilla de la variedad *A. hypochondriacus* es una buena fuente de antioxidantes y presenta un potencial reductor.

En el presente trabajo se encontró correlaciones fuerte y positiva entre los FT, las lectinas y la actividad antioxidante mediada por el radical ABTS•⁺ en el aislado proteico; esta relación podría deberse a la formación de complejos proteico-fenólicos descritos previamente y las bio-actividades atribuidas a los compuestos de origen fenólico, An-Na *et al.* (199) correlaciona que los compuestos de origen fenólico son los principales contribuyentes de la capacidad antioxidante; corroborando lo reportado en el presente trabajando evidenciando que la actividad antioxidante está ligada con la cantidad de compuestos de origen fenólico presentes en la semilla logran inhibir la formación de radicales libres (ERO), interrumpiendo reacciones de auto-oxidación de cadena, reduciendo el peróxido de hidrógeno a compuestos estables, quelar iones metales, inhibir las enzimas prooxidativas endógenas así como activar las enzimas antioxidantes endógenas (200), intuyendo parte del mecanismo antioxidante observado en el presente trabajo.

Se ha descrito que, ya sea durante la digestión gastrointestinal o hidrolisis *in vitro* se producen péptidos que podrían tener bioactividad; tales como antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, entre otras (4). Ayala-Niño *et al.* (153) reportaron valores menores a los obtenidos en el presente estudio en la actividad antioxidante en mediada por los ensayos DPPH y FRAP (3.88 µM TEAC/g y 5.92 µM Fe²⁺/g, respectivamente), en péptidos hidrolizados de la misma especie de amaranto (*A. hypochondriacus*); al igual que Orsini *et al.* (201) quienes reportaron valores menores a los del presente estudio en péptidos (3-19 kDa) en la variedad *A. mantegazzianus* en el ensayo de ABTS•⁺ (IC₅₀: 1.36 ± 0.26 mg/mL);

por otro lado Ngoh *et al.* (202) hidrolizaron péptidos de *Phaseolus vulgaris* variedad pinto reportando valores similares a los obtenidos en el presente estudio en péptidos 30-50 kDa ($7.39 \pm 4.95 \mu\text{M TEAC/g}$) y mayores en péptidos 10-30 kDa ($0.38 \pm 0.02 \mu\text{M TEAC/g}$) en el ensayo de ABTS \bullet^+ , en este mismo estudio se evaluó la capacidad para reducir el ion férrico (FRAP) reportando valores menores a los obtenidos en el presente estudio; por otro lado Phongthai *et al.* (203) hidrolizaron péptidos (<10 kDa) de salvado de arroz analizando la capacidad antioxidante por los ensayos de ABTS \bullet^+ ($43.98 \pm 4.01 \mu\text{M TEAC/g}$), DPPH \bullet ($330.82 \pm 3.60 \mu\text{M TEAC/g}$) y FRAP ($80.87 \pm 3.82 \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{g}$) reportando mayores valores a los obtenidos en presente trabajo en los péptidos <30 kDa; estos resultados respaldan lo expuesto en el presente trabajo, que los péptidos presentan actividad antioxidante respaldado por lo descrito por Samaranayaka *et al.* (204) quienes reportaron la posibilidad de completar el sistema antioxidante con antioxidantes exógenos en forma de péptidos.

Se encontró una concordancia en los resultados reportados en el presente trabajo y lo descrito previamente donde se evidencia que los péptidos de menor peso molecular presentan mayor capacidad antioxidante; y que existe una la relación entre la actividad antioxidante y el tamaño de los péptidos (entre 5 y 16 residuos), así como en la composición de éstos, ya que aminoácidos como Tyr, Try, Met, Lys, Cys e His son los que presentan actividad antioxidante (94,102,153,205), mientras que se ha reportado que los péptidos sintetizados que contengan los fragmentos activos, Tyr-His-Tyr y Pro-His-His son efectivos para estabilizar las ROS (206). En amaranto se ha reportado altas concentraciones de aminoácidos esenciales como Lys, Phe/Tyr, Met/Cys y Trp (30); mientras que Montoya-Rodríguez *et al.* (4) reportaron *in silico* tres posibles secuencias peptídicas antioxidantes en la fracción proteica más abundante, la globulina 11s, empleando pepsina (pH 2.0) como enzima de corte evidenciando que la actividad antioxidante disminuye durante el proceso de obtención de los péptidos; por otro lado Montoya- Rodríguez *et al.* (4,152) demostraron que una muestra no extruida correlacionada con el grado de hidrolisis (tiempo/enzima), reportó mayor actividad antioxidantes; y que la capacidad de eliminar radicales libres se mantiene después de la hidrólisis enzimática, así como que las diferencias obtenidas entre los valores obtenidos y los valores reportados por los autores previamente mencionados podrían deberse a la fuente proteica y a las enzimas empleadas en la hidrólisis.

10.4 El aislado proteico de *A. hypochondriacus* mostró actividad citotóxica y antiproliferativa.

La actividad citotóxica se define como una alteración en las funciones básicas celulares que conllevan a un daño detectable (207); en el presente estudio se analizó la exposición de aislado proteico obtenido de las semillas de amaranto (*A. hypochondriacus*) en diferentes tiempos de exposición (24, 48 y 72 h) mostrando un mejor efecto al reportado por Hastings y Kenealey (208) en compuestos proteicos presentes en la avena en una línea de cáncer de mama (MDA-Me231), donde ninguna de las concentraciones (50, 100, 200 y 400 μ M) ni tiempos probados (48, 72 y 96 h) logró disminuir la viabilidad a menos del 50%; y lo reportado por Pintha *et al.* (209) en un extracto de arroz rojo jazmín, donde a las 48 h no afectó la viabilidad de las células de MDA-MB-231 (cáncer de mama) y HT1080 (cáncer de colón); por otro lado Cho *et al.* (210) reportaron un efecto mayor en comparación del obtenido en presente trabajo en un aislado de harina de trigo en dos líneas de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-Me231), reportando una disminución del 85.1% de viabilidad para MCF-7 y 87.5 % para células MDA-Me231 a las 72 h después del tratamiento a concentración de 100 μ g/mL.

El presente trabajo también mostró que el aislado proteico tiene un potencial antiproliferativo; el aislado proteico exhibió una inhibición del crecimiento promedio de 40.6-83.6% y 6.6-80.1% en el ensayo antiproliferativo (48 y 72 h) contra las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa) respectivamente. Valores similares a los previamente descritos y evidenciado que el efecto citotóxico es prolongado en el tiempo y dependiente de la concentración. Respaldando que el uso de aislados proteicos de fuentes naturales como el amaranto son opción viable, mostrando efectos citotóxicos y antiproliferativas en líneas celulares de cáncer.

La DI_{50} se ha descrito como una unidad que describe la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica, por lo que se considera una unidad comparativa más útil, en el presente estudio se obtuvo DI_{50} de 59.18 ± 12.45 y 82.916 ± 16.08 mg/mL en las líneas celulares de MDA-MB-231 y SiHa respectivamente tratadas con el aislado proteico por 72 h; Sabbione *et al.* (76) reportaron un mejor efecto citotóxico que el observado en el presente estudio, en un aislado proteico de *A. mantegazzianus* (DI_{50} : 1.35 ± 0.12 mg/mL por 72 h), en células cancerosas de colón (HT-29), al igual que Mora-Escobedo *et al.* (114) quienes reportaron en un aislado de proteína de soya en dos líneas celulares cancerosas de cérvix HeLa (DI_{50} :

8.38±0.06 mg/mL por 72 h) y C-33 (DI₅₀: 7.59±0.30 mg/mL por 72 h); por otro lado los resultados observados a las 72h de exposición del aislado proteico en este estudio, reportaron un mejor efecto citotóxico a lo reportado por Lima *et al.* (211) en un aislado soya (DI₅₀ 91.6 g DW/mL) en células cancerosas de colón (HT29); los datos anteriores corroboran los resultados presentados en este trabajo donde se observa que los aislados proteicos obtenidos de fuentes naturales como el amaranto reportan actividad citotóxica, y disminuyen la viabilidad en función de la concentración y el tiempo de exposición. Es preciso mencionar que la DI₅₀ solo es una medida comparativa y no existe una escala que determine la factibilidad del compuesto; debido a que no se trata de un compuesto puro y que se debe comprender la farmacocinética del compuesto y la farmacodinámica de su efecto. Además, se debe investigar la toxicología para averiguar si se puede alcanzar la dosis necesaria de manera segura (212).

Se ha reportado que las lectinas son una herramientas para el diagnóstico, pronóstico y terapia contra el cáncer (213), debido a su interacción con los O-glucanos aberrantes que se expresan en la superficie de las células cancerosas que consisten en glucoproteínas unidas a la membrana (antígenos T y Tn), estos O-glucanos han sido descritos como gluco-marcadores en el diagnóstico y pronóstico del cáncer (28). De especies *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* se ha aislado la lectina amarantina la cual se ha descrito con afinidad para los antígenos T y Tn (90,214,215) Zenteno *et al.* (216) describieron que las lectinas presentes en la variedad *A. leuocarpus* estudiadas presentaron afinidad a los antígenos T y Tn, y demostraron ser una herramienta eficaz para la detección y pronóstico de diversos tipos de cáncer, describiendo en cáncer de mama una fuerte unión, que se correlaciona con los grados de TNM (sitio del tumor primario, la afectación ganglionar regional y la presencia o no de metástasis) (217).

Se encontró una correlación entre la actividad citotóxica, los FT y actividad antioxidante medida por el radical ABTS^{•+}; el presente estudio reportó que la semilla de amaranto presenta altas concentraciones de compuestos de origen fenólico y que estos posiblemente contribuyan a la capacidad antioxidante total mostrada por el aislado proteico (199). Sin embargo, los antioxidantes pueden desempeñar un doble papel, actuando como factores beneficiosos o perjudiciales en las células cancerosa. Una de las principales características de las células cancerosas, es el estado prooxidativo originado por el aumento de la actividad metabólica, activación de oncogenes y la eventual pérdida de p53 (218), el aumento de ROS es importante ya que determina la inestabilidad cromosómica (acumula mutaciones y

delaciones), estimula el crecimiento y la proliferación celular (219); el aislado proteico evaluado en el presente estudio demostró tener una alta actividad antioxidante lo que podría mostrar una disminución de los niveles de ROS intracelular y una expresión elevada de enzimas antioxidantes endógenas reduciendo los efectos secundarios y mejorado el efecto de los medicamentos (220), correlacionado con lo descrito por Moreira *et al.* (221) que describen el potencial de compuestos ricos en polifenoles con actividad antioxidante como terapia adyuvante en cáncer de mama (MCF-7) y colon (LOVO) disminuyendo el crecimiento de células sensibles y resistentes a fármacos; por otro lado se ha descrito el mecanismo de los medicamentos anticarcinogénicos incluido el paclitaxel, el cual induce ROS y alteran la permeabilidad de la membrana mitocondrial al producir H₂O₂, mientras que el cisplatino utilizado para tratar tumores sólidos generando un estrés oxidativo intenso por lo que se ha descrito que la presencia de antioxidante endógenos aumentan la resistencia a los medicamentos (222).

Debido a lo anterior se podría indicar que la actividad citotóxica mostrada por el aislado proteico es debido a un efecto sinérgico y aditivo de compuestos evaluados (lectinas, saponinas y compuestos de origen fenólico) y las proteínas presentes en el aislado proteico, corroborado por Mora-Escobedo *et al.* (114) quienes reportaron que un aislado proteico con presencia de fitoquímicos (isoflavonas, compuestos de origen fenol y saponinas) mostró un mejor efecto citotóxico en comparación de un aislado proteico sin la presencia de fitoquímicos; por otro lado se observó similitud con los estudios previamente reportados en donde se expone que existe una correlación entre la dosis y el tiempo con un efecto sobre la disminución de la viabilidad, pérdida de la integridad de la membrana y la lisis celular (76); lo cual se evidenció al realizar el análisis morfológico a través de la microscopía electrónica de transmisión (MET) en ambas líneas celulares.

10.4.1 Cambios morfológicos de las células MDA-MB-231 y SiHa inducidos por el aislado proteico de A. hypochondriacus

Los daños observados en las células mediante MET, está relacionado con la acción de los compuestos evaluados presentes en el aislado proteico y su participación en la regulación de más de una vía de transducción (223).

Las lectinas vegetales, un grupo único de proteínas y glicoproteínas con potente actividad biológica han reportado propiedades anticancerígenas; utilizadas como agentes

terapéuticos, se unen preferentemente a las membranas de las células cancerosas o sus receptores, provocando citotoxicidad, apoptosis e inhibición del crecimiento tumoral. Estos compuestos pueden internalizarse en las células, provocando la aglutinación y/o agregación de las células cancerosas (224). Se ha establecido que la glicosilación alterada es un fenómeno común en células cancerosas, debido a una regulación positiva de la ruta de la biosíntesis de glicanos en respuesta a oncogenes como Ras, modificando la composición de glicolípidos y glicoproteínas, especialmente en la membrana celular (225). En el presente estudio, la alteración de la membrana observada por MET podría ser resultado de la actividad de las lectinas presentes en el aislado proteico, actividad evaluada y descrita anteriormente lo que concuerda con lo reportado por Al-Mamun *et al.* (226) en extractos de semillas de amaranto de las especies *A. lividus* y *A. hybridus*; al igual que Nachbar *et al.* (120) quienes reportaron que las lectinas aisladas de ricino (*Ricinus commun*), germen de trigo y soya, lograron disminuir el crecimiento celular mediante la aglutinación a consecuencia de una alteración en el transporte de la bomba Na^+/K^+ en carcinoma de ascitis de Ehrlich; describiendo que existe una relación entre el número de sitios de unión para la lectina y su capacidad de aglutinar; mientras que una lectina aislada de *Phaseolus vulgaris* indujo la apoptosis a través de la vía mediada por el receptor Fas, activación de caspasa-8, truncamiento de BID, liberación de p53 y activación de caspasa-9 en células cancerosas de mama (MCF-7) (227).

Otro de los compuestos evaluados en el presente trabajo fueron las saponinas, previamente se describió la capacidad de estos compuestos para formar poros y dañar la membrana mostrado en la Figura 19, lo que apoya el daño observado en las MET en ambas líneas celulares; y se correlaciona con lo reportado por varios autores (228,229), por otro lado se ha descrito la capacidad de estos compuestos para inducir la apoptosis mediante diferentes mecanismos celulares; las saponinas aisladas de amaranto presentan estructura triterpenoide, Shan *et al.* (230) reportó que saponinas triterpenoides aisladas de ginseng desregulan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) inhibiendo la proliferación de células de melanoma; otro reporte indicó que las saponinas triterpenoides derivadas de la raíz shosaiko-to suprimió la proliferación en líneas celulares de cáncer de hígado (PLC / PRF / 5 y HepG2) y cáncer de páncreas (BxPC-3) al inhibir el crecimiento celular y la síntesis de ADN (231). Se puede sugerir que cualquiera de los mecanismos previamente descritos podrían ser ocasionados por el aislado proteico obtenido de *A. hypochondriacus* y ser responsables de

los efectos observados en las MET; por otro lado se puede asumir que una alta concentración de saponinas como la reportada en el presente trabajo debe tener un efecto citotóxico fuerte; cabe mencionar que Wang *et al.* (232) reportaron que no existe correlación entre los mecanismos empleados para la actividad hemolítica y la actividad citotóxica; por lo que se podría plantear la utilización de saponinas como antitumorales desprovistos del efecto no selectivo de la actividad hemolítica.

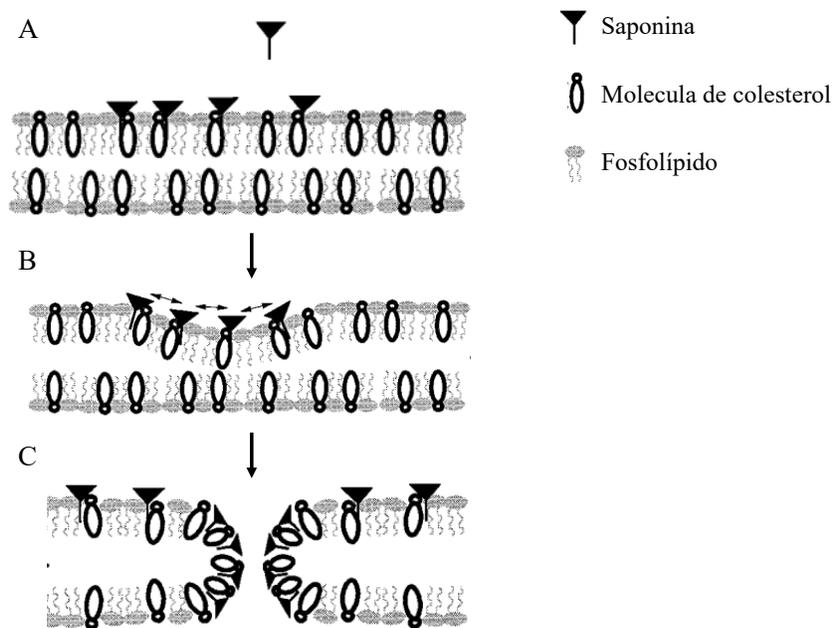


Figura 19 Modelo descrito sobre la formación de poros por saponinas. A) Unión del colesterol y la saponina en la membrana B) Agregación micelar de saponinas y colesterol aumentando de la permeabilidad de la membrana C) Formación del poro

Por otro lado el presente estudio informó el contenido de compuestos de origen fenólico, los cuales han reportado efectos anticarcinogénicas al dirigirse a una amplia variedad de vías de señalización celular a diferentes niveles y la activación de proteínas, generando efectos proapoptóticos, antiinvasivos, proautofágicos o antiproliferativos (220); Lee *et al.* (234) reportaron que los compuestos fitoquímicos de origen polifenol presentes en la curcuma después de 20 h de exposición, dió como resultado un aumento significativo de los niveles de ROS intracelulares en células de cáncer de colon humano (HCT116) y la activación de la vía de señalización MAPK/ERK, la cual podría estar involucrada en la autofagia inducida por curcumina; mientras que otro estudio reportó que los polifenoles presentes en la avena (aventramidas) logran una regulación negativa de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) (235); otro de los compuestos de origen

fenólicos evaluados en el presente estudio fueron los taninos los cuales han reportado mecanismos anticancerígenos, Gollucke *et al.* (236) reportaron que los taninos presentes en las semillas de uva, lograron inducir la apoptosis dependiente de p53, mediante la participación de las proteínas Bax/Bcl-2, la activación de la caspasa-3, y la inhibición de la fosforilación de proteínas pertenecientes a la familia MAPK en células de cáncer de próstata insensibles a andrógenos (DU145) y sensibles a andrógenos (LNCaP), mientras que se ha reportado que el tanino hidrolizable PGG (penta-1,2,3,4,6-O-galloil-beta-D-glucosa) presente en diversas plantas; lograba la detención del ciclo celular en la fase G1 y S y lograba la apoptosis celular mediada por caspasas asociada a la activación de p53 en células de cáncer de próstata (LNCaP) (237) y de mama (MDA-MB-231) (238); por otro lado se ha descrito previamente los polifenoles son los principales contribuyentes de la capacidad antioxidante (199); Shimojo *et al.* (239) demostró que la atenuación de ROS por antioxidantes suprime la metástasis inducida por hipoxia en células cancerosa de páncreas (PANC-1 y MIA PaCa-2), mientras que Muniyun *et al.* (240) refirieron que el aumento de ROS eleva el nivel de proteína p66shc que logra aumentar los niveles de ROS intracelulares en células cancerosas de ovario (OCa), lo que logra una apoptosis dependiente de mitocondrias, debido a la formación de un complejo proteico que permeabiliza ambas membranas mitocondriales liberando citocromo c y activando las caspasas (241); por lo que se puede asumir que los compuestos de origen fenólico modifican los niveles de ROS intracelulares lo que podría estar activando la proteína p66shc, por otro lado un extracto de triphala, formulación de varias semillas, rica en antioxidante y con alto contenido en polifenoles mostró propiedades proapoptóticas independientes del estado de p53, debido a una mayor expresión de Bax en células cancerosa de colón (HCCSC) (242); en conclusión el presente estudio demostró que el aislado proteico obtenido de *A. hypochondriacus* contiene compuestos de origen fenólico y estos son contribuyentes de la capacidad antioxidante reportada; por lo que se puede asumir que alguno de los mecanismos previamente descritos podría estarse llevando a cabo obteniendo efectos aditivos y/o sinérgicos lo que desencadena en el efecto anticarcinogénico observado en las MET de ambas células

10.5 Los péptidos de A. hypochondriacus mostraron actividad citotóxica y antiproliferativa

El presente estudio aisló dos fracciones peptídicas (>30 kDa y <30 kDa) por medio de una hidrólisis enzimática, ambas mostraron efectos citotóxicos y antiproliferativos; Sabbione *et al.* (76) reportó un mejor efecto citotóxico (DI₅₀: 0.30 ± 0.07 mg/mL) que el observado en el

presente estudio, en péptidos de *A. mantegazzianus* en células de cáncer de colon humano (HT-29); al igual que lo reportado por Rayaprolu *et al.* (243), quienes evaluaron dos fracciones peptídicas de semilla de soya con pesos moleculares de entre 5-10 kDa (DI₅₀: 654 µg/mL) y 10-50 kDa (DI₅₀: 678 µg/mL) en células de cáncer de mama (MCF-7) expuestas de 18 a 36 h; por otro lado el presente estudio reportó un mejor efecto citotóxico en comparación a los reportado por Kannan *et al.* (244) quienes indicaron que una fracción peptídica (<5 kDa) de salvado de arroz no presentó actividad citotóxica hasta las 72 h de exposición (DI₅₀ de 77 mg/mL) en células de cáncer de colon (HCT-116); los estudios previamente descritos corroboran lo observado en el presente estudio, el cual reportó que los péptidos de mayor peso molecular presentan mayor actividad citotóxica y un potencial antiproliferativo; mostrando una inhibición del crecimiento promedio de 1-91% y 7.3-86% en el ensayo antiproliferativo (48 y 72 h) contra las líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-231) y cérvix (SiHa) respectivamente; mostrando que el efecto citotóxico es prolongado en el tiempo y dependiente de la concentración; por otro lado también se sugiere que la actividad citotóxica potencial del aislado proteico, resiste la digestión gastrointestinal, generando péptidos con actividad biológica detectable (76).

Se han reportado diversos mecanismos a través de los cuales los péptidos bioactivos derivados de semillas como la soya o el amaranto ejercen su actividad antitumoral (245); la inducción de apoptosis por diversas vías como, activación de p53, desacetilación de histonas o inhibición de las proteínas Bcl-2 (246); modificación de componentes celulares relacionados con la proliferación y supervivencia celular, modificación de permeabilidad o aumento de ROS (247) y regulando el sistema inmune, aumentando la expresión de antígenos o estimulando respuestas inmunitarias innatas (248); uno de los péptidos anticarcinogénico más descrito de origen vegetal es la lunasina, identificado por primera vez en la soya es un péptido de 43 aminoácidos con un peso de 18.4 kDa, que ha reportado inhibición de la proliferación celular, la inhibición de acetilación de histonas, inducción apoptótica mitocondrial y arresto el ciclo celular en la fase G2/M en diferentes tipos de cánceres incluidos mama y cérvix (213); mientras Maldonado-Cervantes *et al.* (74) describen un péptido tipo lunasina originario de la semilla de amaranto (*A. hypochondriacus*) de 22 kDa con alto contenido de residuos de Met y Cys y la capacidad de inhibir la acetilación de histonas H3 y H4, logrando una supresión tumoral debido al efecto que ejerce sobre el ciclo

celular; por otro lado Montoya-Rodríguez *et al.* (4) reportaron *in silico* una posible secuencia peptídica anticarcinogénica en la fracción de la globulina 11s.

La diferencia y variabilidad entre los resultados encontrados en el presente trabajo y los reportados anteriormente tanto en el aislado proteico como en los péptidos podría deberse la diferencia en las metodologías empleadas para obtener las muestras y las diferentes fuentes vegetales empleadas, por otro lado, no se puede concluir si el efecto mostrado tanto del aislado proteico como de los péptidos se deba a que inhiben la proliferación celular (efecto citostático) o bien inducen la muerte celular (efecto citotóxico) ya que en ensayo MTT no permite esta diferenciación (207), junto con las características propias de las líneas empleadas; MDA-Me231 son células de cáncer de mama triple negativas independientes de estrógeno que carecen de la proteína p53 funcional (129,249); la línea SiHa son células de cáncer de cérvix es adenocarcinoma grado II con una copia del virus de papiloma humano 16 con oncogenes p53 y pRB (128).

11 CONCLUSIONES

- El método de extracción y obtención del aislado proteico y los péptidos mostró ser efectiva para conservar los metabolitos secundarios y su actividad.
- Los metabolitos secundarios de la semilla *A. hypochondriacus* evaluados presentaron mayor actividad biológica con respecto a otros pseudocereales.
- La actividad antioxidante se conserva, pero disminuye a través del proceso de obtención de los péptidos, siendo mayor la del extracto y la menor en los péptidos.
- El aislado proteico y los péptidos obtenidos de la semilla de *A. hypochondriacus* presentaron efecto citotóxico y antiproliferativo en las líneas celulares de mama y cérvix.
- El efecto citotóxico en el aislado proteico y péptidos es dependiente del tiempo y de la concentración.
- El potencial antiproliferativo demostró un efecto citotóxico prolongado en el tiempo y dependiente de la concentración.
- El aislado proteico mostró mayor efecto citotóxico en la línea celular de cáncer de mama, seguido de los péptidos > 30kDa, mientras que los péptidos <30 kDa, mostraron el menor efecto citotóxico.
- Se evidencio que el mayor efecto citotóxico lo presentó el aislado proteico, sobre la línea celular MDA-MB-231.
- La presencia de metabolitos secundarios en el aislado proteico, pueden contribuir en la actividad citotóxica observada en ambas líneas celulares.

12 PERSPECTIVAS

- Se propone purificar las lectinas o saponinas presentes en la semilla de *A. hypochondriacus* y evaluar su actividad citotóxica.
- Caracterizar bioquímicamente los péptidos, determinar el peso molecular y la secuencia de aminoácidos.
- Se sugiere seguir investigando, la presencia de otros componentes tanto nutricionales como anti nutricionales en el aislado proteico y evaluar su efecto citotóxico en otras líneas celulares normales y cancerosas, así como pasar a un modelo *in vivo*.
- Se plantea determinar si los mecanismos de citotoxicidad mostrados por el aislado proteico y los péptidos, son apoptóticos, autofágicos o necróticos.
- Aislar otras fracciones proteicas como glutelinas y prolaminas, y evaluar sus componentes y su efecto citotóxico.
- Analizar los mecanismos moleculares de acción del aislado proteico con la finalidad de que puedan considerarse para el posible uso terapéutico en el tratamiento de cáncer.
- Se sugiere aislar el péptido lunasina y evaluar su efecto citotóxico, así como los mecanismos moleculares implicados y las dosis efectivas tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.
- Se plantea obtener otros péptidos de los hidrolizados de las semillas de *A. hypochondriacus* y evaluar si tiene actividad antioxidante, antihipertensiva o anticarcinogénica.

13 REFERENCIAS

1. Secretaría de Salud (SS). Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino [Internet]. México: SS. 2019 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer>
2. Feitelson MA, Arzumanyan A, Kulathinal RJ, Blain SW, Holcombe RF, Mahajna J, *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:S25-S54.
3. Malaguti M, Dinelli G, Leoncini E, Bregola V, Bosi S, Cicero AFG, *et al.* Bioactive peptides in cereals and legumes: Agronomical, biochemical and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences.* 2014;15: 21120–35.
4. Montoya-Rodríguez A, Gómez-Favela MA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, González de Mejía E. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2015;14(2):139–58.
5. Arenas Martínez R, Tejerina Oller JL. Guía para el cultivo y aprovechamiento del Coime o Amaranto (*Amaranthus Caudatus*). Linneo. CAB; 2001.
6. Mendonça S, Saldiva PH, Cruz RJ, Arêas JAG. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chem.* 2009;116(3):738–42.
7. Queiroz YS de, Manólio Soares RA, Capriles VD, Torres EAF da S, Areas JAG. Effect of processing on the antioxidant activity of amaranth grain. *Arch Latinoam Nutr.* 2009;59(4):419–24.
8. Jayaprakasam B, Zhang Y, Nair MG. Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor*. *J Agric Food Chem.* 2004;52(23):6939–43.
9. Ebert A. Potential of Underutilized Traditional Vegetables and Legume Crops to Contribute to Food and Nutritional Security, Income and More Sustainable Production Systems. *Sustainability.* 2014;6(1):319–35.
10. Wingfield P. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In: *Current Protocols in Protein Science.* John Wiley & Sons, Inc.; 1998. p. A.3F.1-A.3F.8.
11. Gardner ML. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet - aneglected field. *Biol Rev.* 1984;59(3):289–331.

12. Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D, Hernandez-Escalante VM. Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev Int.* 2011;27(3):213–26.
13. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Vol. 18, *Current Opinion in Biotechnology.* 2007. p. 163–9.
14. Silva-Sánchez C, Barba De La Rosa AP, León-Galván MF, De Lumen BO, De León-Rodríguez A, González De Mejía E. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *J Agric Food Chem.* 2008;56(4):1233–40.
15. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell.* 2017;168(4):657–69.
16. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Fisiopatologia do câncer [Internet]. Brasil: Ministério da Saúde. 2005 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>
17. Instituto nacional de estadística y geografía. (INEGI). Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido [Internet]. México: INEGI. 2016 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
18. Globocan. Estimated number of deaths in 2018, all cancers, both sexes, all ages [Internet]. Francia: Globocan. 2018 [citado 2021]. Disponible en: <https://cutt.ly/Okv5mFH>.
19. Secretaria de salud (SS). Cáncer, tercera causa de muerte en México. Secretaría de Salud [Internet]. México: SS. 2017 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud>
20. Organización mundial de la salud (OMS). Cancer [Internet]. Francia: OMS. 2018 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
21. Dirección General de Epidemiología (DGE) de la Secretaria de Salud. Datos abiertos anuarios estadísticos de morbilidad [Internet]. México: DGE. 2018 [citado 2021]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/documentos/datos-abiertos-152127>
22. Globocan. Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancers, females, all ages [Internet]. Francia: Globocan. 2018 [citado 2021]. Disponible en: <https://cutt.ly/Okv5mFH>.

23. Du T, Zhu L, Levine KM, Tasdemir N, Lee A V., Vignali DAA, *et al.* Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism. *Sci Rep.* 2018;8(1):7205.
24. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):283–98.
25. PubMed Health (ed.). *Cervical Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version* [Internet]. USA: National Cancer Institute; 2018. [Citado en 2020].
26. Sanabria JG. Human Papilloma virus (HPV). *Rev Ciencias Médicas Pinar del Río.* 2009;13(4):168–87.
27. Makuza JD, Nsanzimana S, Muhimpundu MA, Pace LE, Ntaganira J, Riedel DJ. Prevalence and risk factors for cervical cancer and pre-cancerous lesions in Rwanda. *Pan Afr Med J.* 2015; 22:26.
28. Franco DDN, Tomás ACV, Gravena AAF, Pelloso SM, Consolaro MEL. Screening Cervical Cancer by the Pap Test Relevance of Age Ranges Recommended by the Brazilian Programme for Prevention and Control. *Asian Pacific J cancer Prev.* 2017;18(9):2431–5.
29. Watters AL, Epstein JB, Agulnik M. Oral complications of targeted cancer therapies: A narrative literature review. *Oral Oncol.* 2001;47: 441–8.
30. Mir NA, Riar CS, Singh S. Nutritional constituents of pseudo cereals and their potential use in food systems: A review. *Trends in Food Science and Technology Elsevier Ltd.* 2018;75: 170–80.
31. Assad R, Reshi ZA, Jan S, Rashid I. Biology of Amaranths. *Bot Rev.* 2017;83(4):382–436.
32. Corke H, Cai YYZ, Wu HX. *Amaranth: Overview.* Elsevier. 2016;287–96.
33. Arendt EK, Zannini E. *Amaranth.* In: *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries.* Elsevier; 2013. p. 439–73.
34. New England Wild Flower Society. *Amaranthus* [Internet]. New England: Go Botany. 2011 [citado 2021]. Disponible en: <https://gobotany.newenglandwild.org/genus/amaranthus/>
35. Tejerina Oller JL, Arenas Martínez R. Guía para el cultivo y aprovechamiento del coime o amaranto *Amaranthus caudatus*. Primera edición. España: Linneo; 2001.
36. Das S. *Amaranthus* : a promising crop of future [Internet]. Primera edición. USA: Springer; 2016. [Citado: 2021].

37. Ranhotra G, Gelroth J, Glaser B, Lorenz L, Johnson D. Composition and protein nutritional quality of quinoa. *Cereal Chem.* 1993;70(3):303–5.
38. Janssen F, Pauly A, Rombouts I, Jansens KJA, Deleu LJ, Delcour JA. Proteins of Amaranth (*Amaranthus* spp.), Buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and Quinoa (*Chenopodium* spp.): A Food Science and Technology Perspective. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2017;16(1):39–58.
39. Segura-Nieto M, Shewry PR, Paredes-López O. Globulins of the Pseudocereals: Amaranth, Quinoa, and Buckwheat. In: *Seed Proteins*. Springer Netherlands; 1999. p. 453–75.
40. Zheleznov AV, Solonenko LP, Zheleznova NB. Seed proteins of the wild and the cultivated *Amaranthus* species. *Euphytica.* 1997;97(2):177–82.
41. Segura-Nieto M, Vazquez-Sanchez N, Rubio-Velazquez H, Olguin-Martinez LE, Rodriguez-Nester CE, Herrera-Estrella L. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J Agric Food Chem.* 1992;40(9):1553–8.
42. Barba de la Rosa AP, Gueguen J, Paredes-Lopez O, Viroben G. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *J Agric Food Chem.* 1992;40(6):931–6.
43. Shela G, Delgado-Licon E, Pawelzik E, Permady H, Weisz M, Trakhtenberg S. Characterization of Soluble Amaranth and Soybean Proteins Based on Fluorescence, Hydrophobicity, Electrophoresis, Amino Acid Analysis, Circular Dichroism, and Differential Scanning Calorimetry Measurements. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5595–5601.
44. Thanapornpoonpong S, Vearasilp S, Pawelzik E, Gorinstein S. Influence of Various Nitrogen Applications on Protein and Amino Acid Profiles of Amaranth and Quinoa. *J Agric Food Chem.* 2008;56(23):11464–70.
45. Belitz H-D, Grosch W, Schieberle P. Cereals and Cereal Products. In: *Food Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 673–746.
46. Drzewiecki J, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Pawelzik E, Martin-Belloso O, Park YS, *et al.* Identification and Differences of Total Proteins and their Soluble Fractions in some Pseudocereals Based on Electrophoretic Patterns. *J Agric Food Chem.* 2003;51(26):7798–804.

47. Barba De La Rosa AP, Herrera-Estrella A, Utsumi S, Paredes-López O. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J Plant Physiol.* 1996;149(5):527–32.
48. Abugoch LE, Martínez EN, Añón MC. Influence of the Extracting Solvent upon the Structural Properties of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Glutelin. *J Agric Food Chem.* 2003;51(14):4060–5.
49. Repo de Carrasco R, Encina Zelada CR. Determination of antioxidant capacity and phenolic compounds in andean cereals: quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Rev la Soc Química del Perú.* 2008;74(2):85–99.
50. Venskutonis PR, Kraujalis P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013;12(4):381–412.
51. Kalinova J, Dadakova E. Rutin and Total Quercetin Content in Amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant Foods Hum Nutr.* 2009;64(1):68–74.
52. Ishtiaq S, Ahmad M, Hanif U, Akbar S, Hafeez Kamran S. Phytochemical and *in vitro* antioxidant evaluation of different fractions of *Amaranthus graecizans* subsp. Brenan. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(1):S342–7.
53. Tufts HR, Harris CS, Bukania ZN, Johns T. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Kenyan Leafy Green Vegetables, Wild Fruits, and Medicinal Plants with Potential Relevance for Kwashiorkor. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015: 807158.
54. Elizalde A de D, Pismag Y, Chaparro DC. Antinutritional factors in eatable seeds. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial.* 2009;7(1):45–54.
55. Egli I, Davidsson L, Juillerat M-A, Barclay D, Hurrell R. Phytic Acid Degradation in Complementary Foods Using Phytase Naturally Occurring in Whole Grain Cereals. *J Food Sci.* 2003;68(5):1855–9.
56. Gupta RK, Gangoliya SS, Singh NK. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. *J Food Sci Technol.* 2015;52(2):676–84.
57. Dang L, Rougé P, Van Damme EJM. Amaranthin-Like Proteins with Aerolysin Domains in Plants. *Front Plant Sci.* 2017;8: 1368.

58. Rastrelli L, Pizza C, Saturnino P, Schettino O, Dini A. Studies on the Constituents of *Amaranthus caudatus* (Kiwicha) Seeds. Isolation and Characterization of Seven New Triterpene Saponins. *J Agric Food Chem.* 1995;43(4):904–9.
59. Oleszek W, Junkuszew M, Stochmal A. Determination and toxicity of saponins from *Amaranthus cruentus* seeds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(9):3685–7.
60. Makkar HP. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin Res.* 2003;49(3):241–56.
61. Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Betschart AAA, *et al.* A Compositional Study of Amaranth Grain. *J Food Sci.* 1981;46(4):1175–80.
62. Gorinstein S, Lojek A, Milan M, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Medina OJ, *et al.* Comparison of composition and antioxidant capacity of some cereals and pseudocereals. *Int J Food Sci Technol.* 2008;43(4):629–37.
63. Nasri M. Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. In: *Advances in Food and Nutrition Research.* Academic Press Inc.; 2017. p. 109–59.
64. López DN, Galante M, Robson M, Boeris V, Spelzini D. Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules Elsevier.* 2018;109: 152–9.
65. Cordero-de-los-Santos MY, Osuna Castro JA, Borodanenko A, Paredes-López O. Physicochemical and functional characterisation of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation. *Food Sci Technol Int.* 2005;11: 269–80.
66. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40(1):43–81.
67. Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. Vol. 2, *Journal of Functional Foods.* Elsevier; 2010. p. 1–9.
68. Benítez R, Ibarz A, Pagán J. Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica Latinoam.* 2008;42(2):227–36.
69. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. Vol. 16, *International Dairy Journal.* Elsevier; 2006. p. 945–60.

70. Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, González de Mejía E. Characterization of peptides found in unprocessed and extruded amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) pepsin/pancreatin hydrolysates. *Int J Mol Sci.* 2015;16(4):8536–54.
71. Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeir J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.* 2008;47(4):171–82.
72. Carlos Ruiz Ruiz J, Abram Betancur Ancona D, Rubi Segura Campos M. Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutr Hosp.* 2014;29(4):776–84.
73. Shoombuatong W, Schaduangrat N, Nantasenamat C. Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning. *Excli J.* 2018;17: 734–52.
74. Maldonado-Cervantes E, Jeong HJ, León-Galván F, Barrera-Pacheco A, De León-Rodríguez A, González de Mejía E, *et al.* Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides.* 2010;31(9):1635–42.
75. Aoyagi Y. An angiotensin-I converting enzyme inhibitor from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) flour. *Phytochemistry.* 2006;67(6):618–21.
76. Sabbione AC, Ogutu FO, Scilingo A, Zhang M, Añón MC, Mu T-H. Antiproliferative Effect of Amaranth Proteins and Peptides on HT-29 Human Colon Tumor Cell Line. *Plant Foods Hum Nutr.* 2019;74(1):107–14.
77. Moronta J, Smaldini PL, Docena GH, Añón MC. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *J Funct Foods.* 2016;21: 463–73.
78. O’Harte FPM, Mooney MH, Flatt PR. NH₂-terminally modified gastric inhibitory polypeptide exhibits amino-peptidase resistance and enhanced antihyperglycemic activity. *Diabetes.* 1999;48(4):758–65.
79. Jeong HJ, Jeong JB, Kim DS, Park JH, Lee JB, Kweon DH, *et al.* The cancer preventive peptide lunasin from wheat inhibits core histone acetylation. *Cancer Lett.* 2007;255(1):42–8.
80. Galvez AF, De Lumen BO. A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 1999;17(5):495–500.

81. Galvez AF, Chen N, Macasieb J, De Lumen BO. Chemopreventive property of a soybean peptide (Lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation. *Cancer Res.* 2001;61(20):7473–8.
82. Hsieh C-C, Hernández-Ledesma B, Jeong HJ, Park JH, de Lumen BO. Complementary roles in cancer prevention: protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *PLoS One.* 2010;5(1): e8890.
83. Gonzalez de Mejia E, Wang W, Dia VP. Lunasin, with an arginine-glycine-aspartic acid motif, causes apoptosis to L1210 leukemia cells by activation of caspase-3. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(3):406–14.
84. Dia VP, Mejia EG de. Lunasin promotes apoptosis in human colon cancer cells by mitochondrial pathway activation and induction of nuclear clusterin expression. *Cancer Lett.* 2010;295(1):44–53.
85. Kannan A, Hettiarachchy NS, Lay JO, Liyanage R. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides.* 2010;31(9):1629–34.
86. Goldstein IJ, Winter HC, Mo H, Misaki A, Van Damme EJM, Peumans WJ. Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin: II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and β -glucans containing β 1,6-glucosyl end groups. *Eur J Biochem.* 2001;268(9):2616–9.
87. Wang Q, Yu LG, Campbell BJ, Milton JD, Rhodes JM. Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet.* 1998;352(9143):1831–2.
88. Vasconcelos IM, Siebra EA, Maia AAB, Moreira RA, Neto AF, Campelo GJA, *et al.* Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). *J Sci Food Agric.* 1997;75(4):419–26.
89. Liener IE. From soybeans to lectins: a trail of research revisited. *Carbohydr Res.* 1991;213(C):1–5.
90. Boland CR, Martin MA, Goldstein IJ. Lectin reactivities as intermediate biomarkers in premalignant colorectal epithelium. *J Cell Biochem.* 1992;50(S16G):103–9.
91. García-Gasca T, García-Cruz M, Hernandez-Rivera E, Josue López-Matínez, Castañeda-Cuevas AL, Yllescas-Gasca L, *et al.* Effects of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) protease inhibitor and Semipure lectin fractions on cancer cells. *Nutr Cancer.* 2012;64(8):1269–78.

92. Dia VP, Wang W, Oh VL, Lumen BO d., de Mejia EG. Isolation, purification and characterisation of lunasin from defatted soybean flour and *in vitro* evaluation of its anti-inflammatory activity. *Food Chem.* 2009;114(1):108–15.
93. Quiroga A V., Aphalo P, Nardo AE, Añón MC. *In Vitro* Modulation of Renin-Angiotensin System Enzymes by Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Protein-Derived Peptides: Alternative Mechanisms Different from ACE Inhibition. *J Agric Food Chem.* 2017;65(34):7415–23.
94. Vilcacundo R, Martínez-Villaluenga C, Miralles B, Hernández-Ledesma B. Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein under *in vitro* gastrointestinal digestion. *J Sci Food Agric.* 2019;99(3):1225–32.
95. Matsui T, Li CH, Osajima Y. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *J Pept Sci.* 1999;5(7):289–97.
96. Motoi H, Kodama T. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung Food.* 2003;47(5):354–8.
97. Li GH, Qu MR, Wan JZ, You JM. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. In: *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* Asia Pac J Clin Nutr; 2007. p. 275–80.
98. Pak V V., Koo MS, Kasymova TD, Kwon DY. Isolation and identification of peptides from soy 11S-globulin with hypocholesterolemic activity. *Chem Nat Compd.* 2005;41(6):710–4.
99. Ferreira EDS, Silva MA, Demonte A, Neves VA. Soy β -conglycinin (7S globulin) reduces plasma and liver cholesterol in rats fed hypercholesterolemic diet. *J Med Food.* 2011;14(1–2):94–100.
100. Wang W, de Mejia EG. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2005;4(4):63–78.
101. Medina-Godoy S, Ambriz-Pérez DL, Fuentes-Gutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. *J Sci Food Agric.* 2012;92(9):1974–81.

102. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem.* 1998;46(1):49–53.
103. Pownall TL, Udenigwe CC, Aluko RE. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum L.*) Enzymatic protein hydrolysate fractions. *J Agric Food Chem.* 2010;58(8):4712–8.
104. Wang J shui, Zhao M ming, Zhao Q zhong, Jiang Y ming. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem.* 2007;101(4):1658–63.
105. Jeong JB, De Lumen BO, Jeong HJ. Lunasin peptide purified from *Solanum nigrum L.* protects DNA from oxidative damage by suppressing the generation of hydroxyl radical via blocking fenton reaction. *Cancer Lett.* 2010;293(1):58–64.
106. García-Nebot MJ, Recio I, Hernández-Ledesma B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2014;65: 155–61.
107. Reinhardt A, Neundorf I. Design and application of antimicrobial peptide conjugates. *Int J Mol Sci.* 2016;17(5):701.
108. Moyer TB, Heil LR, Kirkpatrick CL, Goldfarb D, Lefever WA, Parsley NC, *et al.* PepSAVI-MS Reveals a Proline-rich Antimicrobial Peptide in *Amaranthus tricolor*. *J Nat Prod.* 2019;82(10):2744–53.
109. Felício MR, Silva ON, Gonçalves S, Santos NC, Franco OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem.* 2017;5: 5-9.
110. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer.* 1981;47(1):207–14.
111. Martínez-Torres AC, Uscanga A, Rodríguez-Padilla C. Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. En: Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas M, Verde-Star M (eds.). *Investigación en plantas de importancia médica.* México: OmniaScience; 2016. pp. 270-312.
112. Matulis D. Selective precipitation of proteins. *Curr Protoc Protein Sci.* 2016;83(1):4.5.1-4.5.37.
113. Langford A, Bhatnagar B, Walters R, Tchessalov S, Ohtake S. Drying technologies for biopharmaceutical applications: Recent developments and future direction. *Dry Technol.* 2018;36(6):677–84.

114. Mora-Escobedo R, Robles-Ramírez M del C, Ramón-Gallegos E, Reza-Alemán R. Effect of Protein Hydrolysates from Germinated Soybean on Cancerous Cells of the Human Cervix: An *In Vitro* Study. *Plant Foods Hum Nutr.* 2009;64(4):271–8.
115. Cho SY, Rhee C. Mechanical properties and water vapor permeability of edible films made from fractionated soy proteins with ultrafiltration. *Food Sci Technol.* 2004;37(8):833–9.
116. Horwitz DW, Latimer DG. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21st ed. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence; 2019.
117. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
118. Jaffé W. Hemagglutinins. In: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Academic Press; 1969. p. 69–101.
119. Giron M. Determinación Semi Cuantitativa de Saponinas En Muestras Vegetales Aprovechando Su Capacidad Hemolítica. UNAM; 1992.
120. Nachbar MS, Oppenheim JD, Aull F. Interactions of lectins with plasma membrane glycoproteins of the Ehrlich ascites carcinoma cell. *Biomembr.* 1976;419(3):512–29.
121. Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16(3):144–58.
122. Harris T, Jideani V, Le Roes-Hill M. Flavonoids and tannin composition of Bambara groundnut (*Vigna subterranea*) of Mpumalanga, South Africa. *Heliyon.* 2018;4(9):e00833.
123. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int.* 2005;88(5):1269–78.
124. Dürüst N, Sümengen D, Dürüst Y. Ascorbic Acid and Element Contents of Foods of Trabzon (Turkey). *J Agric Food Chem.* 1997;45(6):2085–7.
125. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9–10):1231–7.
126. Schenk GH, Brown DJ. Free radical oxidation of dihydric phenols with diphenylpicrylhydrazyl. *Talanta.* 1967;14(2):257–61.

127. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70–6.
128. SiHa ATCC ® HTB-35 TM.
129. MDA-MB-231 ATCC ® CRM-HTB-26TM.
130. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
131. Li S, Hao L, Bao W, Zhang P, Su D, Cheng Y, *et al.* A novel short anionic antibacterial peptide isolated from the skin of *Xenopus laevis* with broad antibacterial activity and inhibitory activity against breast cancer cell. *Arch Microbiol.* 2016;198(5):473–82.
132. Mune MAM, Minka SR, Mbome IL, Etoa FX. Nutritional potential of bambara bean protein concentrate. *Pakistan J Nutr.* 2011;10(2):112–9.
133. Bradley RL. Moisture and Total Solids Analysis. In Springer, Boston, MA; 2010. p. 85–104.
134. Saunders R, Becker R. *Amaranthus*: a potential food and feed resource. *Adv Cereal Sci. Technol.* 1984;6:357-396.
135. Aphalo P, Martínez EN, Añón MC. Amaranth Sprouts: A Potential Health Promoting and Nutritive Natural Food. *Int J Food Prop.* 2015;18(12):2688–98.
136. Rastogi A, Shukla S. Amaranth: A New Millennium Crop of Nutraceutical Values. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2013;53(2):109–25.
137. Gamel TH, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA, Linssen JP. Characterization of amaranth seed oils. *J Food Lipids.* 2007;14(3):323–34.
138. He HP, Corke H. Oil and Squalene in *Amaranthus* Grain and Leaf. *J Agric Food Chem.* 2003;51(27):7913–20.
139. Rodas B, Bressani R. The oil, fatty acid and squalene content of varieties of raw and processed amaranth grain. *Arch Latinoam Nutr.* 2009;59(1):82–7.
140. Berganza BE, Moran AW, Guillermo Rodríguez M, Coto NM, Santamaría M, Bressani R. Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Foods Hum Nutr.* 2003;58(3):1–6.
141. Schofield EJ, Rowntree JK, Paterson E, Brewer MJ, Price EAC, Brearley FQ, *et al.* Cultivar differences and impact of plant-plant competition on temporal patterns of nitrogen and biomass accumulation. *Front Plant Sci.* 2019;10: 215-224

142. Kramer RM, Shende VR, Motl N, Pace CN, Scholtz JM. Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophys J*. 2012;102(8):1907–15.
143. Mirica KA, Lockett MR, Snyder PW, Shapiro ND, MacK ET, Nam S, *et al*. Selective precipitation and purification of monovalent proteins using oligovalent ligands and ammonium sulfate. *Bioconjug Chem*. 2012;23(2):293–9.
144. Singh J, Kamboj KK, Kamboj S s., Sandhu RS, Shangary S. Affinity purification and characterization of lectins from two *Amaranthus* species. *Plant Sci*. 1993;94(1–2):47–53.
145. Bojórquez-Velázquez E, Barrera-Pacheco A, Espitia-Rangel E, Herrera-Estrella A, De La Rosa APB. Protein analysis reveals differential accumulation of late embryogenesis abundant and storage proteins in seeds of wild and cultivated amaranth species. *BMC Plant Biol*. 2019;19(1):59-76.
146. Martínez EN, Añón MC. Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study. *J Agric Food Chem*. 1996;44(9):2523–30.
147. Avanza MV, Añón MC. Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates. *J Sci Food Agric*. 2007;87(4):616–23.
148. Kaur N, Dhuna V, Kamboj SS, Agrewala J, Singh J. A Novel Antiproliferative and Antifungal Lectin from *Amaranthus viridis* Linn Seeds. *Protein Pept Lett*. 2006;13(9):897–905.
149. Bejarano-Luján DL, Netto FM. Effect of alternative processes on the yield and physicochemical characterization of protein concentrates from *Amaranthus cruentus*. *Food Sci Technol*. 2010;43(5):736–43.
150. Segura-Nieto M, Vazquez-Sanchez N, Rubio-Velazquez H, Olguin-Martinez LE, Rodriguez-Nester CE, Herrera-Estrella L, *et al*. Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins. *J Agric Food Chem*. 1992;40(9):1553–8.
151. Huerta-Ocampo JA, Barba de la Rosa AP. Amaranth: A Pseudo-Cereal with Nutraceutical Properties. *Curr Nutr Food Sci*. 2011;7(1):1–9.
152. Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Reyes-Moreno C, de Mejía EG. Characterization of peptides found in unprocessed and extruded amaranth

- (*Amaranthus hypochondriacus*) pepsin/pancreatin hydrolysates. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8536–54.
153. Ayala-Niño A, Rodríguez-Serrano GM, González-Olivares LG, Contreras-López E, Regal-López P, Cepeda-Saez A. Sequence identification of bioactive peptides from amaranth seed proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.). *Molecules*. 2019;24(17): 3033-3047.
 154. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. What should be called a lectin?. 1980;285:31–35.
 155. Kenmochi E, Kabir SR, Ogawa T, Naude R, Tateno H, Hirabayashi J, *et al.* Isolation and Biochemical Characterization of Apios tuber lectin. *Molecules*. 2015;20(1):987–1002.
 156. Rinderle SJ, Goldstein IJ, Matta KL, Ratcliffe RM. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. *J Biol Chem*. 1989;264(27):16123–31.
 157. De Mejia EG, Valadez-Vega MDC, Reynoso-Camacho R, Loarca-Pina G. Tannins, Trypsin Inhibitors and Lectin Cytotoxicity in Tepary (*Phaseolus acutifolius*) and Common (*Phaseolus vulgaris*) Beans. *Plant Foods Hum Nutr*. 2005;60(3):137–45.
 158. Rinderle SJ, Goldstein IJ, Remsen EE. Physicochemical Properties of Amaranthin, the Lectin from *Amaranthus caudatus* Seeds. *Biochemistry*. 1990;29(46):10555–61.
 159. Mishra A, Behura A, Mawatwal S, Kumar A, Naik L, Mohanty SS, *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol*. 2019;134:110827.
 160. Damme EJM Van, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *CRC Crit Rev Plant Sci*. 1998;17(6):575–692.
 161. Moses T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2014;49(6):439–62.
 162. Rodríguez JP, Rahman H, Thushar S, Singh RK. Healthy and Resilient Cereals and Pseudo-Cereals for Marginal Agriculture: Molecular Advances for Improving Nutrient Bioavailability. *Front Genet* . 2020; 11:49.

163. Zehring J, Reim V, Schröter D, Neugart S, Schreiner M, Rohn S, *et al.* Identification of novel saponins in vegetable amaranth and characterization of their hemolytic activity. *Food Res Int.* 2015;78:361–8.
164. Oleszek W. Alfalfa Saponins: Structure, Biological Activity, and Chemotaxonomy. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 1996. p. 155–70.
165. Gestetner B, Birk Y, Tencer Y. Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. *J Agric Food Chem.* 1968;16(6):1031–5.
166. Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr.* 2002;88(6):587–605.
167. Paško P, Bartoń H, Zagrodzki P, Gorinstein S, Fołta M, Zachwieja Z. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chem.* 2009;115(3):994–8.
168. Călinoiu LF, Vodnar DC. Whole grains and phenolic acids: A review on bioactivity, functionality, health benefits and bioavailability. *Nutrients.* 2018;10(11):1615–46.
169. Wu Y, Li X, Xiang W, Zhu C, Lin Z, Wu Y, *et al.* Presence of tannins in sorghum grains is conditioned by different natural alleles of Tannin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(26):10281–6.
170. Dykes L, Rooney LW. Sorghum and millet phenols and antioxidants. *J Cereal Sci.* 2006;44(3):236–51.
171. Mustafa AF, Seguin P, Gélinas B. Chemical composition, dietary fibre, tannins and minerals of grain amaranth genotypes. *Int J Food Sci Nutr.* 2011;62(7):750–4.
172. Cooney LJ, Logan BA, Walsh MJL, Nnatubeugo NB, Reblin JS, Gould KS. Reprint of “Photoprotection from anthocyanins and thermal energy dissipation in senescing red and green *Sambucus canadensis* peduncles”. *Environ Exp Bot.* 2018;154: 4–10.
173. López VRL, Razzeto GS, Giménez MS, Escudero NL. Antioxidant Properties of *Amaranthus hypochondriacus* Seeds and their Effect on the Liver of Alcohol-Treated Rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2011;66(2):157–62.
174. Zhu F. Anthocyanins in cereals: Composition and health effects. *Food Research International.* 2018;109: 232–49.
175. Repo-Carrasco-Valencia R, Hellström JK, Pihlava JM, Mattila PH. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium*

- quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Food Chem. 2010;120(1):128–33.
176. Van Hung P. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. Crit Rev Food Sci Nutr. 2016;56(1):25–35.
 177. Drzewiecki J. Similarities and differences between *Amaranthus* species and cultivars and estimation of outcrossing rate on the basis of electrophoretic separations of urea-soluble seed proteins. Euphytica. 2001;119(3):279–87.
 178. Santos S, Félix R, Pais A, Rocha S, Silvestre A. The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. Biomolecules. 2019;9(12): 847-903.
 179. Nagy K, Courtet-Compondu MC, Williamson G, Rezzi S, Kussmann M, Rytz A. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. Food Chem. 2012;132(3):1333–9.
 180. Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, *et al.* Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. J Pharm Biomed Anal. 2010;51(2):490–5.
 181. Hasni I, Bourassa P, Hamdani S, Samson G, Carpentier R, Tajmir-Riahi HA. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. Food Chem. 2011;126(2):630–9.
 182. Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA. Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. Food Chem. 2011;127(3):1046–55.
 183. Jakobek L. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. Food Chemistry. 2015;175: 556–67.
 184. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. Am J Clin Nutr. 2005;81(1 Suppl):317S-325S.
 185. Akram NA, Shafiq F, Ashraf M. Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic. Frontiers in Plant Science. 2017;8:613-16.
 186. Gamel TH, Linssen JP, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. J Sci Food Agric. 2006;86(1):82–9.
 187. Plaza L, de Ancos B, Cano PM. Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum L*) and alfalfa

- (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *Eur Food Res Technol*. 2003;216(2):138–44.
188. Miranda M, Vega-Gálvez A, Martínez EA, López J, Marín R, Aranda M, *et al*. Influence of contrasting environments on seed composition of two quinoa genotypes: Nutritional and functional properties. *Chil J Agric Res*. 2013;73(2):108–16.
189. Martínez-Villaluenga C, Urbano G, Porres JM, Frias J, Vidal-Valverde C. Improvement in food intake and nutritive utilization of protein from *Lupinus albus* var. multolupa protein isolates supplemented with ascorbic acid. *Food Chem*. 2007;103(3):944–51.
190. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872–9.
191. Repo-Carrasco-Valencia R. Dietary fiber and other functional components in two varieties of crude and extruded kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *J Cereal Sci*. 2009;49(2):219–24.
192. Kunyanga CN, Imungi JK, Okoth M, Momanyi C, Biesalski HK, Vadivel V. Antioxidant and Antidiabetic Properties of Condensed Tannins in Acetonic Extract of Selected Raw and Processed Indigenous Food Ingredients from Kenya. *J Food Sci*. 2011;76(4):C560-7.
193. Buitrago D, Buitrago-Villanueva I, Barbosa-Cornelio R, Coy-Barrera E. Comparative examination of antioxidant capacity and fingerprinting of unfractionated extracts from different plant parts of quinoa (*Chenopodium quinoa*) grown under greenhouse conditions. *Antioxidants*. 2019;8(8): 238-53.
194. Chávez-Mendoza C, Hernández-Figueroa KI, Sánchez E. Antioxidant capacity and phytonutrient content in the seed coat and cotyledon of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from various regions in Mexico. *Antioxidants*. 2018;8(1):5-24.
195. Djordjevic TM, Šiler-Marinkovic SS, Dimitrijevic-Brankovic SI. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content in Some Cereals and Legumes. *Int J Food Prop*. 2011;14(1):175–84.
196. Guo XD, Ma YJ, Parry J, Gao JM, Yu LL, Wang M. Phenolics content and antioxidant activity of tartary buckwheat from different locations. *Molecules*. 2011;16(12):9850–67.

197. Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. *In vitro* antioxidant effect and inhibition of α -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(6):1098–102.
198. Lim JG, Park HM, Yoon KS. Analysis of saponin composition and comparison of the antioxidant activity of various parts of the quinoa plant (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Food Sci Nutr.* 2020;8(1):694–702.
199. An-Na L, Sha L, Yu-Jie Z, Xiang-Rong X, Yu-Ming C, Hua-Bin L. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* 2014;6: 6020–47.
200. Seczyk L, Swieca M, Kapusta I, Gawlik-Dziki U. Protein–phenolic interactions as a factor affecting the physicochemical properties of white bean proteins. *Molecules.* 2019;24(3):408-32.
201. Orsini Delgado MC, Tironi VA, Añón MC. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *Food Sci Technol.* 2011;44(8):1752–60.
202. Ngoh YY, Gan CY. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α -amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris cv. Pinto*). *Food Chem.* 2016;190:331–7.
203. Phongthai S, D’Amico S, Schoenlechner R, Homthawornchoo W, Rawdkuen S. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2018;240:156–64.
204. Samaranyaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods.* 2011;3:229–54.
205. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, *et al.* Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):96-128.
206. Sánchez A, Vázquez A. Bioactive peptides: A review. *Food Qual Saf.* 2017;1(1):29–46.
207. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193–203.
208. Hastings J, Kenealey J. Avenanthramide-C reduces the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells through an apoptotic mechanism. *Cancer Cell Int.* 2017;17(1).

209. Pintha K, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Limtrakul P. Anti-invasive activity against cancer cells of phytochemicals in red jasmine rice (*Oryza sativa L.*). *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(11):4601–7.
210. Cho K, Lee CW, Ohm J-B. *In Vitro* Study on Effect of Germinated Wheat on Human Breast Cancer Cells. *Cereal Chem J.* 2016;93(6):647–9.
211. Lima A, Oliveira J, Saúde F, Mota J, Ferreira RB. Proteins in soy might have a higher role in cancer prevention than previously expected: Soybean protein fractions are more effective MMP-9 inhibitors than non-protein fractions, even in cooked seeds. *Nutrients.* 2017;9(3): 201-17.
212. Shapiro AB. Do you know or is there a scale in which it can be determined that any natural product is feasible to use as a possible adjuvant in the treatment of any disease? [Internet]. ResearchGate: Adam B Shapiro. 2020 Mayo. [Citado: 2020] Disponible en: <https://www.researchgate.net/messages/1821425907>
213. Hernández-Ledesma B, Hsieh CC. Chemopreventive role of food-derived proteins and peptides: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017;57(11):2358–76.
214. Wu AM, Wu JH, Yang Z, Singh T, Goldstein IJ, Sharon N. Differential contributions of recognition factors of two plant lectins *Amaranthus caudatus* lectin and *Arachis hypogea* agglutinin, reacting with Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr). *Biochimie.* 2008;90(11–12):1769–80.
215. Singh J, Kamboj K, Kamboj S, Shangary S, Sandhu R. *Amaranthus hypochondriacus* y *A. tricolor* lectins: aislamiento y caracterización. *Ital J Biochem.* 1994;43(5):207–18.
216. Zenteno E, Lascurain R, Montaña LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconj J.* 1992;9(4):204–8.
217. Zhou S-M, Cheng L, Guo S-J, Wang Y, Czajkowsky DM, Gao H, *et al.* Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):36.
218. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* 1995;358(1):1–3.
219. Gibellini L, Pinti M, Nasi M, de Biasi S, Roat E, Bertoncelli L, *et al.* Interfering with ROS metabolism in cancer cells: The potential role of quercetin. *Cancers.* 2010;2:1288–311.

220. Li N, Sun C, Zhou B, Xing H, Ma D, Chen G, *et al.* Low concentration of quercetin antagonizes the cytotoxic effects of anti-neoplastic drugs in ovarian cancer. *PLoS One*. 2014;9(7): e100314-23.
221. Moreira H, Slezak A, Szyjka A, Oszmianski J, Gasiorowski K. Antioxidant and cancer chemopreventive activities of cistus and pomegranate polyphenols. *Acta Pol Pharm*. 2017;74(2):688–98.
222. Mut-Salud N, Álvarez PJ, Garrido JM, Carrasco E, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
223. Chen H, Liu RH. Potential Mechanisms of Action of Dietary Phytochemicals for Cancer Prevention by Targeting Cellular Signaling Transduction Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66:3260–76.
224. De Mejía EG, Prisecaru VI. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(6):425–45.
225. Meany DL, Chan DW. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *BioMed Central*. 2011;8:7-9.
226. Al-Mamun MA, Husna J, Khatun M, Hasan R, Kamruzzaman M, Hoque KMF, *et al.* Assessment of antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of two vegetable species of *Amaranthus* in Bangladesh. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16:157.
227. Lam SK, Ng TB. Apoptosis of human breast cancer cells induced by hemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* cv. *Legumi secchi*. *Food Chem*. 2011;126(2):595–602.
228. Armah CN, Mackie AR, Roy C, Price K, Osbourn AE, Bowyer P, *et al.* The Membrane-Permeabilizing Effect of Avenacin A-1 Involves the Reorganization of Bilayer Cholesterol. *Biophys J*. 1999;76(1 Pt 1):281-90.
229. Nishikawa M, Nojima S, Akiyama T, Sankawa U, Inoue K. Interaction of digitonin and its analogs with membrane cholesterol. *J Biochem*. 1984;96(4):1231–9.
230. Shan X, Aziz F, Tian LL, Wang XQ, Yan Q, Liu JW. Ginsenoside Rg3-induced EGFR/MAPK pathway deactivation inhibits melanoma cell proliferation by decreasing FUT4/LeY expression. *Int J Oncol*. 2015;46(4):1667–76.
231. Motoo Y, Sawabu N. Antitumor effects of saikosaponins, baicalin and baicalein on human hepatoma cell lines. *Cancer Lett*. 1994;86(1):91–5.

232. Wang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhu S, Li Y, Li M, *et al.* Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorganic Med Chem.* 2007;15(7):2528–32.
233. Chen H, Liu RH. Potential Mechanisms of Action of Dietary Phytochemicals for Cancer Prevention by Targeting Cellular Signaling Transduction Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2018;66:3260–76.
234. Lee YJ, Kim NY, Suh YA, Lee CH. Involvement of ROS in curcumin-induced autophagic cell death. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2011;15(1):1–7.
235. Wang D, Wise ML, Li F, Dey M. Phytochemicals Attenuating Aberrant Activation of β -Catenin in Cancer Cells. *PLoS One.* 2012;7(12):505-08.
236. Gollucke APB, Aguiar O, Barbisan LF, Ribeiro DA. Use of grape polyphenols against carcinogenesis: Putative molecular mechanisms of action using *in vitro* and *in vivo* test systems. *Food. J Med Food.* 2013;16:199–205.
237. Hu H, Lee HJ, Jiang C, Zhang J, Wang L, Zhao Y, *et al.* Penta-1,2,3,4,6-O-galloyl- β -D-glucose induces p53 and inhibits STAT3 in prostate cancer cells *in vitro* and suppresses prostate xenograft tumor growth *in vivo*. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(9):2681–91.
238. Yu WS, Jeong SJ, Kim JH, Lee HJ, Song HS, Kim MS, *et al.* The genome-wide expression profile of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D- glucose-treated MDA-MB-231 breast cancer cells: Molecular target on cancer metabolism. *Mol Cells.* 2011;32(2):123–32.
239. Shimojo Y, Akimoto M, Hisanaga T, Tanaka T, Tajima Y, Honma Y, *et al.* Attenuation of reactive oxygen species by antioxidants suppresses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2013;30(2):143–54.
240. Muniyan S, Chou YW, Tsai TJ, Thomes P, Veeramani S, Benigno BB, *et al.* p66Shc longevity protein regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Mol Carcinog.* 2015;54(8):618–31.
241. Galimov ER. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae.* 2010;2(4):44–51.
242. Vadde R, Radhakrishnan S, Reddivari L, Vanamala JKP. Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells

- via Suppressing c-Myc/Cyclin D1 and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio. *Biomed Res Int.* 2015;2015: 649263-72.
243. Rayaprolu SJ, Hettiarachchy NS, Horax R, Phillips GK, Mahendran M, Chen P. Soybean peptide fractions inhibit human blood, breast and prostate cancer cell proliferation. *J Food Sci Technol [Internet]*. 2017;54(1):38–44.
244. Kannan A, Hettiarachchy N, Narayan S. Colon and breast anti-cancer effects of peptide hydrolysates derived from rice bran. *Open Bioact Compd J.* 2009;2:17–20.
245. Ortiz-Martinez M, Winkler R, García-Lara S. Preventive and therapeutic potential of peptides from cereals against cancer. *Journal of Proteomics.* 2014;111:165–83.
246. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *The Lancet Oncology.* 2008;9:1002–11.
247. Kornienko A, Mathieu V, Rastogi SK, Lefranc F, Kiss R. Therapeutic agents triggering nonapoptotic cancer cell death. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2013;56:4823–39.
248. Zitvogel L, Galluzzi L, Smyth MJ, Kroemer G. Mechanism of Action of Conventional and Targeted Anticancer Therapies: Reinstating Immunosurveillance. *Immunity.* 2013;39:74–88.
249. D’Assoro AB, Busby R, Suino K, Delva E, Almodovar-Mercado GJ, Johnson H, *et al.* Genotoxic stress leads to centrosome amplification in breast cancer cell lines that have an inactive G1/S cell cycle checkpoint. *Oncogene.* 2004;23(23):4068–75.

14 ANEXOS

14.1 Correlaciones

Tabla 16 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre las diferentes muestras del proceso de separación de péptidos y los compuestos evaluados ($p < 0.05$).

	Extracto proteico	Aislado proteico	Péptidos >30 kDa	Péptidos <30 kDa
Lectinas	0.999	0.999		
Saponinas	0.943	0.974		
TN	0.566	0.202	0.102	0.059
ANT	0.036	0.374	0.358	0.235
FT	0.939	0.997	0.218	0.896
ABTS•⁺	0.980	0.982	0.250	0.043
DPPH•	0.208	0.002	0.307	0.475
FRAP	0.915	0.169	0.662	0.787
AA	0.480	0.797	0.750	0.285

Tabla 17 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en el extracto proteico ($p < 0.05$).

	Saponinas	TN	ANT	FT	ABTS• ⁺	DPPH•	FRAP	AA
Lectinas	0.851	0.541	0.046	0.950	0.874	0.015	0.188	0.640
Saponinas	-	0.174	0.331	0.971	0.714	0.003	0.568	0.716
TN	-	-	0.254	0.320	0.703	0.864	0.831	0.701
ANT	-	-	-	0.183	0.002	0.619	0.011	0.003
FT	-	-	-	-	0.853	0.049	0.730	0.855
ABTS•⁺	-	-	-	-	-	0.334	0.977	0.799
DPPH•	-	-	-	-	-	-	0.510	0.609
FRAP	-	-	-	-	-	-	-	0.776

Tabla 18 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en el aislado proteico ($p<0.05$)

	Saponinas	TN	ANT	FT	ABTS•+	DPPH•	FRAP	AA
Lectinas	0.392	0.217	0.392	0.999	0.977	0.000	0.155	0.799
Saponinas	-	0.964	0.250	0.429	0.250	0.586	0.222	0.429
TN	-	-	0.564	0.249	0.107	0.764	0.397	0.249
ANT	-	-	-	0.429	0.250	0.586	0.222	0.429
FT	-	-	-	-	0.984	0.000	0.129	0.862
ABTS•+	-	-	-	-	-	0.889	0.645	0.121
DPPH•	-	-	-	-	-	-	0.861	0.000
FRAP	-	-	-	-	-	-	-	0.129

Tabla 19 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en los péptidos >30 kDa ($p<0.05$)

	ANT	FT	ABTS•+	DPPH•	FRAP	AA
TN	0.357	0.219	0.249	0.309	0.661	0.751
ANT	-	0.185	0.686	0.112	0.508	0.014
FT	-	-	0.284	0.990	0.018	0.716
ABTS•+	-	-	-	0.197	0.829	0.000
DPPH•	-	-	-	-	0.001	0.803
FRAP	-	-	-	-	-	0.171

Tabla 20 Análisis de coeficiente de correlación de Pearson entre los compuestos evaluados en los péptidos <30 kDa ($p<0.05$)

	ANT	FT	ABTS•+	DPPH•	FRAP	AA
TN	0.533	0.007	0.637	0.286	0.054	0.476
ANT	-	0.548	0.771	0.437	0.695	0.397
FT	-	-	0.108	0.785	0.177	0.605
ABTS•+	-	-	-	0.532	0.219	0.721
DPPH•	-	-	-	-	0.895	0.462
FRAP	-	-	-	-	-	0.746

14.2 Carta de aprobación del por el comité de ética en investigación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
 Instituto de Ciencias de la Salud
 School of Health Sciences
Comité de Ética en Investigación
 Research Ethics Committee

Pachuca de Soto, Hidalgo a 9 de enero del 2019
CorInv/212/2019

DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA
INVERTIGADOR ADSCRITO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
APROBACIÓN

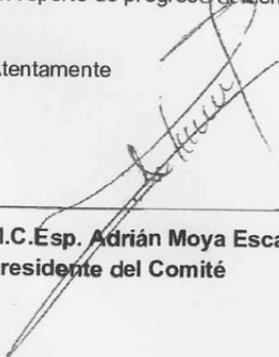
Título del Proyecto:
EFFECTO ANTICARCINOGENICO DEL EXTRACTO PROTEICO Y PÉPTIDOS DE LA SEMILLA DE AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS L. EN CÉLULAS MALIGNAS HUMANAS SIHA Y MDA
Código asignado por el Comité: CEEI-000011-2019

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentra a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
PROTOCOLO	Primero	Aprobado

Este protocolo tiene vigencia de Enero del 2019 a Enero 2021.
 En caso de requerir una aclaración, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de termino de su vigencia.

Atentamente



M.C.Esp. Adrián Moya Escalera
Presidente del Comité












Instituto de Ciencias de la Salud
 Exhacienda la Concepción s/n
 San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4314 y 4315
 investigacion_icsa@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

14.3 Cartas de consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Claudia Resendiz Otero (AB+) manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio **“Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* L. en células malignas humanas SiHa y MDA”**, he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar una única muestra de sangre. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Convengo en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

<u>Claudia Resendiz Otero</u> Nombre y Firma del Participante	<u>6 - noviembre - 2019</u> Fecha
<u>Adriana Otero Hernandez</u> Testigo 1 (Nombre y Firma)	<u>6 - NOVIEMBRE - 2019</u> Fecha
<u>Octavia Suarez Veigas</u> Testigo 2 (Nombre y Firma)	<u>6 - noviembre - 19</u> Fecha

Yo LN. Maria Fernanda Resendiz Otero, responsable de la investigación; he explicado al Sr. Claudia Resendiz Otero la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

<u>Maria Fernanda Resendiz Otero</u> Nombre y Firma de responsable de la investigación	<u>6 - noviembre - 2019</u> Fecha
---	--------------------------------------



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
medicina@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



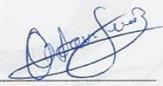
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, ADRIANA OTERO HERNÁNDEZ (A+) manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio **“Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* L. en células malignas humanas SiHa y MDA”**, he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar una única muestra de sangre. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Convento en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

ADRIANA OTERO HERNÁNDEZ  6-NOVIEMBRE-2019
 Nombre y Firma del Participante Fecha

Roberto Badillo Mendoza  6 - Nov - 2019
 Testigo 1 (Nombre y Firma) Fecha

Octavio Suarez Vergara  6 - noviembre - 19
 Testigo 2 (Nombre y Firma) Fecha

Yo LN. María Fernanda Resendiz Otero, responsable de la investigación; he explicado al Sr. Adriana Otero Hernández la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.


María Fernanda Resendiz Otero 6-noviembre-2019
 Nombre y Firma de responsable de la investigación Fecha



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 medicina@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, María Fernanda Resendiz Otero (B+) manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio "**Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus L.* en células malignas humanas SiHa y MDA**", he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar una única muestra de sangre. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Convento en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

María Fernanda Resendiz Otero 6-noviembre-2019
 Nombre y Firma del Participante Fecha

ADRIANA OTERO HERNÁNDEZ 6-NOVIEMBRE-2019
 Testigo 1 (Nombre y Firma) Fecha

Octavio Suarez Vergara 6-noviembre-19
 Testigo 2(Nombre y Firma) Fecha

Yo LN. María Fernanda Resendiz Otero, responsable de la investigación; he explicado al Sr. María Fernanda Resendiz Otero la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

María Fernanda Resendiz Otero 6-noviembre-2019
 Nombre y Firma de responsable de la investigación Fecha



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 medicina@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, Roberto Badillo Mendoza (0+) manifiesto que se me ha informado la naturaleza del estudio **“Efecto citotóxico y antiproliferativo del aislado proteico y péptidos de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* L. en células malignas humanas SiHa y MDA”**, he leído y comprendido la información del proyecto y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria, y doy voluntariamente mi consentimiento para donar una única muestra de sangre. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos.

Convengo en participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Roberto Badillo Mendoza 
 Nombre y Firma del Participante 6 Nov 2019
 Fecha

Claudia Resendiz Otero 
 Testigo 1 (Nombre y Firma) 6 - noviembre - 2019
 Fecha

Octavio Suarez Vergara 
 Testigo 2 (Nombre y Firma) 6 - noviembre - 19
 Fecha

Yo LN. Maria Fernanda Resendiz Otero, responsable de la investigación; he explicado al Sr. Maria Fernanda Resendiz Otero la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Maria Fernanda Resendiz Otero 
 Nombre y Firma de responsable de la investigación 6 - noviembre - 2019
 Fecha



Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
 Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308
 medicina@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

