



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS
OBTENIDOS DE ALBÚMINA 1 Y GLOBULINA DEL
GRANO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L)**

TESIS.

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q. F. B. PEDRO MARTÍNEZ BAUTISTA

MATRÍCULA: 208381224

CORREO: pedroquimedico@gmail.com

DIRECTOR: DR. JORGE SORIANO SANTOS

ASESOR: DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ

JURADO:

PRESIDENTE: DR. GERARDO DÍAZ GODÍNEZ

SECRETARIO: HÉCTOR BERNARDO ESCALONA BUENDÍA

VOCAL: DRA. MARÍA JOSÉ SERRANO MALDONADO

VOCAL: DRA. MARÍA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL, A 30 DE JULIO DEL 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Casa abierta al tiempo

EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS ANTITROMBÓTICOS
OBTENIDOS DE ALBÚMINA 1 Y GLOBULINA DEL
GRANO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus L.*)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:
Q.F.B. PEDRO MARTÍNEZ BAUTISTA

DIRECTOR:

DR. JORGE SORIANO SANTOS

ASESOR:

DRA. AURORA DE LA PEÑA DÍAZ

MÉXICO, DISTRITO FEDERAL, A 30 DE JULIO DEL 2015.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Este trabajo conto con el apoyo a través de la beca No. 223945.

México D.F. a 30 de Julio del 2015.

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis.

Evaluación de péptidos antitrombóticos obtenidos de albúmina 1 y globulina del
grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L).

que presentó

Q. F. B. Pedro Martínez Bautista.

Comité de Tutores:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos.

Asesor: Dra. Aurora De La Peña Díaz.

Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Díaz Godínez.

Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía.

Vocal: Dra. María José Serrano Maldonado.

Vocal: Dra. María Del Carmen Fajardo Ortiz.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL.

Al Dr. Jorge Soriano Santos: por haber creído en mí, por su confianza, por su apoyo incondicional y por su amistad.

A la Dra. Aurora De La Peña Díaz: por ser parte de su equipo de investigación, por sus consejos y por su amistad.

Al Antrop. Juan Carlos Rodríguez Elizondo, por su motivación, por su confianza y por su amistad.

ÍNDICE GENERAL.

RESUMEN.

1.0	INTRODUCCIÓN.	1
1.1	AMARANTO.	1
1.1.1	Clasificación.	2
1.1.2	Composición química.	2
1.1.2.1	Del vegetal.	2
1.1.2.2	De las hojas.	3
1.1.2.3	Del grano.	3
1.1.3	Propiedades nutricionales.	8
1.1.4	Propiedades nutracéuticas.	10
1.2	PEPTIDOS BIOACTIVO.	12
1.2.1	De los alimentos.	12
1.2.2	Del amaranto	14
1.2.1	Péptidos antitrombóticos.	18
1.3	HEMOSTASIA.	22
1.3.1	Vasoconstricción.	22
1.3.2	Hemostasia primaria.	23
1.3.3	Hemostasia secundaria.	23
1.3.4	Trombosis y acontecimientos antitrombóticos.	24
1.3.5	Endotelio.	25
1.3.5.1	Propiedades antitrombóticas.	25
1.3.5.2	Propiedades protrombóticas.	26
1.3.6	Plaquetas.	27
1.3.6.1	Adhesión.	27
1.3.6.2	Secreción.	28
1.3.6.3	Agregación.	29
1.3.7	Cascada de la coagulación.	29
1.3.7.1	Vía intrínseca.	31

1.3.7.2	Vía extrínseca.	31
1.3.7.3	Vía común.	32
1.3.8	Cascada fibrinolítica.	33
1.4	TROMBOSIS.	35
1.4.1	Epidemiología.	36
1.4.2	Fisiopatología.	38
1.4.2.1	Lesión vascular.	38
1.4.2.2	Estasis venosa.	39
1.4.2.3	Hipercoagulabilidad.	39
1.4.3	Etiología.	40
1.4.4	Factores de riesgo.	42
1.4.5	Manifestaciones clínicas	43
1.4.6	Diagnóstico.	45
1.4.7	Fármacos antitrombóticos.	46
1.4.7.1	Anticoagulantes.	46
1.4.7.2	Antiplaquetarios.	46
1.4.7.3	Fibrinolíticos.	46
2.0	JUSTIFICACIÓN.	50
3.0	HIPÓTESIS.	52
4.0	OBJETIVOS.	52
4.1	Objetivo general.	52
4.2	Objetivos específicos.	52
5.0	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.	53
6.0	MATERIAL Y MÉTODOS.	54
6.1	Molienda de los granos de amaranto.	54
6.2	Desengrasado de la harina de amaranto.	54

6.3	Extracción de albúmina 1 y globulina con Na ₂ SO ₄ .	54
6.3.1	Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford.	55
6.4	Hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina con alcalasa.	56
6.5	Grado de hidrólisis de albúmina 1 y globulina con TNBS.	56
6.6	Evaluación de la inhibición de la agregación plaquetaria.	57
6.6.1	Extracción de sangre.	57
6.6.2	Obtención del plasma rico en plaquetas.	57
6.6.3	Obtención del plasma pobre en plaquetas.	57
6.6.4	Inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados de la albúmina 1 y globulina.	58
6.7	Determinación del valor IC ₅₀ de los hidrolizados de la albúmina 1 y globulina.	59
6.8	Cromatografía de filtración en gel Sephadex G-15.	59
6.9	Activación plaquetaria de las fracciones de péptidos antitrombóticos.	60
6.10	Análisis estadístico.	60
7.0	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	61
7.1	Extracción de albúmina 1 y globulina con Na ₂ SO ₄ al 5%.	61
7.2	Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa y el porcentaje de inhibición plaquetaria.	63
7.3	Hidrólisis enzimática de globulina con alcalasa y el porcentaje de inhibición plaquetaria.	64
7.4	Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado 24h de albúmina 1.	67
7.5	Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado 24h de globulina.	68
7.6	Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.	71
7.7	Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina.	72
7.8	Inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP.	73
7.9	Inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con Epinefrina.	74

8.0	CONCLUSIONES.	77
9.0	PERSPECTIVAS.	78
10.	APÉNDICES.	79
10.1	Determinación de proteínas por el Método de Bradford.	79
10.2	Curva estándar de albúmina sérica bovina.	80
10.3	Extracción de albúmina 1 y globulina con Na ₂ SO ₄ al 5%.	81
10.4	Determinación del grado de hidrólisis enzimática por el Método de Adler-Nissen.	82
10.5	Curva estándar de glicina.	83
10.6	Hidrólisis enzimática de albúmina y globulina con alcalasa y del porcentaje de inhibición plaquetaria.	84
10.7	Regresión lineal del valor IC ₅₀ del hidrolizado de 24h de la albúmina 1 y globulina.	86
10.8	Curva estándar de marcadores utilizados en gel de Sephadex G-15	88
10.9	Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 de los hidrolizados de 24 h de albúmina y globulina.	89
10.10	Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de albúmina y globulina.	90
10.11	Inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP y epinefrina.	92
11.	BIBLIOGRAFÍA.	94

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Planta de amaranto de la especie <i>Amaranthus hypochondriacus L.</i>	1
Figura 2.	Perfiles predichos de péptidos de las proteínas de amaranto con actividades biológicas.	14
Figura 3.	Representación gráfica del proceso de vasoconstricción normal.	22
Figura 4.	Representación gráfica del proceso de hemostasia primaria normal.	23
Figura 5.	Representación gráfica del proceso de hemostasia secundaria normal.	24
Figura 6.	Representación gráfica del proceso de formación del trombo y sus acontecimientos antitrombóticos normales.	24
Figura 7.	Ilustración esquemática de las actividades procoagulantes y anticoagulantes de las células endoteliales.	26
Figura 8.	Ilustración esquemática de la adhesión y agregación plaquetaria.	27
Figura 9.	Ilustración esquemática del complejo de reacción inicial.	31
Figura 10.	Cascada de la coagulación.	32
Figura 11.	Cascada fibrinolítica.	34
Figura 12.	Tríada de Virchow en la trombosis.	38
Figura 13.	Representación gráfica de los mecanismos de acción de los fármacos antitrombóticos.	48
Figura 14.	Esquema de la estrategia experimental para la obtención y evaluación de las fracciones de péptidos con actividad antitrombótica.	53
Figura 15.	Método de extracción de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto.	55
Figura 16.	Reacción de TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 y globulina.	57
Figura 17.	Agregación plaquetaria con ADP 5 μ M. Relación entre el testigo normal y el problema.	58

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1.	Cuantificación de la albúmina 1 y globulina de la harina desengrasada del amaranto por el Método de Bradford.	61
Gráfica 2.	Grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la albúmina 1 a diferentes tiempos.	63
Gráfica 3.	Regresión lineal para la determinación del valor IC_{50} de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24h de la albúmina 1.	86
Gráfica 4.	Grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la globulina a diferentes tiempos.	64
Gráfica 5.	Regresión lineal para la determinación del valor IC_{50} de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24h de la globulina.	87
Gráfica 6.	Cromatograma de los hidrolizados de 24 horas de la albúmina 1.	67
Gráfica 7.	Cromatograma de los hidrolizados de 24 horas de la globulina.	68
Gráfica 8.	Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.	71
Gráfica 9.	Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina.	72
Gráfica 10.	Porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP.	73
Gráfica 11.	Porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducidos Epinefrina.	74
Gráfica 12.	Curva estándar de albúmina bovina.	80
Gráfica 13.	Curva estándar de glicina.	83
Gráfica 14.	Curva estándar de marcadores para la filtración en gel de Sephadex G-15.	88

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1.	Clasificación botánica de la planta de amaranto.	1
Tabla 2.	Composición química del amaranto.	4
Tabla 3.	Contenido de ácidos del amaranto.	5
Tabla 4.	Contenido de minerales del amaranto.	5
Tabla 5.	Contenido de vitaminas del amaranto.	6
Tabla 6.	Contenido de aminoácidos esenciales del amaranto.	6
Tabla 7.	Composición química proximal de distintas especies de grano de amaranto.	7
Tabla 8.	Composición de las fracciones de proteína del grano de amaranto y de algunos cereales.	7
Tabla 9.	Composición del análisis químico proximal del grano y harina desengrasada.	8
Tabla 10.	Diversas especies de amaranto, origen, uso y sabor.	9
Tabla 11.	Ejemplos de ingredientes de los alimentos nutraceúticos disponibles en el mercado que llevan péptidos bioactivos.	11
Tabla 12.	Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de los alimentos.	13
Tabla 13.	Biopéptidos identificados en la digestión de tripsina de la fracción de gluteína del amaranto.	16
Tabla 14.	Péptidos bioactivos aislados recientemente del amaranto.	17
Tabla 15.	Comparación de secuencias de aminoácidos de fibrinógeno y un péptido de la κ -caseína bovina.	18
Tabla 16.	Perfil de actividad antitrombótica potencial de proteínas de la leche.	20
Tabla 17.	Péptidos antitrombóticos aislados recientemente de los alimentos.	21
Tabla 18.	Moléculas antitrombóticas del endotelio vascular.	25
Tabla 19.	Moléculas protrombóticas del endotelio vascular	26
Tabla 20.	Productos liberados por plaquetas.	28
Tabla 21.	Agonistas plaquetarios.	29
Tabla 22.	Características generales de los factores de la coagulación.	30
Tabla 23.	Moléculas antitrombóticas de la cascada de la coagulación.	33
Tabla 24.	Principales causas de mortalidad general, 2001. Datos nacionales.	36
Tabla 25.	Causas de trombofilia.	41
Tabla 26.	Factores de riesgo que predisponen al desarrollo de trombosis.	42

Tabla 27.	Síndromes por oclusión arterial sistémica aguda.	43
Tabla 28.	Síndromes por oclusión venosa sistémica aguda.	44
Tabla 29.	La hemostasia en la normalidad.	45
Tabla 30.	Clasificación de los principales agentes antitrombóticos.	47
Tabla 31.	Efectos adversos de los principales agentes antitrombóticos.	49
Tabla 32.	Clasificación de las especies obtenidas por cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado de 24 de albúmina 1 y globulina.	70
Tabla 33.	Orden de adicción de los reactivos para la cuantificación de proteínas de albumina 1 y globulina.	79
Tabla 34.	Valores de absorbancia correspondientes a la curva estándar de albúmina bovina.	80
Tabla 35.	Valores obtenidos de la cuantificación de la albúmina y globulina por el Método de Bradford.	81
Tabla 36.	Orden de adición de los reactivos para la proteólisis de albúmina 1 y globulina.	82
Tabla 37.	Valores de absorbancia correspondiente a la curva estándar de glicina.	83
Tabla 38.	Valores obtenidos del grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la albúmina 1 a los diferentes tiempos.	84
Tabla 39.	Valores obtenidos del grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de globulina a los diferentes tiempos.	85
Tabla 40.	Valores obtenidos para la determinación del valor IC ₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24h de la albúmina 1.	86
Tabla 41.	Valores obtenidos para la determinación del valor IC ₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24h de la globulina.	87
Tabla 42.	Valores de los logaritmos de pesos moleculares correspondientes a la curva estándar de marcadores utilizados para la filtración en gel de Sephadex G-15.	88
Tabla 43.	Valores obtenidos de los pesos moleculares relativos de las fracciones de la albúmina 1.	89
Tabla 44.	Valores obtenidos de los pesos moleculares relativos de las fracciones de la globulina.	89
Tabla 45.	Valores obtenidos del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.	90

- Tabla 46. Valores obtenidos del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina. 91
- Tabla 47. Valores obtenidos del porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 con ADP. 92
- Tabla 48. Valores obtenidos del porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 con Epinefrina. 93

RESUMEN.

Título: Evaluación de péptidos antitrombóticos obtenidos de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto. **Hipótesis:** La hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto con alcalasa dará como resultados la obtención de diferentes péptidos, algunos de los cuales resultarán con actividad antitrombótica. **Material y métodos:** Las proteínas del grano de amaranto se extrajeron utilizando una disolución de Na₂SO₄ 0.04 M, posteriormente se hidroliza con alcalasa 2.4 mUA/mL, además se evaluaron el grado de hidrólisis con TNBS, la inhibición de la agregación plaquetaria inducido con ADP 5 µM y epinefrina 10 µM. Los resultados fueron analizados mediante una prueba de Dunnett, con un nivel estadístico de significancia de p<0.05, utilizando el software GraphPad Prisma 5 para Windows. **Resultados:** El % de inhibición de la agregación plaquetaria de la proteína extraída del amaranto: albúmina 1 de 75.21±0.05% con un IC₅₀= 0.4311±0.001 mg/mL y de otra fracción estudiada: globulina de 77.68±0.05% con un IC₅₀= 0.0128±0.001mg/mL hidrolizados con alcalasa a las 24 h. Se observa que el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria, para la fracción A1 mostró mayor actividad (82.44±0.05%) y para la fracción G2 mostró mayor actividad (81.25±0.05%). Además, se observa un % de inhibición antiagregante plaquetario para A1 (62.23±8.51%), para G2 (57.86±12.8%) inducido por ADP y para A1 (43.24±16.0%), para G2 (46.34±13.2%) inducido por epinefrina. **Conclusiones:** Entre los mecanismos posibles del efecto antiagregante plaquetario se encuentran: a) que las fracciones de péptidos de la A1 y G2 presentan inhibición de los receptores de ADP (P2Y₁, P2Y₁₂) y de epinefrina (α-2 adrenérgico), b) que influyan en la liberación de calcio intraplaquetario con sus consecuencias biológicas subsecuentes. La presencia de estos péptidos con inhibición antiplaquetaria establece el potencial de futuras investigaciones *in vivo* en el campo de alimentos funcionales (nutracéuticos) en beneficio de la salud humana.

SUMMARY.

Title: Evaluation of antithrombotic peptides derived from albumin 1 and globulin grain amaranth. **Hypothesis:** Hydrolysis of proteins alcalase grain amaranth give as obtaining results different peptides, some of which result in antithrombotic activity. **Methods:** the grain amaranth proteins were extrated using a solution of 0.04M Na₂SO₄ then hydrolyzed with alacalse 2.4mUA/mL, plus the degree of hydrolysis with TNBS were evaluated, the activity of platelet inhibition with ADP 5μM and epinephrine 10μM. The results were analyzed by Dunnett's test, with a statistical significance level of p<0.05, using the software GranphPad Prism 5 for Windows. **Results:** The % inhibition of coagulation of albumin 1 is 75.21±0.05% with an IC₅₀=0.4311±0.001mg/mL and globulin is 77.68±0.05% with an Ic₅₀=0128±0.001mg/mL to hydrolysates with alcalase 24h. It shows that the percentage of antithrombotic activity, the A1 fraction showed increased activity (82.44±0.05%); G2 fraction showed the highest activity (81.25±0.05%). Furthermore a % for A1 antithromboticactivity (62.23±8.51%) to G2 (57.86±12.8%) induced by ADP and A1 (43.24±16.0%), G2 (46.34±13.2%) induced by epinephrine is observed. **Conclusions:** Possible mechanisms of antiplatelet effect are: a) the peptide fractions A1 and G2 show inhibition of ADP receptors (P2Y₁, P2Y₁₂) and epinephrine (β-2 adrenergic), b) influence the release of calcium intraplatelet with subsequent biological consequences. The presence of these peptides with antiplatelet inhibition provides the potential for future research in vivo in the field of functional foods (nutraceuticals) to benefit human health.

1.0 INTRODUCCIÓN.

1.1 AMARANTO.

El amaranto pertenece a la familia *Amaranthaceae* con más de 60 géneros, que incluyen alrededor de 800 especies de dicotiledóneas, plantas herbáceas anuales o perennes. Existen tres especies del género *Amaranthus* que producen grandes inflorescencias, a menudo con más de 50 mil semillas por planta. Estos son: *Amaranthus cruentus* en Guatemala, *Amaranthus caudatus* en Perú y *Amaranthus hypochondriacus* en México [Figura 1].

El amaranto es una planta de crecimiento rápido que puede desarrollarse en climas calientes y templados donde el suministro de agua es limitado, regiones húmedas de África, el sur-este de Asia, el sur de China e India, que están representados por varias especies de amaranto, como *Amaranthus tricolor*, *Amaranthus dubius*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus edulis*, *Amaranthus retroflexus*, *Amaranthus viridis* y *Amaranthus hybridus*.



Figura 1. Planta de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus* L.

1.1.1 Clasificación.

El amaranto es una planta dicotiledónea, no es una hierba como la mayoría de los cereales, que son monocotiledóneas, sino que es un pseudocereal. El amaranto muestra una plasticidad botánica extrema en la adaptación que contribuye a la dificultad y confusión en su taxonomía [Tabla 1]. Se clasifica por medio de la estructura de la flor, la forma y proporción de hojas y las inflorescencias. Estos caracteres muy variables también permiten una alta frecuencia de hibridación y asegurar la disponibilidad de una gran reserva de germoplasma.

Reino	Vegetal
División	Embryophyta Syphonograma
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledonea
Subclase	Archiclomidae
Grupo	Thalamifloreae
Orden	Caryophyllales
Género	Amaranthus
Especie	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>

Tabla 1. Becker y cols., 1981. Clasificación botánica de la planta de amaranto.

1.1.2 Composición química.

1.1.2.1 Del vegetal.

La composición química de la parte vegetal del amaranto se muestra en la Tabla 2. El contenido de humedad de todas las especies varía alrededor del 70-94%. Sobre una base de peso seco (dwb), la proteína cruda varía del 18-38% y de lípidos crudos totales del 1.3-10.6%. La fracción lipídica contiene un 53.3% de lípidos no polares, 33.8% de glicolípidos y 12.6% de fosfolípidos. Los ácidos grasos principales incluyen: linolénico (30-70%) y palmítico (13-14%) así como el ácido oleico y esteárico [Tabla 3]. La variabilidad en la fibra cruda es también bastante grande de 5.4-24.6%. Por último, los valores de contenido de cenizas de 7.6-22.2% (Bressani, 2003) [Tabla 2].

Los niveles de calcio, potasio y magnesio son bastante altos, el calcio presente en mayor cantidad de 2-3%. Además, grandes cantidades de fósforo, también se encuentran con valores de 0.49-0.79%. Por otra parte, existe una concentración relativamente alta de hierro de 0.08-0.50% [Tabla 4]. Por último, las cantidades de vitamina B₁ y B₂, ácido nicotínico y ácido ascórbico son similares a los encontrados en otras verduras, pero el contenido de β-caroteno es tan alto o más alto, que los reportados por otros vegetales verdes [Tabla 5] (Paredes-López y cols., 2006).

El amaranto al igual que muchas otras plantas que crecen, tiene una tendencia a acumular nitratos y oxalatos. Sobre una base de peso seco (dwb). Los valores reportados van de 0.27-0.74% de nitrato. Por otra parte, los valores reportados van de 1.1-7.9% de oxalato [Tabla 2] (Raina y cols., 1992).

1.1.2.2 De las hojas.

La composición química de las hojas del amaranto muestra que proporcionan un valor nutricional bueno relativamente. Su contenido de aminoácidos esenciales es atractivo y alto en lisina, pero el contenido de aminoácidos azufrados es bajo [Tabla 6]. Además, el contenido de hierro y β-caroteno son altamente disponibles [Tabla 4 y 5] (Paredes-López y cols., 1994).

1.1.2.3 Del grano.

La composición química del grano del amaranto se muestra en la Tabla 2. El contenido de proteína cruda varía desde 11.8% hasta 17.6%. El contenido de lípidos totales de todas las especies es de 4.8% a 8.1%. Los datos de fibra dietética son insuficientes. Sin embargo, los valores de *Amaranthus caudatus* se han reportado de 7.6% a 16.4%. El almidón es el componente químico más abundante en el grano de amaranto, el contenido varía de 48 a 69%, está presente principalmente como amilopectina altamente ramificada, pero algunas variedades de grano de amaranto contienen 4.8% a 7.22% de amilosa. Otros carbohidratos incluyen la sacarosa, la rafinosa, la estaquiosa y la maltosa (Rastogi y cols., 2013).

El contenido de vitaminas, parecen ser relativamente constante entre las especies [Tabla 5]. Algunas de las vitaminas, por ejemplo, el ácido nicotínico es bajo en comparación con el contenido de ácido nicotínico en los cereales, que muestran valores de alrededor de dos a tres veces mayor. La composición del contenido de aminoácidos esenciales en el grano de amaranto revela que el aminoácido más deficiente es la leucina. Sin embargo, otros aminoácidos, tales como valina, isoleucina y treonina pueden ser limitantes. Además, la proteína de amaranto es buena fuente de lisina, triptófano y aminoácidos azufrados [Tabla 6] (Bressani, 2003).

	Vegetal	Grano	Forraje
Humedad	85.0 ± 4.4	9.9 ± 2.0	87.8 ± 0.76
Materia seca	15.0 ± 4.4	90.1 ± 2.0	12.2 ± 0.76
Proteínas (Nx6.25)	24.1 ± 4.2	15.2 ± 1.7	19.2 ± 5.6
Lípidos totales	3.8 ± 0.68	7.0 ± 1.6	2.9 ± 1.3
Fibra cruda	14.9 ± 3.7	6.2 ± 3.2	16.6 ± 6.2
Fibra dietética		13.6 ± 4.8	
Cenizas	17.7 ± 1.6	3.3 ± 0.5	19.0 ± 3.9
Carbohidratos	42.9 ± 4.6	62.1 ± 7.6	43.8 ± 8.6
Amilosa		6.1 ± 1.2	
Energía	284	366	337
(calorías por 100g)			
Energía metabólica (kJ ⁻¹)		12.2	
Nitrato	0.55 ± 0.19		
Oxalato	4.5 ± 1.8		5.86 ± 1.89
Fitato		1.03±1.16	
Taninos			63.5 ± 7.7
Paredes de las células			43.4 ± 10.9
Fibra de detergente neutro			34.6 ± 15.0
Fibra de detergente ácido			5.2
Lignina de detergente ácido			23.4
Celulosa			60.0 ± 4.1
Digestión <i>In vitro</i> (%)			

Tabla 2. Bressani, 2003. Composición química del amaranto (g/100g).

Ácidos grasos	Vegetal	Grano
Ácido mirístico	1.1	0.53 ± 0.3
Ácido palmítico	13.3	20.4 ± 2.0
Ácido esteárico	4.6	3.5 ± 1.5
Ácido oleico	4.7	26.1 ± 5.6
Ácido linoleico	6.4	48.0 ± 7.3
Ácido linolénico	34.4	1.43 ± 0.8
Ácido araquidónico	0.5	1.6 ± 0.9

Tabla 3. Bressani, 2003. Contenido de ácidos grasos del amaranto (g/100g).

Minerales	Vegetal (g /100g^a)	Grano (mg /100g^a)	Forraje (g /100g^a)
Fosforo	0.66 ± 0.22	578 ± 38.9	0.70 ± 0.28
Potasio	0.19 ± 0.02	541 ± 80.7	
Calcio	2.57 ± 0.62	212 ± 66.0	2.45 ± 0.76
Magnesio	1.10 ± 0.30	327 ± 42.8	
Sodio		22.5 ± 6.9	
Hierro	0.19 ± 0.15	35.6 ± 32.9	
Cobre		1.81 ± 1.06	
Manganeso		3.42 ± 0.90	
Zinc		3.83 ± 0.38	
Azufre		150	
Aluminio	0.015	1.0	
Selenio	0.003		

Tabla 4. Bressani, 2003. Contenido de minerales del amaranto.

Vitamina	Vegetal	Grano
Tiamina	0.68 ± 0.32	0.136 ± 0.076
Rivoflavina	2.24 ± 0.43	0.223 ± 0.056
Ácido nicotínico	7.47 ± 1.66	1.153 ± 0.161
Biotina		42.5 ± 1.5
Ácido fólico		43.8 ± 1.5
Vitamina C	570.7 ± 89.6	4.47
Caroteno	33.3 ± 16.68	4.6

Tabla 5. Bressani, 2003. Contenido de vitaminas del amaranto (mg/100g).

Aminoácidos esenciales	Vegetal	Grano
Leucina	421 ± 76.5	356 ± 17.6
Isoleucina	327 ± 38.7	226 ± 15.9
Lisina	300 ± 34.9	351 ± 21.4
Metionina	78 ± 43.6	124 ± 17.7
Cisteína	24 ± 8.1	124 ± 6.4
Fenilalanina	314 ± 78.0	270 ± 40.1
Tirosina	232 ± 48.7	220 ± 32.6
Treonina	356 ± 75.9	238 ± 21.3
Triptófano	80	76 ± 12.3
Valina	355 ± 31.4	256 ± 14.1

Tabla 6. Bressani, 2003. Contenido de aminoácidos esenciales del amaranto (mg de aminoácido por g de nitrógeno).

Existen tres especies de amaranto que producen granos nutritivos: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*. La composición química proximal en los granos de amaranto es inconsistente entre las tres especies. Los rangos reportados se muestran en la Tabla 7.

Componente	<i>A. caudatus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
Humedad	11	7.5	11
Proteína cruda ^a	18	15.7	18
Grasa	7.5	7.3	7.7
Fibra	4.5	4	2.2
Cenizas	3	3.5	4.1
Carbohidratos ^b	56	62	57

Tabla 7. Paredes-López, 1994. Composición química proximal de distintas especies de grano de amaranto (g/100g).

^aN x 5.85, ^b Por diferencia

La composición de las fracciones de proteína que se encuentra en el grano de amaranto se muestra en la Tabla 8. La concentración de albúmina se encontró que varían entre el 20% a 23% y el de la globulina entre el 18% a 21%. Las prolaminas solubles en alcohol se ha encontrado que varían entre el 2% a 3% y el de gluteinas solubles en álcali entre el 42% a 46%.

Grano	Fracción proteica (%)		
	Albúminas+Globulinas	Prolaminas	Gluteinas
Amaranto	56-62	1-3.1	22-30
Maíz	6	55	40
Trigo	15	69	16
Avena	79-81	10-16	5
Sorgo	16	52	32

Tabla 8. Bressani y García-Vela, 1990. Composición de las fracciones de proteína del grano de amaranto y de algunos cereales.

1.1.3 Propiedades nutricionales.

El análisis químico proximal del grano y harina desengrasada de amaranto se muestra en la Tabla 9. La harina de amaranto se caracteriza por una alta concentración de proteína del 18% comparada con otros cereales del 8.5% a 14%.

Análisis	Grano (g/100g)	Harina desengrasada (g/100g)
Humedad	10.87 ± 0.11 ^c	10.86 ± 0.12
Proteína Cruda ^a	14.08 ± 0.17	15.38 ± 0.18
Extracto Etéreo	7.14 ± 0.14	0.22 ± 0.00
Fibra Cruda	4.56 ± 0.04	4.91 ± 0.08
Cenizas	2.85 ± 0.04	3.27 ± 0.01
Extracto libre de Nitrógeno ^b	60.5 ± 0.02	65.36 ± 0.06

Tabla 9. Tovar-Pérez y cols., 2009. Composición del análisis químico proximal del grano y harina desengrasada.

^a Nx 6.25, ^b Por diferencia, ^c Desviación estándar.

La harina del grano del amaranto ha sido probada como un suplemento de la harina de trigo, maíz y arroz para su uso en pasteles, panadería, pastas, tortillas y productos similares [Tabla 10]. Asimismo, la harina del grano de amaranto ha sido probada como un ingrediente de alimentos ricos en proteínas de alta calidad y como una bebida en mezclas con leche y harinas de otros granos (Bressani, 2003).

Por otra parte, las posibilidades de productos son numerosos, pero muy pocos se han comercializado. Un total de 60 alimentos de granos de cereales que contienen pequeñas cantidades de amaranto son comercializados en América. En México, ocho granos de amaranto reventado diferentes se comercializan, con el producto más popular “alegría” (una mezcla de amaranto reventado con el azúcar) (Bressani, 2003).

Especie	Tipo	Color del grano	Uso	Sabor
<i>A. cruentus</i>	Mexicano	Dorado	Reventado, panificación	Dulce
	Africano	Café	Vegetal, crepas, cereal	Tostado
	Guatemala	Café	Crepas	Nuez
<i>A. hypochondriacus</i>	Mercado	Dorado	Versatilidad y alta calidad	Muy dulce
	Nepal	Dorado	Pobre en reventado	Poco dulce
<i>A. hybridus</i>	Prima	Blanca, negra	Crepas	Dulce, nuez
<i>A. caudatus</i>		Café	Potajes	Trigo

Tabla 10. Paredes y cols., 2006. Diversas especies de amaranto, origen, uso y sabor.

1.1.4 Propiedades nutracéuticas.

Las semillas de amaranto son una fuente valiosa de proteínas en la dieta con la calidad nutricional muy alta y recientemente, su potencial como nutracéutico se ha propuesto (Vecchi y Añón, 2009), pero poco se sabe acerca de sus compuestos bioactivos (Silva-Sánchez y cols., 2008) [Tabla 11].

Los “Nutracéuticos” son péptidos bioactivos que son constituyentes fundamentales de muchos productos o ingredientes comercializados como “Alimentos funcionales”. En estos productos los péptidos bioactivos se adicionan o se enriquecen mediante la modificación del proceso de fabricación habitual (por ejemplo, el cambio de los parámetros del proceso o el uso de cultivos iniciadores). Algunos de estos productos, son alimentos tradicionales que ahora se ofrecen con una estrategia de mercadotecnia diferente. En la Tabla 11. Se enumera algunos ejemplos de alimentos funcionales disponibles en el mercado e ingredientes alimentarios que llevan péptidos bioactivos, los cuales, incluyen la declaración de propiedades saludables relacionadas con el producto correspondiente.

Los péptidos bioactivos también están incluidos en matrices no alimentarios para proporcionar cierto efecto potenciador de la salud. Por ejemplo, los caseino fosfopéptidos (CCPs), se añaden en combinación con fosfato de calcio amorfo a la solución de enjuague bucal, pasta de dientes (Prospec MI Paste™, GC Tooth Mousse™) o goma de mascar (Recaldent™, Trident™).

Los péptidos bioactivos derivados de alimentos también tienen un enorme potencial como ingredientes de productos farmacéuticos. Por ejemplo, se han fabricado cápsulas que reducen la presión arterial que contienen Oligopéptidos de Katsuoibushi (Leu-Lys-Pro-Asn-Met) tratado con termolisina de Bonito seco (peces de la familia del atún), que es convertido en su forma activa (Leu-Lys-Pro) por enzimas digestivas (Vasotensin 120T™ por Metagenics, USA; PeptACE™, Peptides 90 por Natural Factors, USA) (Hartmann y Meisel, 2007).

Nombre del producto			Fabricante	Tipo de alimento	Péptidos bioactivos	Propiedades saludables
Calpis	AMEEL S,		Calpis Co, Japón	Leche agria	VPP, IPP (β -CN y κ -CN)	Hipotensor
Calpico						
Evolus			Valio, Finlandia	Leche fermentada enriquecida en calcio	VPP, IPP (β -CN y κ -CN)	
Biozate			Davisco, USA	Hidrolizado de β -LG	Péptidos de suero de leche	
C12 Peption			DMV, Países bajos	Ingrediente	Dodecapéptido derivada de caseína FFVAPFPEVFGK	
Peptide Soup			NIPPON, Japón	Sopa	Péptidos derivado de Bonito	
Casein Drink	DP Peptio		Kanebo, Japón	Bebida sin alcohol	Dodecapéptido derivada de caseína FFVAPFPEVFGK	
BioPURE-GMP			Davisco, USA	Hidrolizado de proteína de suero de leche	Glicomacropéptido	Anticariogénica, Antimicrobiano, Antitrombótico
CholestBlock CSPHP			Kyowa Hakko, Japón	Bebida en polvo	Péptidos de soya unidos a fosfolípidos	Hipocolesterolémica
ProDiet F200			Ingredia, Francia	Bebida de leche, Confitería	α_{s1} -CN (F91-100) ^a YLGYLEQLLR	Reduce el estrés
Capolac			Arla Foods, Dinamarca	Ingrediente	CPP	Absorción de minerales
Tekkotsu Inryou			Suntory, Japón	Bebida sin alcohol	CPP	
Kotsu Kotsu Calcium			Asahi, Japón	Bebida sin alcohol	CPP	
CE90CPP			DMV, Países bajos	Ingrediente	CPP (20%)	
Glutamin peptide			DMV, Países bajos	Hidrolizado de proteína de la leche en seco	Péptidos ricos en glutamina	Inmunomodulador
WGE80GPA						
WGE80GPN						
WGE80GPU						

Tabla 11. Hartmann y Meisel, 2007. Ejemplos de ingredientes de alimentos funcionales disponibles en el mercado que llevan péptidos bioactivos.

^af, fragmento.

1.2 PEPTIDOS BIOACTIVOS.

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, inactivas dentro de la proteína intacta pero que pueden ser liberados durante la digestión del alimento en el organismo del individuo o por un proceso de hidrólisis enzimática y ejercer diversas funciones (Vioque y cols., 2000).

Generalmente, se utilizan tres estrategias para identificar y caracterizar a los péptidos con actividad biológica:

1. Aislamiento a partir de la digestión enzimática *in vitro* de proteínas.
2. Aislamiento a partir de la digestión gastrointestinal *in vivo* de proteínas.
3. Síntesis química basada en diseños combinatorios de una biblioteca de péptidos que presentan una estructura idéntica y de los cuales se conoce su bioactividad (Meisel, 2001).

En la actualidad, el valor nutricional y funcional de una proteína es determinado no únicamente por la composición total de aminoácidos y por su digestibilidad sino también por la presencia de péptidos bioactivos en su secuencia (Pedroche y cols., 2002).

1.2.1 De los alimentos.

Muchos de los péptidos de origen vegetal y animal con potencial bioactivo se han descubierto, hasta ahora la mayoría aislados de los productos lácteos. Candidatos de proteínas que contienen estas actividades biológicas latentes se encuentran en la leche, huevos, carne y pescado, así como en diferentes proteínas vegetales como la soya y el trigo [Tabla 12].

Efecto	Origen	Proteína(s) encriptada	Nombre/Comentarios/Secuencia
Inhibidor de la ECA/Hipotensores	Soya	Proteína de soya	NWGPLV
	Pescado	Proteína de músculo	LKP, IKP, LRP (derivado de sardina, bonito, atún, calamar)
		Carne	Proteína de músculo
	Leche	α -LA, β -LG	Lactoquininas (WLAHK, LRP, LKP)
		α -CN, β -CN, κ -CN	Casoquininas (FFVAP, FALPQY, VPP)
	Huevo	Ovotransferrina	KVREGTTY
		Ovoalbúmina	Ovoquinina (FRADHPPL) Ovoquinina (2-7) (KVREGTTY)
Inmunomoduladores	Trigo	Gliadina de trigo	IAP
	Brócoli	Proteína vegetal	YPK
	Arroz	Albúmina de arroz	Oryzatensin (GYPMYPLR)
	Huevo	Ovoalbúmina	Péptidos no especificados
	Leche	α -CN, β -CN, κ -CN, α -LA	Inmunopéptidos (α _{S1} -inmunocasoquininas) (TTMPLW)
		Trigo	Gluten de trigo
	Citomoduladores	Leche	α -CN, β -CN
Agonistas opiáceos	Trigo	Gluten de trigo	Gluten-exorfina A4, A5 (GYYPT), B4, B5 y C(YPISL)
	Leche	α -LA, β -LG	α -Lactorfinas, β -Lactorfinas
α -CN, β -CN		Casomorfinas Lactoferoxinas	
Antagonistas opiáceos	Leche	Lactoferrina	Casoxinas
Antimicrobianos	Huevo	Ovotransferrina	OTAP-92(f109-200) ^a
		Lisozima	Péptidos no especificados
	Leche	Lactoferrina α -CN, β -CN, κ -CN	Lactoferricina Casecidinas, Isracidina, Kappacina
Antitrombóticos	Leche	κ -CN (glicomacropéptido)	κ -CN (f106-116) ^a , Casoplatelinas
Transportadores de iones/Anticariogénico	Leche	α -CN, β -CN	Caseinofosfopéptidos
Hipocolesterolémico	Soya	Glicina	LPYPR
	Leche	β -LG	IIAEK
Antioxidantes	Pescado	Músculo de sardina	MY
	Trigo	Proteína de germen de trigo	Péptidos no especificados MHIRL, YVEEL, WYSLAMAASDI
	Leche	α -LA, β -LG	

Tabla 12. Hartmann y Meisel, 2007. Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de los alimentos.

CN, caseína; LA, lactoalbúmina; LG, lactoglobulina.

^af, fragmento.

Silva-Sánchez y cols. (2008), reportaron información sobre el potencial de los péptidos bioactivos de las proteínas de amaranto. Hubo 36 secuencias de proteínas de las semillas de amaranto reportados en la base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas secuencias se han probado para todos los 1573 péptidos activos reportados por BIOPEP (base de datos de secuencias de proteínas, péptidos bioactivos, proteínas alergénicas con sus epítopos y péptidos sensoriales con sus residuos de aminoácidos) (www.uwm.edu.pl/biochemia) con 39 actividades diferentes. En la figura 2. Se presenta información sobre el potencial de los péptidos bioactivos de las proteínas del amaranto.

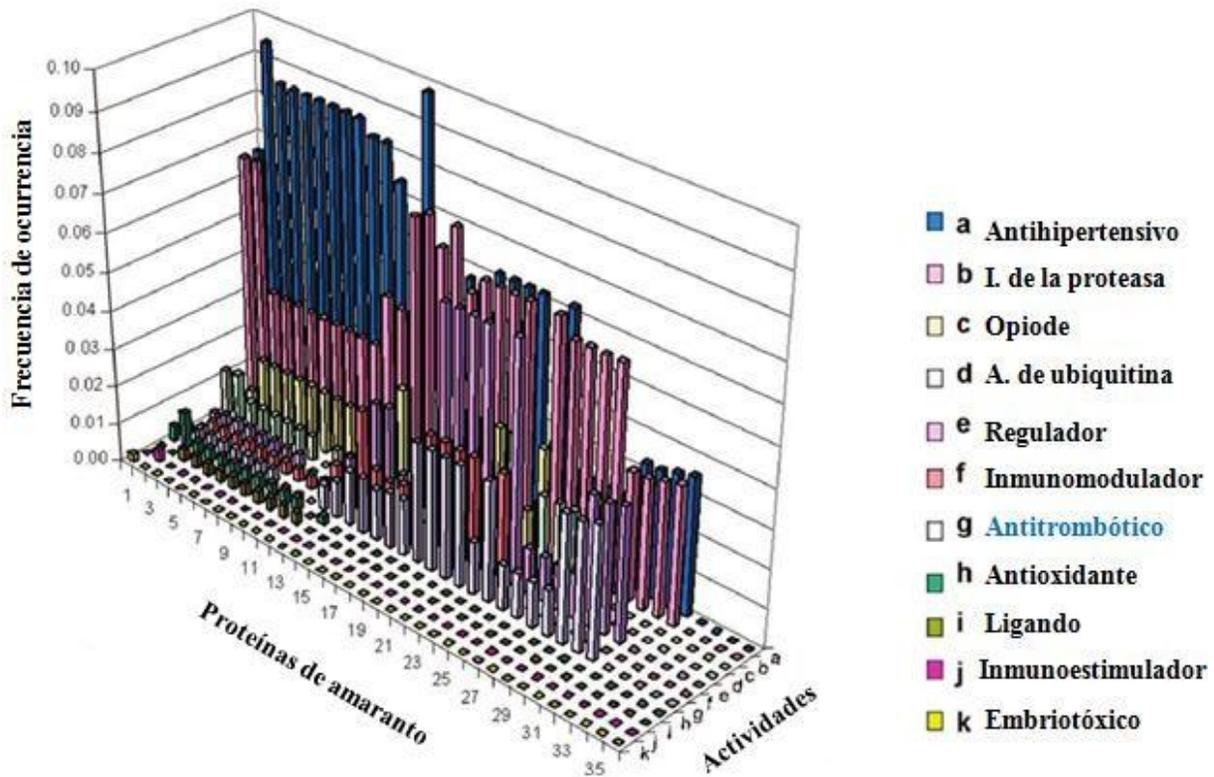


Figura 2. Perfiles predichos de péptidos de las proteínas de amaranto con actividades biológicas. Tomado de Silva-Sánchez y cols., 2008.

Los péptidos activos se encuentran en las proteínas del amaranto con 12 actividades principales: antiamnésico (poderoso proceso de consolidación de la memoria en el sistema nervioso central), antitrombótico (como potencial anticoagulante y fibrinolítico del plasma sanguíneo), inmunomoduladores (actúan como inmunopotenciadores), opioides (actúan como analgésicos potentes), reguladores e inmunoestimulantes, (estimular a las células fagocíticas implicadas en la defensa del organismo contra la infección), antioxidante (ofrecen protección contra la peroxidación de las células), ligando (actúan en el sistema de transporte de oligopéptidos), activación de la proteólisis mediada por la ubiquitina o AUMP (ubiquitinación de proteínas), embriotóxicos (muestra actividad embriotóxica), inhibidor de la proteasa (inhibidor de la dipeptidil-aminopeptidasa IV) y antihipertensivos (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina I).

Además, poseen actividad de neuropéptido (mostró actividad antinociceptiva), anoréxico (inhibidor de la secreción de insulina) y antiinflamatorio (inhibidor de la enzima ciclooxigenasa). En la tabla 13 se presenta información sobre el perfil de algunas de las actividades de los péptidos bioactivos de las proteínas del amaranto.

Actividad	La frecuencia de ocurrencia	Secuencias con actividad biológica
Inhibidor de la proteasa	0.0805	AP, FA, FP, GP, GPRI, GQ, HA, IPI, KA, LA, LL, LP, MA, MP, PA, PP, PPLP, PPPA, VA, VP, VPL, VV
Antihipertensivo	0.0566	AAP, AIP, ALPP, AVP, AY, FNQ, FP, FQP, FY, GGY, GKP, GRP, GY, HIR, HY, IKP, ILP, IR, IRA, IY, LAA, LAMA, LAY, LF, LLP, LNP, LPP, LW, LY, MF, MY, PLP, PQR, PR, PRY, RF, RL*, RYTAP, VAA, VAP, VAY, VF VLP, VPP, VRP, VSP, VW, VY, VYP, YG, YGGY, YL, YP
Activación de la proteólisis mediada por la ubiquitina	0.0183	LA, RA, WA
Regulación	0.0123	DY, GFL, GLY, GP, LGY, PG, PGP
Antitrombótica	0.0095	PPG, PG, GP
Antiamnésico	0.0093	PPG, PG, GP
Opioides	0.0062	NAGA, GYY, PLG, YG, YL, YPF
Inmunomoduladores	0.0037	FAE, GFL, KRP, TKPR, YG, YGG
Antioxidantes	0.0036	HH, HL, LH, LHH
Ligando	0.0026	KK
Neuropéptido	0.0010	KPS
Inmunoestimulante	0.0009	KEEAE, LGY, LLY
Embriotóxicos	0.0005	RGD
	0.0004	PGP
Antiinflamatorios	0.0002	DTEAR

Tabla 13. Silva-Sánchez y cols., 2008. Biopéptidos identificados en la digestión de tripsina de la fracción de gluteína del amaranto.

Existen limitados trabajos que indican la presencia de péptidos bioactivos encriptados en las proteínas del amaranto. Se utilizaron principalmente métodos enzimáticos para producir la hidrólisis de las proteínas y se observó que la acción de la alcalasa y la tripsina sobre los aislados proteicos del amaranto permitieron obtener péptidos con potencial actividad biológica (Orozco-Condori y cols., 2014) [Tabla 14].

Actividad	Origen	Condición	Péptido/AAP	IC ₅₀ /Actividad	Referencia
Anticanceroso	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> : Glutelina	Hidrólisis con tripsina: 14 horas	Lunasin (18.5 kDa)	3.0µg/g de proteína extraída	Silva-Sánchez, 2008
Inhibidor de la ECA I	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> : Albúmina 1 (A) Globulina (G)	Hidrólisis con alcalasa: A: 18 horas G: 15 horas	A: 0.55 kDa G: 0.4 kDa	A: 0.35±0.02mg/ml G: 0.15±0.03mg/ml	Tovar-Pérez, 2009
Antitumoral	<i>Amaranthus mantegazzianus</i> : MPI	Hidrólisis con alcalasa: 4 horas	(<3 kDa)	1.0±0.05mg/ml	Barrio y Añón, 2009
Antioxidante	<i>Amaranthus mantegazzianus</i> : Albúmina (Alb) Globulina (Glob) GlobulinaP (GlobP) Glutelina (Glut)	Hidrólisis con alcalasa: 4 horas	(<0.5 kDa)	Alb: 35.6µg Glob: 45.8µg GlobP: 16.5µg Glut: 22.4 µg	Tironi y Añón, 2010
Inhibidor de la DPP IV	<i>Amaranthus hypochondriacus</i> : Globulina 11S	Hidrólisis con tripsina: 14 horas	STHASGFFFFHPT (<10 kDa)	1.1mg/ml	Velarde-Salcedo, 2013

Tabla 14. Péptidos bioactivos aislados recientemente del amaranto.

AAP = Perfil de aminoácidos; IC₅₀ = Concentración que causa el 50% de inhibición; ECA I = Enzima convertidora de angiotensina I; MPI = Aislado proteico *A. mantegazzianus*; DPP IV = Dipeptidil peptidasa IV.

1.2.3 Péptidos Antitrombóticos

Se han descubierto ciertas similitudes entre la coagulación de la leche y de la sangre (Fiat y cols., 1993), así como la homología en las secuencias entre la cadena- γ del fibrinógeno y κ -caseína o su glicomacropéptido (GMP). De hecho, se plantea la hipótesis de que la cadena- γ del fibrinógeno y de la κ -caseína pueden haber evolucionado a partir de un antepasado común durante los últimos 450 millones de años (Jollés y cols., 1978).

Existen similitudes estructurales y funcionales entre el dodecapéptido C-terminal de la cadena- γ del fibrinógeno (400-411) y varios péptidos de la κ -caseína bovina (106-116), que se denominan casoplatelinas [Tabla 15]. Asimismo, existen similitudes entre el tetrapéptido (RGDX) de la cadena- γ del fibrinógeno (572-575) y el tetrapéptido (KRDS) de la lactoferrina humana (39-42), que están implicados en la unión a los receptores plaquetarios (Rutherford y cols., 2000).

cadena- γ del Fibrinógeno	κ -caseína Bovina
⁴⁰⁰ HHLGGAKQAGDV ⁴¹¹	¹⁰⁶ MAIPPKKQ-DK ¹¹⁶
¹⁶⁹ IKPLKANQQF ¹⁷⁷	

Tabla 15. Rutherford y cols., 2000. Comparación de secuencias de aminoácidos de fibrinógeno y un péptido de la κ -caseína bovina.

La actividad antitrombótica se debe a las acciones de escisión del fibrinógeno por la enzima trombina en la coagulación de la sangre y la escisión de la κ -caseína por la enzima quimosina en la coagulación de la leche, es decir, también poseen semejanza. Tanto los procesos de la coagulación de la sangre y de la leche implican proteólisis limitada; la trombina escinde dos enlaces R-G para producir fibrina y fibrinopéptidos, mientras la quimosina escinde un único enlace F₁₀₅-M₁₀₆ para formar para- κ -caseína (f1-105) y GMP (f106-169).

Los péptidos cortos solubles (fibrinopéptidos y caseinoglicopéptidos) se liberan durante tanto en los procesos de coagulación de la sangre y la leche. Los péptidos liberados son muy variables en secuencia, sin embargo, mantienen una carga neta negativa y tampoco contiene residuos de cisteína y triptófano. Los grupos ϵ -amino de la lisina parecen estar implicados en la polimerización tanto de la fibrina como de la caseína y el calcio es importante en ambos procesos, acelera la segunda fase de la agregación de monómeros de fibrina y de la coagulación de la leche. Los grupos protésicos de carbohidratos no juegan un papel importante en los procesos de coagulación, sin embargo, retardan la velocidad de acción de la trombina y la quimosina (Rutherford y cols., 2000).

Los principales péptidos antitrombóticos de la κ -caseína son casoplatelinas derivados el extremo C-terminal (Jollés y cols., 1986), son los correspondientes a la secuencia de aminoácidos Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Glu-Asp-Lys, correspondientes a los aminoácidos 106-116. También poseen actividad los fragmentos menores 106-112, 112-116 y 113-116 (Bauhallab y cols., 1992). Los residuos Ile₁₀₈, Lys₁₁₂ y Asp₁₁₅ parecen ser importantes en el efecto inhibitor que es debido a la competencia entre los péptidos y la cadena γ por el receptor de la plaqueta (Fiat y cols., 1989). Por lo cual, presentan actividad inhibitora de la agregación de plaquetas, así como de la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano a receptores específicos de la plaqueta (Jollés y cols., 1986).

Los péptidos antitrombóticos de la lactoferrina son tetrapéptidos (KRDS), son los correspondientes a la secuencia de aminoácidos Lys-Arg-Asp-Ser, correspondientes a los aminoácidos 39-42 parecen ser importantes en el efecto inhibitor que es debido a otro mecanismo de acción, inhibe de manera dosis-dependiente, la agregación plaquetaria inducida por el difosfato de adenosina (ADP), debido a que es un inhibidor de la liberación de serotonina por un mecanismo independiente de la fosforilación de proteínas y un inhibidor de la unión del fibrinógeno (Mazoyer y cols., 1990).

La actividad antitrombótica no depende del tamaño del péptido, pero si puede influir en el mecanismo de inhibición (Ciprandi y cols., 2006).

Existen una gran evidencia de que las proteínas de la leche contienen a través de la digestión son la fuente de una serie de péptidos antitrombóticos activos. Se han observado, que varios péptidos derivados β y κ -caseína y lactoferrina han demostrado ser inhibidores de la agregación plaquetaria y para mostrar actividad antitrombótica (Rutherford y cols., 2000) [Tabla 16].

Proteína	Actividad antitrombótica	Secuencia	Posición en la cadena de la proteína
β -caseína	A= 0.029	PG	[9-10], [63,64]
		PGP	[63-65]
		GP	[64-65], [199-200], [203-204]
κ -caseína	A = 0.024	MAIPPK	[106-111]
		MAIPPKK	[106-112]
		MAIPPKKNQDK	[106-116]
		NQDK	[113-113]
Lactoferrina	A= 0.056	PG	[293-294], [493-494]
		GP	[351-352]

Tabla 16. Dziuba y cols., 2009. Perfil de actividad antitrombótica potencial de proteínas de la leche.

Actualmente, muchos de los péptidos antitrombóticos con potencial bioactivo de origen vegetal y animal, se han descubierto, hasta ahora la mayoría aislados de los productos lácteos. Candidatos de proteínas que contienen estas actividades biológicas se encuentran en la leche, huevos, así como en diferentes proteínas vegetales y frutas como el frijol, la colza, las uvas [Tabla 17].

Actividad	Origen	Condición	Método	Péptido/AAP	IC ₅₀ ^a /IA ^b /IER ^c	Referencia
Anticoagulante	Sofúl, Yakult™	Fermentación:	Inhibición de la	F5	^c 34.8 ± 14.3%	Dominguez González, 2014
	Caseína	L. casei Shirota 48h	fibrina	F6	^c 59.3 ± 15.2%	
Antiplaquetario	Granos de frijol lima	Hidrólisis:	Agregación plaquetaria	Hidrólisis 12.4%	^b 88%	Córdova Lizama, 2013
		Pepsina 10min		HPL (4.5mg/ml)		
Anticoagulante	Sofúl, Yakult™	Fermentación:	Inhibición de la	P7 (F9B)	^c 4.6 % (µg ml ⁻¹)	Rojas Ronquillo, 2012
		L. casei Shirota 36h		YQEPVLPVVRG		
Anticoagulante	Semilla de colza	Hidrólisis:	Inhibición de la	CRPs (40mg/mL)	^b ≈90%	Zhang, 2008
		Peptinasa,		fibrina		
Anticoagulante	Clara de huevo en polvo	Celulosa,	Yang et al., 2007	RP55 (50mg/mL)	^b ≈90%	
		β-Gluconasa 4h				
Anticoagulante	Clara de huevo en polvo	Alcalasa 3h	Inhibición de la	A: Hidrólisis 20%	11.04±0.21%	Yang, 2007
		Extracción acuosa: Etanol 25% y 55%		fibrina		
Antiplaquetario	Semilla y piel de la uva	Hidrólisis:	Yang et al., 2007	N: Hidrólisis 15%	19.88±0.48%	
		Alcalasa 15min		fibrina		
Antiplaquetario	Flavonoides	Extracción:	Agregación plaquetaria	GSD (100mg/L)	^b 45±3.6%	Vitseva, 2005
		DMSO		GSK (500mg/L)		
			Miyashita et al., 1999			

Tabla 17. Péptidos antitrombóticos aislados recientemente de los alimentos.

IC₅₀ = Concentración que causa el 50% de inhibición; ^bIA = Actividad de inhibición %; ^cIER = Índice de eficiencia de inhibición %; CRPs = Péptidos de colza crudo; RP 25 y 55 = Fracciones de péptidos; A: Alcalasa; N: N-proteasa; DMSO: 3 dimetil sulfóxido; GSD: Extracto de semilla de uva; GSK: Extracto de piel de la uva; HPL: Hidrolizado de *Phaseolus lunatus*.

1.3 HEMOSTASIA.

La hemostasia es el mecanismo fisiológico finamente regulado que mantiene la fluidez de la sangre, repara las lesiones vasculares y limita la pérdida de sangre de forma simultánea al evitar la oclusión de un vaso sanguíneo (trombosis) y la perfusión inadecuada de los órganos vitales (Katzung, 2013).

La secuencia general de eventos en la hemostasia en el lugar de la lesión vascular se muestra en las Figuras 3-6.

1.3.1 Vasoconstricción.

Tras la lesión endotelial inicial, hay un breve período de vasoconstricción arteriolar, atribuido a mecanismos de reflejo neurógeno y aumentado por la liberación de endotelina (un potente vasoconstrictor derivado del endotelio). Sin embargo, el efecto es transitorio y el sangrado continuaría de no ser por la activación de las plaquetas y de los sistemas de coagulación (Bick y cols., 1994) [Figura 3].

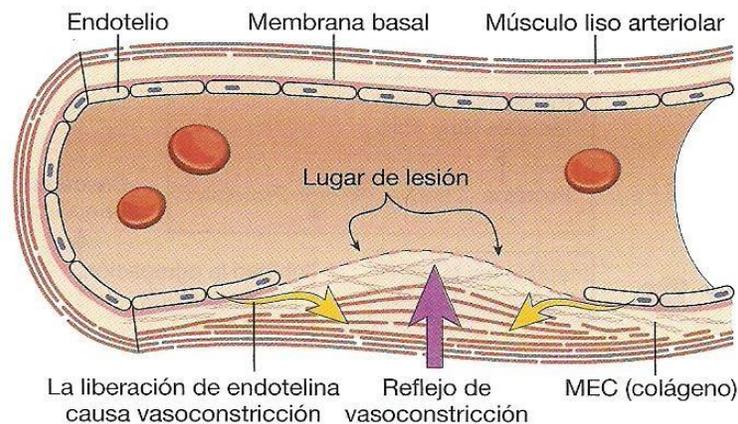


Figura 3. Representación gráfica del proceso de vasoconstricción normal. Tomado de Kumar, 2010.

1.3.2 Hemostasia primaria.

La lesión endotelial expone la matriz extracelular (MEC) endotelial trombógena, que permite a las plaquetas adherirse y quedar activadas (sufrir un cambio de forma y liberar gránulos secretores (ADP, TXA_2). En minutos, los productos secretados han reclutado plaquetas adicionales (agregación) para formar un tapón hemostático (Schrier y cols., 1999) [Figura 4].

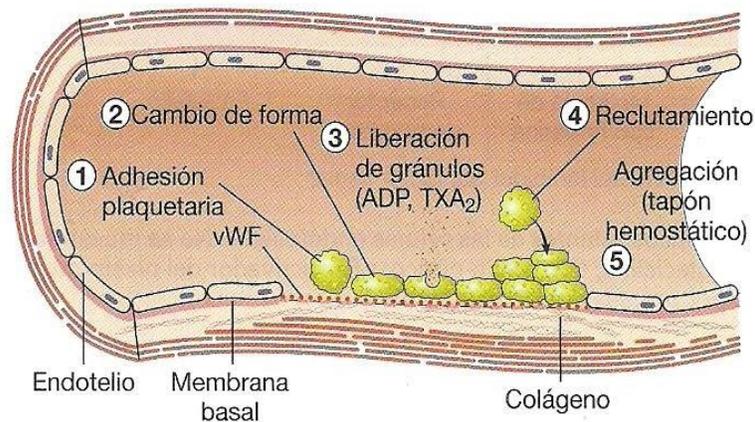


Figura 4. Representación gráfica del proceso de hemostasia primaria normal. Tomado de Kumar, 2010.

1.3.3 Hemostasia secundaria.

El factor tisular (un factor procoagulante unido a la membrana, sintetizado por el endotelio) también queda expuesto en el lugar de la lesión. Actúa en conjunción con los factores secretados por las plaquetas para activar la cascada de la coagulación, culminando con la activación de la trombina. A su vez, la trombina convierte el fibrinógeno soluble circulante en fibrina insoluble, produciendo la deposición local de fibrina. La trombina también induce el reclutamiento adicional de plaquetas y la liberación de gránulos. Esta secuencia, lleva más tiempo que el tapón plaquetario inicial (Bick y cols., 1994) [Figura 5].

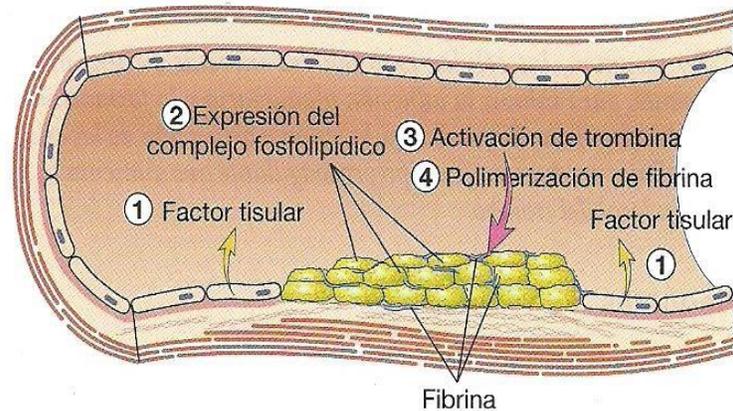


Figura 5. Representación gráfica del proceso de hemostasia secundaria normal. Tomado de Kumar 2010.

1.3.4 Trombo y acontecimientos antitrombóticos.

La fibrina polimerizada y los agregados plaquetarios forman un tapón permanente, sólido, para evitar cualquier hemorragia adicional. En esta etapa, los mecanismos contrareguladores (el factor activador de plasminógeno [t-PA] <fibrinólisis> y la trombomodulina <bloquea la cascada de la coagulación>) se ponen en movimiento para limitar el tapón hemostático en el lugar de la lesión (Schrier y cols., 1999) [Figura 6].

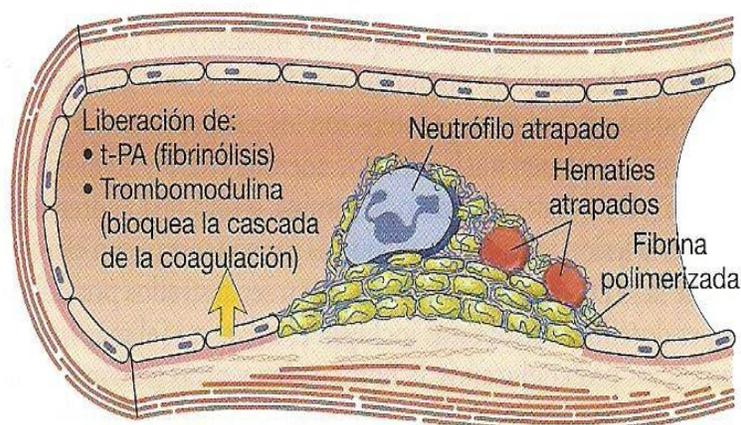


Figura 6. Representación gráfica del proceso de formación del trombo y sus acontecimientos antitrombóticos normales. Tomado de Kumar, 2010.

Tanto la hemostasia como la trombosis están reguladas por tres componentes generales: la pared vascular, las plaquetas y la cascada de la coagulación (Kumar, 2010).

1.3.5 Endotelio.

Las células endoteliales modulan diversos aspectos de la hemostasia normal. El endotelio puede quedar activado por agentes infecciosos, factores hemodinámicos, mediadores plasmáticos y por citocinas. El equilibrio entre las actividades endoteliales antitrombóticas y protrombóticas determina, de forma crítica, el que ocurra la formación del trombo, su propagación o disolución (Michiels, 2003).

1.3.5.1 Propiedades antitrombóticas.

Las células endoteliales mantienen un flujo sanguíneo líquido por las propiedades antiplaquetarias, anticoagulantes y fibrinolíticas (Martínez-Murillo, 2008) [Tabla 18].

Efecto	Molécula	Función
Antiplaquetarios	PGI ₂	□AMPc. Bloquea la activación plaquetaria. □Vasodilatador local.
	NO	□GMPc. Inhibe adhesión, agregación plaquetaria. □Vasodilatador local.
	ADPasa	Degrada ADP. Inhibe la agregación plaquetaria.
Anticoagulantes	Heparina	Cofactor de la Antitrombina III. Inactiva la Trombina y los Factores Xa, IXa.
	Trombomodulina	Se une a la Trombina para activar a la Proteína C.
	Proteína C	Escisión proteolítica de los Factores Va y VIIIa.
	Proteína S	Cofactor de la Proteína C.
Fibrinolíticos	IFA	Inactiva los Factores VIIa y Xa.
	t-PA	Elimina los depósitos de Fibrina de las superficies endoteliales.

Tabla 18. Martínez-Murillo, 2008. Moléculas antitrombóticas del endotelio vascular.

PGI₂= Prostaciclina endotelial; NO= Óxido nítrico; IFT= Inhibidor del factor tisular; t-PA= Activador del plasminógeno tisular.

1.3.5.2 Propiedades protrombóticas.

Las células endoteliales tras la lesión o activación muestran propiedades plaquetarias, procoagulantes y antifibrinolíticas (Martínez-Murillo, 2008) [Tabla 19].

Efecto	Molécula	Función
Plaquetarios	vWF	Cofactor para la unión de las Plaquetas al Colágeno.
Procoagulantes	Endotoxina bacteriana TNF, IL-1	Induce la síntesis del Factor tisular (activa la vía extrínseca de la cascada de la coagulación).
Antifibrinolíticos	IAP	Disminuye la capacidad fibrinolítica.

Tabla 19. Martínez-Murillo, 2008. Moléculas protrombóticas del endotelio vascular. vWF= Factor de *von Willebrand*; TNF= Factor de necrosis tumoral; IL-1= Interleucina 1; IAP= Inhibidor del activador de plasminógeno tisular.

Las células endoteliales intactas sirven principalmente para inhibir la adhesión plaquetaria y la formación del coágulo sanguíneo. Sin embargo, la lesión o activación de las células endoteliales produce un fenotipo procoagulante que aumenta la formación local de trombo (Kumar, 2010) [Figura 7].

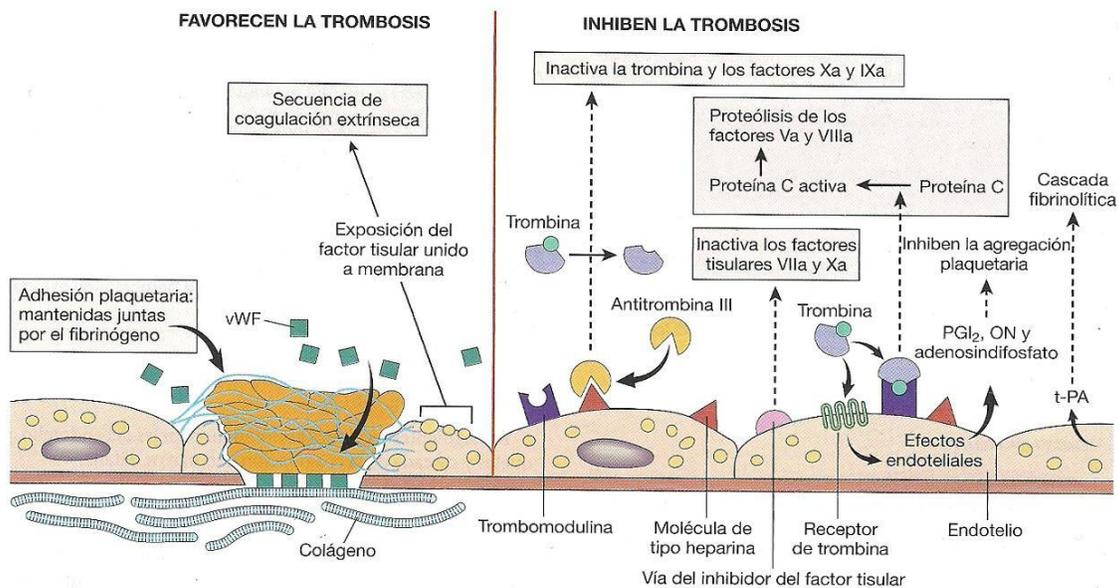


Figura 7. Ilustración esquemática de las actividades procoagulantes y anticoagulantes de las células endoteliales. Tomado de Kumar, 2010.

1.3.6 Plaquetas.

Las plaquetas desempeñan diversos aspectos de la hemostasia normal. Tras la lesión vascular, las plaquetas se encuentran con elementos de la matriz extracelular (MEC); estos incluyen el colágeno, los proteoglucanos, la fibronectina y glucoproteínas adhesivas. Al contacto con la MEC, las plaquetas sufren tres reacciones generales:

1.3.6.1 Adhesión.

La adhesión plaquetaria a la matriz extracelular esta mediada por interacciones con el vWF, que actúa como un puente entre los receptores de la superficie plaquetaria (glucoproteína Ib-Factores V y IX) y con el colágeno expuesto (Heemskerk y cols., 2002) [Figura 8].

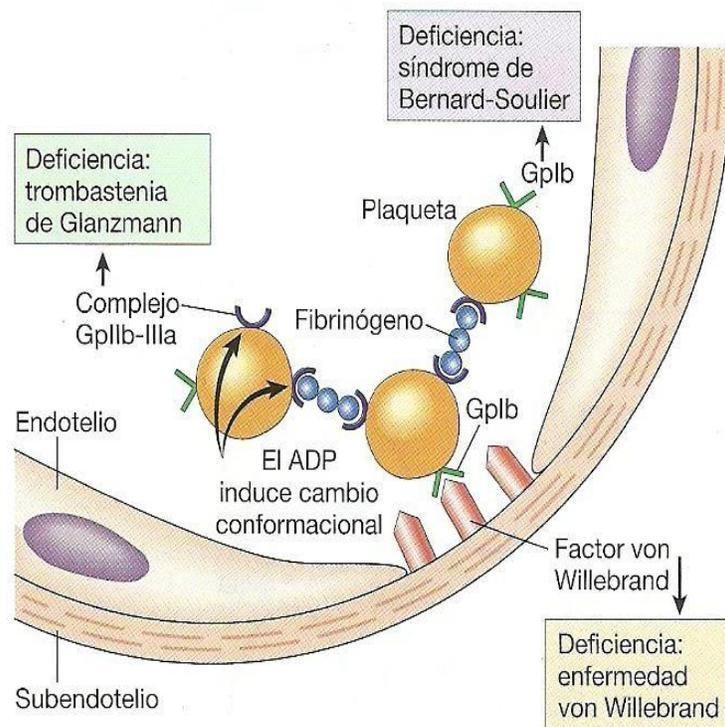


Figura 8. Ilustración esquemática de la adhesión y agregación plaquetaria. Tomado de Kumar, 2010.

1.3.6.2 Secreción.

La secreción de los contenidos de los gránulos se inicia con la unión de los agonistas de los receptores de la superficie plaquetaria seguido de una cascada de fosforilación de las proteínas intracelulares. La liberación de los contenidos de los gránulos δ , puesto que se necesita calcio en la cascada de la coagulación y ADP en la agregación plaquetaria. Finalmente, la activación plaquetaria conlleva la expresión en la superficie de los complejos fosfolipídicos que proporcionan los lugares de unión para el calcio y los factores de la coagulación en la vía intrínseca (Martínez-Murillo y cols., 2001) [Tabla 20].

Gránulos α	Gránulos δ	Lisosomas
PAF	ATP	β -Glucuronidasa
FvW	ADP	Fosfatasa ácida
IAP-1	Calcio	Catepsina
PDGF	Serotonina	
CAPM		
TGF- β		
CTAP-III		
Gp IIb/IIIa		
PDECGF		
Proteína S		
P-Selectina		
Inhibidor C1		
Fibrinógeno		
Fibronectina		
Vibronectina		
FV, FXI FXIII		
Trombospondina		
β -Tromboglobulina		
Factor plaquetario 4		

Tabla 20. Martínez-Murillo y Quintana-González, 2001. Productos liberados por plaquetas.

PAF = Factor activador de plaquetas; FvW = Factor de von Willebrand; IAP-1 = Inhibidor del activador de plasminógeno tisular 1; PDGF = Factor de crecimiento derivado de plaquetas; CAPM = Cininógeno de alto peso molecular; TGF- β = Factor de crecimiento transformante beta; CTAP-III = Péptido activador de tejido conectivo III; PDECGF = Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas.

1.3.6.3 Agregación.

Además, el tromboxano A_2 , secretado por las plaquetas, es un estímulo para la agregación plaquetaria. El ADP y el TxA_2 establecen una reacción catalítica que conlleva la formación del tapón hemostático primario, que es reversible, pero con la activación de la cascada de la coagulación se genera trombina (se une al receptor de la superficie plaquetaria o PAR), junto con el ADP y el TxA_2 , produce una agregación adicional [Tabla 21]. Al mismo tiempo la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina, el fibrinógeno no degradado también es un cofactor en la agregación plaquetaria. La activación de las plaquetas por el ADP induce un cambio conformacional de los receptores GpIIb-IIIa de la superficie plaquetaria para que puedan unir fibrinógeno, de esta forma, actúa conectando múltiples plaquetas para formar grandes agregados (Martínez-Murillo y cols., 2001) [Figura 8].

Agonista*	Receptor
Trombina	Gp V
Tromboxano A_2	Receptor TxA_2
Epinefrina	Receptor α_2 -Adrenérgico
PAF	Receptor PAF
Vasopresina	Receptor V1
ADP	Gp IIb/IIIa
Colágena	Gp Ia/IIa, IV

Tabla 21. Martínez-Murillo y Quintana-González, 2001. Agonistas plaquetarios.

*Sustancias que permiten la activación interna a las plaquetas.

1.3.7 Cascada de la coagulación.

La cascada de la coagulación es una serie de conversiones enzimáticas, que vuelven proenzimas inactivas en enzimas activas y en la formación de la trombina. Posteriormente, la trombina convierte la proteína plasmática soluble (fibrinógeno) en la proteína fibrosa insoluble (fibrina) (Martínez-Murillo, 2006) [Tabla 22].

Factor	Sinónimo	Vida media (h)	Concentración plasmática (µg/mL)	Cromosoma
FI	Fibrinógeno	72-120	2000-4000	4
FII	Protrombina	60-70	100-150	11
FV	Proacelerina, Factor lábil	12-16	5-10	1
FVI	No asignado	----	----	----
FVII	Proconvertina, Autoprotrombina I	3-6	0-5	13
FVIII	Factor antihemofílico A, Globulina antihemofílica	8-12	0-1	X
FIX	Factor de Christmas, Componente trombolastínico del plasma, Autoprotrombina II, Factor antihemofílico B	18-24	4-5	X
FX	Factor de Stuart-Prower, Trombocinasa, Autoprotrombina III	30-40	8-10	13
FXI	Antecedente trombolastínico del plasma	52	5	4
FXII	Factor de Hageman	60	30	5
FXIII	Factor estabilizante de la fibrina, Protransglutamidasa, Fibrinasa, Fibrinolisasa	4-8	10	1 y 6
FT	Factor tisular	----	----	----
Precalicroína	Factor de Fletcher	35	30-50	4
CAPM	Factor de Fitzgerald-Williams-Flaujeauc	150	70-90	3

Tabla 22. Martínez-Murillo, 2006. Características generales de los factores de la coagulación.

CAPM = Cininógeno de alto peso molecular

Cada reacción de la vía proviene del ensamblaje de un complejo compuesto por: un sustrato (proenzima del factor de coagulación), un cofactor (acelerador de la reacción), una enzima (factor de la coagulación activado), estos componentes se ensamblan en un complejo fosfolipídico y quedan unidos por iones calcio. Por lo tanto, la formación del coagulo tiende a permanecer localizada en los lugares donde pueda ocurrir tal ensamblaje (sobre la superficie de la plaqueta o el endotelio activado) (Kumar, 2010) [Figura 9].

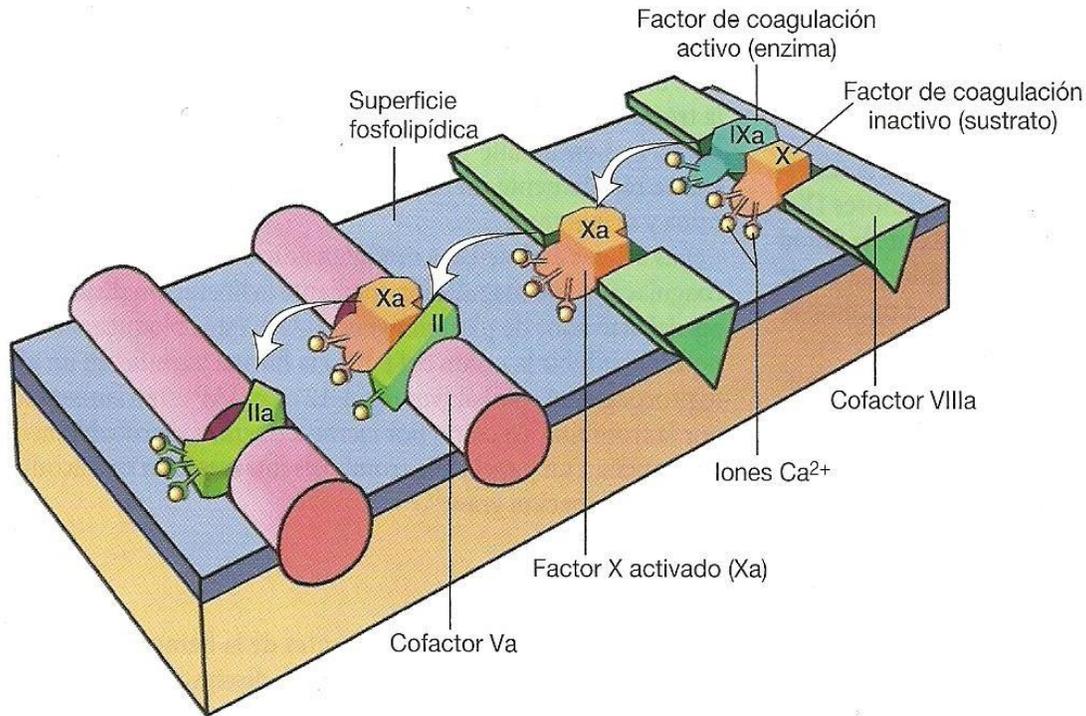


Figura 9. Ilustración esquemática del complejo de reacción inicial. Tomado de Kumar, 2010.

El modelo de la cascada de la coagulación se ha dividido en las vías intrínseca e extrínseca, convergiendo en la vía común donde se activa el factor X.

1.3.7.1 Vía intrínseca.

Puede iniciarse *in vitro* mediante la activación del Factor de Hageman (FXII). Es decir, inicia la coagulación, con el daño vascular y la interacción de superficies cargadas negativamente con tres proteínas plasmáticas: Factor de Hageman (FXII), Precalicroína (PK) y Cininógeno de alto peso molecular (CAPM) (Hoffman y cols., 2001) [Figura 10].

1.3.7.2 Vía extrínseca.

Puede iniciarse *in vitro* mediante la activación del Factor tisular (FT). En decir inicia la coagulación, con una lipoproteína celular expuesta en los de lesión tisular con dos proteínas plasmáticas, el ultimo de origen extrínseco a la circulación sanguínea: Proconvertina (FVII) y Factor tisular (FT) (Hoffman y cols., 2001) [Figura 10].

1.3.7.3 Vía común.

Ambas vías de la cascada de la coagulación podrían activar al Factor X (FX), que junto al con el Factor V (FV) activa a la Protrombina (FII) en Trombina (FIIa) y subsecuentemente la formación de un coagulo de fibrina. Esto se sigue de la agregación plaquetaria, que crea una masa fusionada irreversible de plaquetas constituyendo el tapón hemostático secundario definitivo (Hoffman y cols., 2001) [Figura 10].

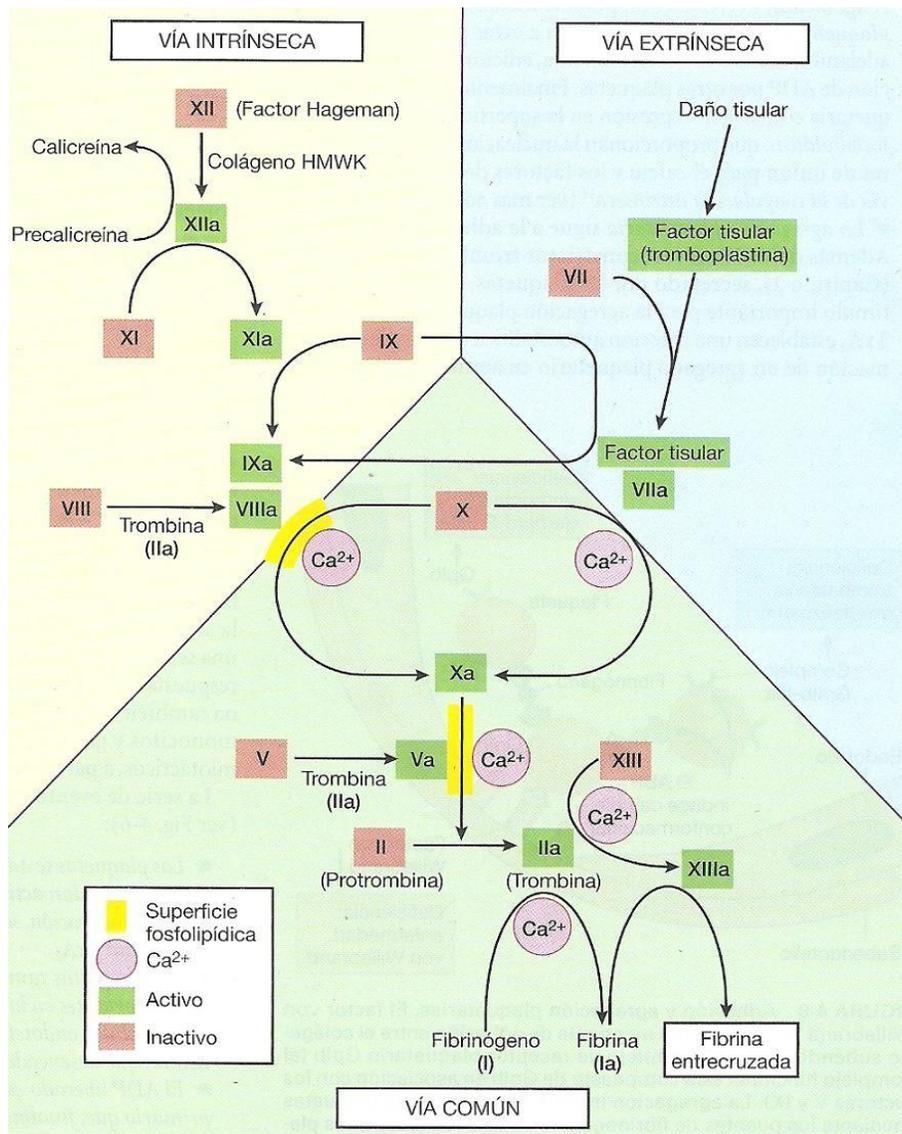


Figura 10. Cascada de la coagulación. Tomado de Kumar, 2010.

Una vez activada la cascada de la coagulación debe quedar restringida al sitio local de la lesión vascular para evitar la formación de coagulo en todo el trayecto vascular. Además de la activación del factor de restricción en los lugares de fosfolípidos expuestos, la acción del coagulo también está regulada por anticoagulantes naturales (Martínez-Murillo, 2008) [Tabla 23].

Efecto	Molécula	Función
Anticoagulante	Antitrombina III	Activación por la Heparina. Inhibe a la Trombina y a los FIXa, Xa, XIa y XIIa
Anticoagulante	Proteínas C y S	Activación por la Trombomodulina. Inactiva a los FVa y VIIIa
Anticoagulante	IFT	Forma un complejo con FXa y con el FT-FVIIa y los inactiva

Tabla 23. Martínez-Murillo, 2008. Moléculas antitrombóticas de la cascada de la coagulación.

IFT= Inhibidor del factor tisular; FT = Factor tisular.

1.3.8 Cascada fibrinolítica.

La cascada fibrinolítica es una serie de zimógenos, enzimas activas y sus inhibidores. Normalmente se encuentra en reposo. Se activa y regula para disolver la fibrina circulante sin lizar el coagulo verdadero depende de la producción y liberación endotelial del Activador tisular de plasminógeno (t-PA), Inhibidor del activador de plasminógeno (IAP), de la depuración del t-PA, de la activación del Plasminógeno y de la inhibición de la activación y efecto de la Plasmina (García-Chávez, 2007).

La activación de la fibrinólisis ocurre sobre la membrana celular en donde la plasmina queda protegida de la inactivación. La plasmina deriva de la degradación enzimática de su precursor inactivo plasminógeno (vía dependiente del FXII) o por dos tipos distintos de activadores de plasminógeno. El primero es el Activador de plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA), capaz de activar al plasminógeno en la fase líquida. A su vez, la plasmina convierte el precursor inactivo Pro-urocinasa en la molécula activa u-PA. El segundo y fisiológicamente más activo (cuando se une a fibrina), es el Activador de pasminógeno de tipo tisular (t-PA). La afinidad por la fibrina hace del t-PA un reactivo que vaya dirigido contra la actividad enzimática fibrinolítica de los lugares de formación reciente del coágulo (Lijnen y cols., 1997).

El plasminógeno también puede activarse por el producto bacteriano Estreptocinasa, que puede tener alguna significación en ciertas infecciones bacterianas. Por otra parte, los productos de degradación de la fibrina (PDF) resultantes pueden actuar como anticoagulantes débiles. Además, cuando la plasmina se encuentra libre forma rápidamente un complejo con el inhibidor de la α_2 -plasmina y se inactiva (Lijnen y cols., 1997).

Las células endoteliales modulan adicionalmente el equilibrio coagulación-anticoagulación mediante la liberación de inhibidores del activador de plasminógeno (IAP), estos bloquean la fibrinólisis al inhibir la unión del t-PA a la fibrina y confieren un efecto procoagulante global (Kumar, 2010) [Figura 11].

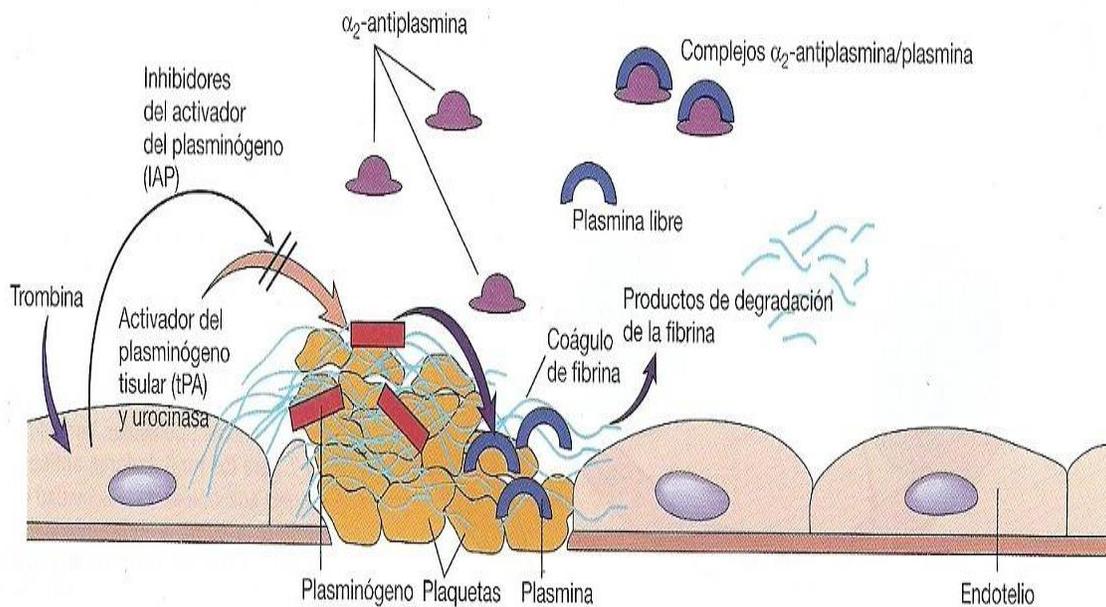


Figura 11. Cascada fibrinolítica (activadores e inhibidores del plasminógeno. Tomado de Kumar, 2010.

1.4 TROMBOSIS.

La trombosis significa que existe la oclusión de un vaso sanguíneo por la presencia de un coágulo o trombo y esto afecta la circulación sanguínea, este puede ser en terreno arterial (trombosis arterial) y/o en terreno venoso (trombosis venosa) (Martínez-Murillo, 2008).

Un coágulo y un trombo se forman exactamente de la misma manera; sin embargo, la formación del coágulo es una respuesta homeostática normal (evita la muerte del individuo por hemorragia), mientras que la formación de un trombo es una respuesta patológica anormal (causa la muerte del individuo por obstrucción).

Inmediatamente después de una lesión vascular, el coágulo se forma sin ocluir el vaso, ni extenderse a lo largo de su lumen. Además, ocurre, se mantiene en el sitio y tiempo necesario para ser luego reemplazado por tejido conectivo. Así, su inicio, crecimiento y mantenimiento están finalmente regulados en el tiempo y en el espacio. Visto de esta manera, el trombo es un coágulo que se formó en el tiempo y en el espacio equivocado, que puede alojarse en venas, arterias, capilares o las mismas cavidades cardiacas (García-Chávez, 2007).

Además, alguna parte del trombo o todo, puede desprenderse para crear un émbolo que viaja por el torrente sanguíneo para quedar alojado en un sitio distante. En consecuencia, la trombosis y la embolia están estrechamente relacionadas, por el término de tromboembolia (Kumar, 2010). La complicación potencial de trombosis y embolia, provoca que las células y tejidos irrigados por ese vaso sanguíneo sufran isquemia. Si la isquemia se prolonga se produce una lesión celular irreversible (necrosis) la cual puede afectar a cualquier órgano (infarto) (García-Chávez, 2007).

La enfermedad trombótica, incluyendo la trombosis coronaria, la trombosis intracraneal, trombosis venosa profunda, la embolia intracraneal y la embolia pulmonar, pone en peligro la vida humana, en gran medida (Xiong y cols., 2009).

1.4.1 Epidemiología.

La trombosis en todas sus manifestaciones clínicas representa la principal causa de muerte en el mundo entero. Dos de las primeras cuatro causas de muerte en el mundo, el infarto agudo al miocardio y la enfermedad vascular cerebral isquémica, tienen un fondo trombótico en el 90% y 66% de los casos, respectivamente. Este patrón se repite exactamente en México (Majluf-Cruz, 2003) [Tabla 24].

Orden	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
1	Diabetes mellitus	49,855	49.36	11.3
2	Enfermedad isquémica del corazón	45,421	44.97	10.3
3	Cirrosis/Enfermedades crónicas hepáticas	25,704	25.45	5.8
4	Enfermedad cerebrovascular	25,627	25.40	5.8
5	Afecciones originadas en el período perinatal	18,192	18.01	4.1
6	Enfermedad pulmonar obstructiva pulmonar	15,994	15.79	3.6
7	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	13,761	13.63	3.1
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	13,101	12.97	3.0
9	Nefritis y Nefrosis	10,477	10.37	2.4
10	Enfermedad hipertensivas	10,170	10.07	2.3
11	Agresiones (homicidios)	10,165	10.06	2.3
12	Desnutrición calórico-proteica	8,615	8.53	2.0
13	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	6,404	6.34	1.5
14	Tumor maligno del estómago	4,986	4.94	1.1
15	Enfermedades infecciosas intestinales	4,897	4.85	1.1
16	Tumor maligno del cuello del útero	4,501	4.46	1.0
17	VIH/SIDA	4,317	4.27	1.0
18	Uso del alcohol	4,216	4.17	1.0
19	Tumor maligno del hígado	4,203	4.16	1.0
20	Tumor maligno de la próstata	4,015	3.98	0.9
	Causas mal definidas	9,195	9.10	2.1
	Las demás	147,208	145.75	33.4
Total	441,004	430,547	436.63	100.0

Tabla 24. Majluf-Cruz, 2003. Principales causas de mortalidad general, 2001.

Datos nacionales.

^{1/}Tasa por 100,000 habitantes

En relación con la trombosis venosa, en especial la enfermedad tromboembólica venosa (incluye a la trombosis venosa profunda y a la tromboembolia pulmonar), sabemos que su prevalencia, incrementa de 1/100,000 habitantes desde la niñez hasta 1/100 habitantes en la vejez (Rosendaal, 1997).

Más aún, si consideramos que en nuestro país casi 10% de la población es diabética y que las complicaciones terminales más importantes de esta enfermedad tienen que ver con un fenómeno microtrombótico y macrotrombótico, tendremos más evidencia aún del gran impacto de la trombosis en nuestro país (Majluf-Cruz, 2003).

La trombosis arterial aguda es la causa próxima de la mayoría de los casos de infarto agudo al miocardio (ataque al corazón) y alrededor del 80% de los accidentes cerebrovasculares, en conjunto, la causa más común de muerte en el mundo desarrollado. El tromboembolismo venoso es la tercera causa de muerte cardiovascular asociados (Xiong y cols., 2009).

1.4.2 Fisiopatología.

Virchow refirió que existían particularmente tres alteraciones que predisponían a la trombosis venosa: lesión vascular, estasis venosa y estados de hipercoagulabilidad. Desde entonces se le conoce como “**Triada de Virchow**” y sigue siendo vigente al momento actual, puesto que explica la mayoría de los mecanismos que predisponen al paciente a trombosis (Martínez-Murillo, 2008) [Figura 12].

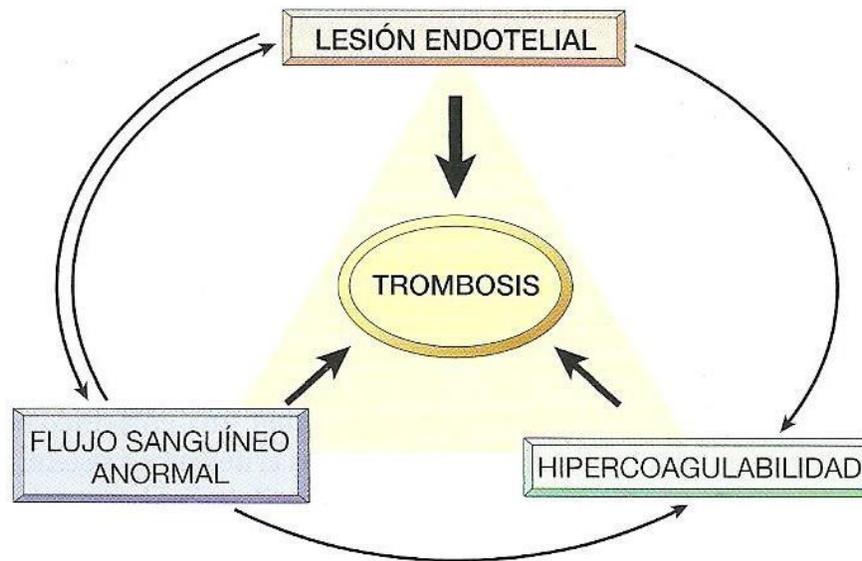


Figura 12. Tríada de Virchow en la trombosis. Tomado de Kumar, 2010.

1.4.2.1 Lesión vascular.

La lesión endotelial es un factor dominante en el desarrollo de la trombosis, la pérdida física del endotelio conduce a la exposición de la matriz extracelular subendotelial, la adhesión de plaquetas, la liberación de factor tisular y la depleción de PGI_2 y de t-PA. Por lo tanto, el endotelio disfuncional puede elaborar mayores cantidades de factores procoagulantes (moléculas de adhesión plaquetaria, factor tisular, IAP) o puede sintetizar menores cantidades de factores anticoagulantes (trombomodulina, PGI_2 , t-PA).

La lesión endotelial significativa puede ocurrir debidos a fuerzas hemodinámicas de hipertensión, flujo turbulento o endotoxinas bacterianas. Incluso la homocistinuria, hipercolesterolemia, radiación, humo del tabaco pueden iniciar la lesión endotelial. Es decir, cualquier perturbación en el equilibrio dinámico de los efectos protrombóticos y antitrombóticos del endotelio puede influir en los eventos locales de formación del trombo (Pearson y cols., 1997).

1.4.2.2 Estasis venosa.

La estasis venosa es un factor principal en el desarrollo de la trombosis. El flujo sanguíneo normal es laminar de tal manera que las plaquetas fluyen en el centro de la luz del vaso, separadas del endotelio por una zona de plasma clara que se mueve más lentamente.

Por lo tanto, la estasis y la turbulencia: alteran el flujo laminar y acercan las plaquetas al contacto con el endotelio; evitando la dilución de los factores de la coagulación activados por la sangre circulante; retrasando el afluencia de inhibidores de factores de la coagulación y permiten la formación de trombo (Wootton y cols., 1999).

1.4.2.3 Hipercoagulabilidad.

La hipercoagulabilidad contribuye menos frecuentemente, pero, es un factor importante en el desarrollo de la trombosis. Donde la cascada de la coagulación está alterada. En estos casos se produce un aumento del fibrinógeno, de los factores de la coagulación (VII, VIII, IX, X) y con deficiencia en los inhibidores de la coagulación (proteína C y S, anti-trombina), favoreciendo los procesos trombóticos (Martínez-Murillo, 2005).

1.4.3 Etiología.

La causa de la tendencia a sufrir una trombosis, fenómeno también llamado trombofilia (es toda situación en la que está latente la posibilidad de que se formen trombos arteriales o venosos) (Martínez-Murillo y cols., 2000). Puede considerarse un estado del sistema de coagulación en el que la hemostasia no está activa, pero en el cual la resistencia a la trombosis está disminuida (Majluf-Cruz, 2007).

Los estados trombofílicos pueden ser hereditarios (la mutación Leiden del factor V, la mutación G20210A de la protrombina, la mutación metilentetrahidrofolato reductasa responsable de la hiperhomocisteinemia); adquiridos (cirugía, embarazo, ingesta de anticonceptivos orales).

Pueden ser propios del sistema de coagulación (trombofilia primaria: el incremento en la concentración del factor VIII o la deficiencia de antitrombina), o bien, pueden ser parte de una enfermedad de otro sistema (trombofilia secundaria: síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, cáncer).

Finalmente, ocurren estados trombofílicos agudos (traumatismos, coagulación intravascular diseminada, quimioterapia), o estados trombofílicos crónicos (asociados con cáncer, aterosclerosis) (Majluf-Cruz, 2007) [Tabla 25].

Fisiopatogenia	Etiología	
	Hereditarios	Adquiridos
Lesión vascular	Hiperhomocisteinemia	Hiperhomocisteinemia Aterosclerosis, Vasculitis Materiales protésicos endovasculares
Estasis venosa		Fibrilación auricular Inmovilización, Cirugía Insuficiencia cardiaca congestiva
Hipercoagulabilidad	Déficit de t-PA	---Plaquetaria---
	Disfibrinogenemia	Síndrome antifosfolípido
	Déficit de proteína C	Síndromes mieloproliferativos
	Déficit de proteína S	Hemoglobinuria paroxística nocturna
	Hiperactividad de IAP ₁	Púrpura trombótica trombocitopénica
	Déficit de plasminógeno	Trombocitopenia inducida por heparina
	Mutación del gen del FII	---Humoral---
	Déficit de antitrombina III	Síndrome nefrótico
	Resistencia a la proteína C	Enfermedades inflamatorias intestinales
		Infusión de concentrados protrombóticos
	Cáncer, Coagulación intravascular diseminada	
	Anticonceptivos orales, Estrógenos, Embarazo	
	---□Viscosidad sanguínea---	
	Paraproteínemias	
	Policitemia, Drepanocitosis, Hiperleucocitos	

Tabla 25. Argente y Álvarez, 2013. Causas de trombofilia.

1.4.4 Factores de riesgo.

Los factores predisponentes al desarrollo de trombosis son aquellos que están relacionados con su etiopatogenia (Martínez-Murillo, 2005).

En toda trombosis, las trombofilias hereditarias y adquiridas interactúan permanente y dinámicamente en cada individuo. Por esto, en cada paciente debe individualizarse su factor de riesgo trombótico de acuerdo con todos los factores predisponentes que participan en la posibilidad de desarrollar trombosis, con la intención de establecer la trombo profilaxis pertinente a cada riesgo individual (Majluf-Cruz, 2007) [Tabla 26].

Trombofilia hereditaria	Trombofilia adquirida (>45 años)
Deficiencia de proteína S	Cáncer
Deficiencia de proteína C	Obesidad, Aterosclerosis
Deficiencia del factor XII	Embarazo y puerperio
Deficiencia de antitrombina	Empleo de hormonales
Deficiencia de plasminógeno	Insuficiencia cardiaca, Insuficiencia respiratoria, Ventilación mecánica
Deficiencia del inhibidor de la vía del factor tisular	Cirugía, Traumatismo en miembros pélvicos
Resistencia a la proteína C y factor V Leiden	Inmovilización prolongada
Mutación de metilentetrahidrofolato reductasa	Dispositivos intravasculares
Mutación 20210 del gen de la protrombina	Anticoagulante lúpico
Elevación de la glicoproteína rica en histidina	Aumento de los factores II, VII, VIII, fibrinógeno y factor de Von Willebrand

Tabla 26. Martínez-Murillo, 2005. Factores de riesgo que predisponen al desarrollo de trombosis.

1.4.5 Manifestaciones Clínicas.

Los trombos son significativos porque causan obstrucción de las arterias y venas, son posibles fuentes de émbolos. La significación de cada uno depende de donde ocurra el trombo.

Así mientras, los trombos venosos pueden producir congestión y edema en los lechos vasculares distales a una obstrucción y embolizar a los pulmones, produciendo la muerte. Al contrario, los trombos arteriales pueden producir infarto de miocardio en los lechos vasculares en lugares críticos a una obstrucción y pueden embolizar, produciendo la muerte (Kumar, 2010).

Por último, cuando se producen el desprendimiento y migración de un trombo venoso, éste suele alojarse en una rama arterial pulmonar y ocluirla, pueden producir tromboembolismo pulmonar (TEP), cuando su magnitud es suficiente como para reducir la perfusión y generar síntomas se manifiesta por: dolor torácico o pleurítico (65%), hemoptisis, disnea (22%), shock o pérdida de conocimiento (8%) (Argente y Álvarez, 2013).

Cuando el vaso ocluido es una arteria sistémica, se originan distintos signos y síntomas y dependen del órgano afectado, que se describen en el Tabla 27 (Argente y Álvarez, 2013).

Órgano o Sistema	Signos, Síntomas, Síndromes
Aparato locomotor	Dolor, Palidez, Parálisis, Parestesias, Hipoestesis, Ausencia de pulsos
Corazón	Angina de pecho, Infarto agudo al miocardio
SNC	Déficit neurológico motor, sensorial o cognitivo de instalación aguda.

Tabla 27. Argente y Álvarez, 2013. Síndromes por oclusión arterial sistémica aguda.

SNC = Sistema nervioso central.

Cuando el vaso ocluido es una vena sistémica, se originan distintos signos y síntomas y que dependen del órgano afectado, que se describen en el Tabla 28 (Argente y Álvarez, 2013).

Órgano o Sistema	Signos, Síntomas, Síndromes
Aparato locomotor	Dolor, Edema, Cianosis o Eritema
Vena porta	Ascitis, Dolor abdominal, Hipertensión portal, Hemorragia digestiva
Intestino	Dolor abdominal, Melena o Enterorragia
Hígado	Síndrome de Budd-Chiari: Hepatomegalia dolorosa, Ascitis marcada
SNC	Accidente cerebrovascular (convulsiones, , hemorragias) Hipertensión endocraneana (cefalea, vómitos, edema de papila) Síndrome del seno cavernoso (oftalmoplejía, dolor ocular, exoftalmos, edema conjuntival)

Tabla 28. Argente y Álvarez, 2013. Síndromes por oclusión venosa sistémica aguda.

SNC = Sistema nervioso central.

1.4.6 Diagnóstico.

Las pruebas de hemostasia y trombosis permiten orientar y fundamentar el diagnóstico clínico de las enfermedades tromboembólicas y determinar el origen hereditario o adquirido (Martínez-Murrillo y Quintana-González, 2001). Por lo cual, nos permite tener un panorama general acerca de la condición del paciente, como se describe en el Tabla 29.

Prueba	Valor	Estado
Hemoglobina	H=16±2	Normal
g/dL	M=14±2	
Hematócrito	H=47±5	Normal
mL/dL	M=42±5	
CMH	29±2	Normal
Pg		
VCM	90±7	Normal
fL		
Leucocitos	4.5-11.0	Normal
10 ³ /mm ³		
Plaquetas	150-400	Normal
10 ³ /mm ³		
Frotis sanguíneo	Blastocitos	Normal
TS	2-7	Normal
minutos		
TP	11-15	Normal
segundos		
TTPa	20-36	Normal
segundos		
TT	9-13	Normal
segundos		

Tabla 29. Martínez-Murillo, 2008. La hemostasia en la normalidad.

TS= Tiempo de sangrado; TP= Tiempo de protrombina; TTPa= Tiempo de tromboplastina parcial activada; TT= Tiempo de trombina; H= Hombre; M= Mujer.

1.4.7 Fármacos antitrombóticos.

Los agentes antitrombóticos son la base del tratamiento farmacológico para el síndrome coronario agudo (Wu y Matijevic-Aleksic, 2005). En términos generales, la trombosis arterial se trata con fármacos dirigidos a plaquetas y la trombosis venosa se trata con fármacos dirigidos a proteínas de la cascada de la coagulación (Mackman, 2008).

Mecánicamente, la función de los agentes antitrombóticos es o bien para evitar la formación de trombos en los vasos sanguíneos o disolver los ya existentes y restaurar el flujo sanguíneo (Raghavan y Dikshit, 2002).

Los agentes antitrombóticos disponibles en la actualidad se pueden clasificar en anticoagulantes, antiplaquetarios y fibrinolíticos:

1.4.7.1 Anticoagulantes.

Los anticoagulantes trabajan ya sea por la modulación de los niveles endógenos de trombina, la enzima clave de la coagulación o mediante la inactivación de la actividad enzimática (Weitz y Crowther, 2003) [Tabla 30].

1.4.7.2 Antiplaquetarios.

Los agentes antiplaquetarios inhiben la activación y agregación plaquetaria, un proceso clave de la hemostasia y la formación de trombos (Goto, 2004) [Tabla 30].

1.4.7.3 Fibrinolíticos.

Los agentes fibrinolíticos, son administrados en una emergencia clínica, el trabajo de la lisis de los coágulos existentes y restaurar el flujo sanguíneo en los vasos ocluidos (Lijnen y Collen, 1995) [Tabla 30].

Ejemplo	Mecanismo de acción	Estatus	Formulación
Agentes anticoagulantes: Inhibidores indirectos de la trombina			
Warfarina	Antagonista de la vitamina K	Lanzamiento	VO
Heparina, Danaparoid, Dalteparina, Tinzaparina, Enoxaparina, Fondaparinux	Cofactor de la antitrombina	Lanzamiento	IV o SC
Rivaroxaban, Apixaban	Inhibidores del Factor Xa	Ensayo clínico	VO
Agentes anticoagulantes: Inhibidores directos de la trombina			
Lepirudina, Bivalirudina, Argatrobán	Inhíbe la actividad enzimática de la trombina	Lanzamiento	IV
Ximelagatrán		Retirado	VO
Etexilato de Dabigatrán		Ensayo clínico	VO
Agentes antiplaquetarios			
Aspirina	Inhibición de la COX-1 (inhíbe síntesis de TXA2)	Lanzamiento	VO
Abciximab, Eptifibatida, Tirofiban	Antagonista de los receptores GP IIb/IIIa	Lanzamiento	IV
Clopidogrel, Ticlopidina	Antagonista del receptor P2Y ₁₂ (ADP)	Lanzamiento	VO
Dipiridamol	Inhibidor de la PDE	Lanzamiento	VO
Derivados de la Himbacine, Bicíclicos de Guanidina	Antagonista del receptor de trombina	Ensayo clínico	VO
Agentes fibrinolíticos			
Estreptoquinasa	Promueve la actividad de la plasmina	Lanzamiento	IV
Alteplasa		Lanzamiento	IV
Tenecteplasa		Lanzamiento	IV
Estafilicinas		Descubrimiento	IV

Tabla 30. Chackalamannil, 2006. Clasificación de los principales agentes antitrombóticos.

VO = vía oral, IV= vía intravenosa, SC, vía subcutánea.

Fármaco	Reacciones adversas	Riesgo en el embarazo
Agentes anticoagulantes: Inhibidores indirectos de la trombina		
Warfarina	Agranulocitosis, Hemorragia, Hepatotóxico, Leucopenia, Nefrotóxico.	D
Heparina, Danaparoid, Dalteparina, Tinzaparina, Enoxaparina, Fondaparinux	Hemorragia interna o extensa por dosis excesivas, Trombocitopenia.	C
Rivaroxaban, Apixaban	Anemia, Hemorragia digestiva e intracraneal, Trombocitopenia.	C
Agentes anticoagulantes: Inhibidores directos de la trombina		
Lepirudina, Bivalirudina, Algotrobán	Equimosis, Hematoma, Hemorragia mayor y menor.	C
Ximelagatrán	Hemorragia, Hepatotóxico.	----
Etexilato de Dabigatrán	Anemia, Epistaxis, Hemorragia mayor.	C
Agentes antiplaquetarios		
Aspirina	Equimosis, Hemorragia gastrointestinal, Hepatotóxico, Trombocitopenia, Nefrotóxico.	C
Abciximab, Eptifibatida, Tirofiban	Hemorragia, Trombocitopenia.	C
Clopidogrel, Ticlopidina	Agranulocitosis letal, Anemia aplásica, Leucopenia, Neutropenia grave, Trombopenia.	B
Dipiridamol	Exacerba la angina de pecho, Sangrado.	C
Derivados de la Himbacine, Bicíclicos de Guanidina	Hemorragia.	----
Agentes fibrinolíticos		
Estreptoquinasa	Arritmias por reperfusión, Hemorragia.	C
Alteplasa	Arritmias, Embolización, Hemorragia.	C
Tenecteplasa	Arritmias cardiacas, Embolización trombótica, Hemorragia superficial o interna,	C
Estafilicinasas	Hemorragia potencialmente mortal	----

Tabla 31. Brunton, 2012. Efectos adversos de los principales agentes antitrombóticos.

A = estudios en mujeres no evidencian riesgo para el feto; B = estudios en animales no indican riesgo para el feto pero si indican un efecto adverso para el feto; C = estudios en animales indican efectos teratogénicos o embriocidas; D = estudios en mujeres evidencian riesgo para el feto, el beneficio es mayor que el riesgo; X = estudios en animales o en humanos evidencian riesgo para el feto, el riesgo es mayor que el beneficio.

2.0 JUSTIFICACION.

La trombosis ha tenido un notable incremento como causa de morbilidad-mortalidad en el mundo moderno, esto por el desarrollo que han tenido algunas sociedades en adquirir factores de riesgo que se consideran condiciones de la vida moderna.

En México también presenta graves problemas de salud que involucran cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares (infarto agudo al miocardio, angina de pecho) es decir, también presentamos “Enfermedades de las sociedades desarrolladas”. Esto significa que el problema trombótico está afectando a todo el mundo. Además, hay que considerar que las trombosis coronarias no son el único problema conocido, también existen las trombosis cerebrales, trombosis venosas, que son capaces de ocasionar tromboembolismo pulmonar ocasionando la muerte del paciente.

En México de acuerdo a los datos publicados por la Secretaria de Salud (2008), se considera que aproximadamente entre 150,000 a 200,000 individuos son afectados anualmente por trombosis, de los cuales 67, 000 muertes anuales por causas asociadas a trombosis arteriales coronarias y trombosis cerebral, no se disponen de cifras de tromboembolismo venoso. Es necesario enfrentar este grave problema, mediante medidas no farmacológicas (dieta y ejercicio) y farmacológicas (antitrombóticos).

El antitrombótico ideal debe prevenir la trombosis patológica y limitar la lesión por reperfusión, permitir la respuesta normal a la lesión vascular y limitar el sangrado. Al momento actual, tal medicamento no existe, todos los antitrombóticos tienen riesgo de producir hemorragia, trombocitopenia como efecto toxico principal. Como resultado de ello, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos antitrombóticos con un mejor beneficio a razón de riesgo y que son más convenientes para el uso en la práctica.

En la actualidad, los alimentos han empezado a considerarse no únicamente como fuente de nutrientes sino también como fuente de compuestos activos, dentro de los cuales se encuentran los péptidos antitrombóticos que pueden dar la pauta para el consumo en alimentos convencionales, alimentos funcionales, alimentos medicinales y suplementos alimenticios, que pueden ser usados en la prevención de la trombosis y son asociados con una mínima consecuencia de efectos adversos.

Por lo cual, la obtención de péptidos antitrombóticos a partir del grano de amaranto sería una muy buena alternativa como adyuvante en tratamiento de la trombosis en la población mexicana. Por tal motivo en este trabajo se decidió trabajar con estas proteínas, aunado a que en la globulina teóricamente se predice la presencia de péptidos con actividad antitrombótica (Silvia-Sánchez y cols., 2008). Por otro lado, no existen reportes en la literatura de la presencia de péptidos antitrombóticos en la albúmina 1.

3.0 HIPOTESIS.

La hidrólisis de las proteínas del grano de amaranto con alcalasa dará como resultados la obtención de diferentes péptidos, algunos de los cuales resultarán con actividad antitrombótica.

4.0 OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL:

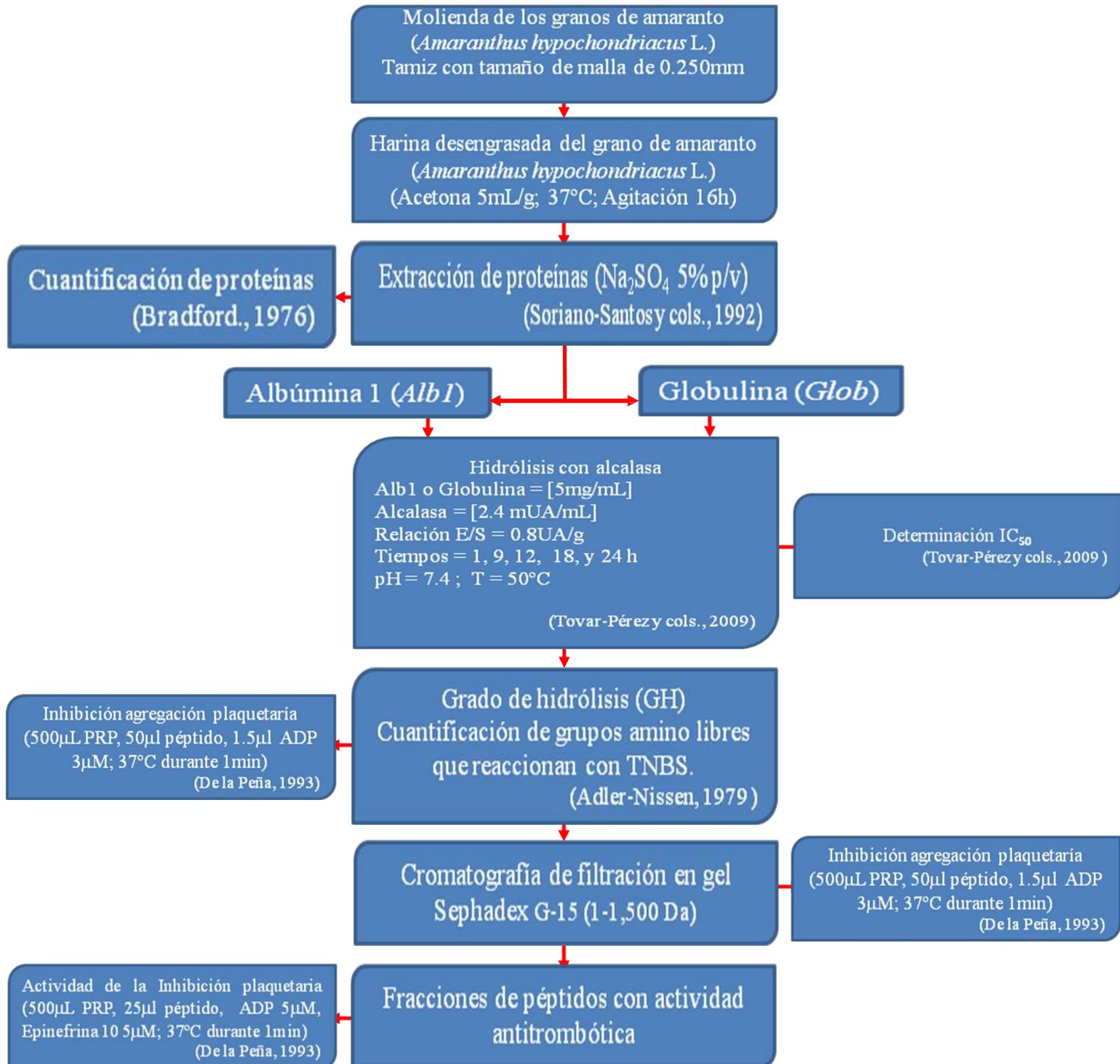
Evaluar la actividad antitrombótica de hidrolizados de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*).

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Aislar y purificar parcialmente la albúmina 1 y globulina del grano de amaranto.
2. Obtener péptidos a partir de la hidrólisis controlada de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto con alcalasa.
3. Determinar el valor de IC_{50} de inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* de los hidrolizados de albúmina 1 y globulina.
4. Identificar y determinar los pesos moleculares relativos de las fracciones peptídicas con actividad antitrombótica.
5. Evaluar el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* de los hidrolizados y de sus fracciones de péptidos de la albúmina y la globulina.

5.0 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

En la Figura 14. Se muestra un esquema de la estrategia experimental que se siguió para la obtención y evaluación de las fracciones de péptidos con actividad antitrombótica a partir de la albúmina 1 y globulina del grano de amaranto. Durante el desarrollo de este trabajo, todos los análisis se efectuaron por triplicado y los resultados fueron expresados como valores promedio.



6.0 MATERIAL Y METODOS.

6.1 Molienda de los granos de amaranto.

Los granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) fueron sometidos a una molienda previa utilizando un molino, la harina obtenida se pasa a través de un tamiz con un tamaño de malla de 0.250 mm (No. 60) e inmediatamente se procede a desengrasar la misma.

6.2 Desengrasado de la harina de amaranto.

La grasa de la harina de amaranto fue extraída con acetona (5 mL/g) en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h (3 repeticiones), seguida de una filtración al vacío y un lavado con éter. La harina es colocada en una campana de extracción para permitir la evaporación de los solventes. Posteriormente se pasa a través de un tamiz con un tamaño de malla de 0.250 mm (No. 60) y es almacenada a 5 °C. La harina desengrasada resultante es utilizada como material de inicio para la producción de hidrolizados de proteína de amaranto.

6.3 Extracción de albúmina 1 y globulina con Na₂SO₄.

Las proteínas del grano de amaranto son extraídas siguiendo el método de Padhye y Salunke (1977). La muestra de 50 g de harina de amaranto desengrasada es mezclada con 300 mL de Na₂SO₄ al 5% (0.04 M) durante 30 min a 5 °C y centrifugada durante 20 min a 13,000 xg. La muestra es separada en sobrenadante y en residuo de harina. Al residuo se le agrega 200 mL Na₂SO₄ al 5% se mezcla durante 30 min y se centrifuga, el sobrenadante obtenido se junta con el primer sobrenadante y es precipitado con (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100% de saturación y se centrifuga 20 min a 13,000 xg en cada nivel. El precipitado de proteína formado es dializado con agua durante 24 h, con cuatro cambios de agua desionizada y se centrifuga 20min a 13,000 xg. El sobrenadante es la fracción que contiene la proteína soluble en agua (albúmina 1), el residuo es dializado con Na₂SO₄ al 10% durante 24 h y se centrifuga 20 min a 13,000 xg, el sobrenadante es la fracción que contiene la proteína soluble en soluciones salinas (globulina) [Figura 15].

6.3.1 Cuantificación de proteínas por el Método de Bradford

El contenido de proteína es determinado por el método de Bradford (1976), previa la elaboración de una curva estándar de albúmina bovina.

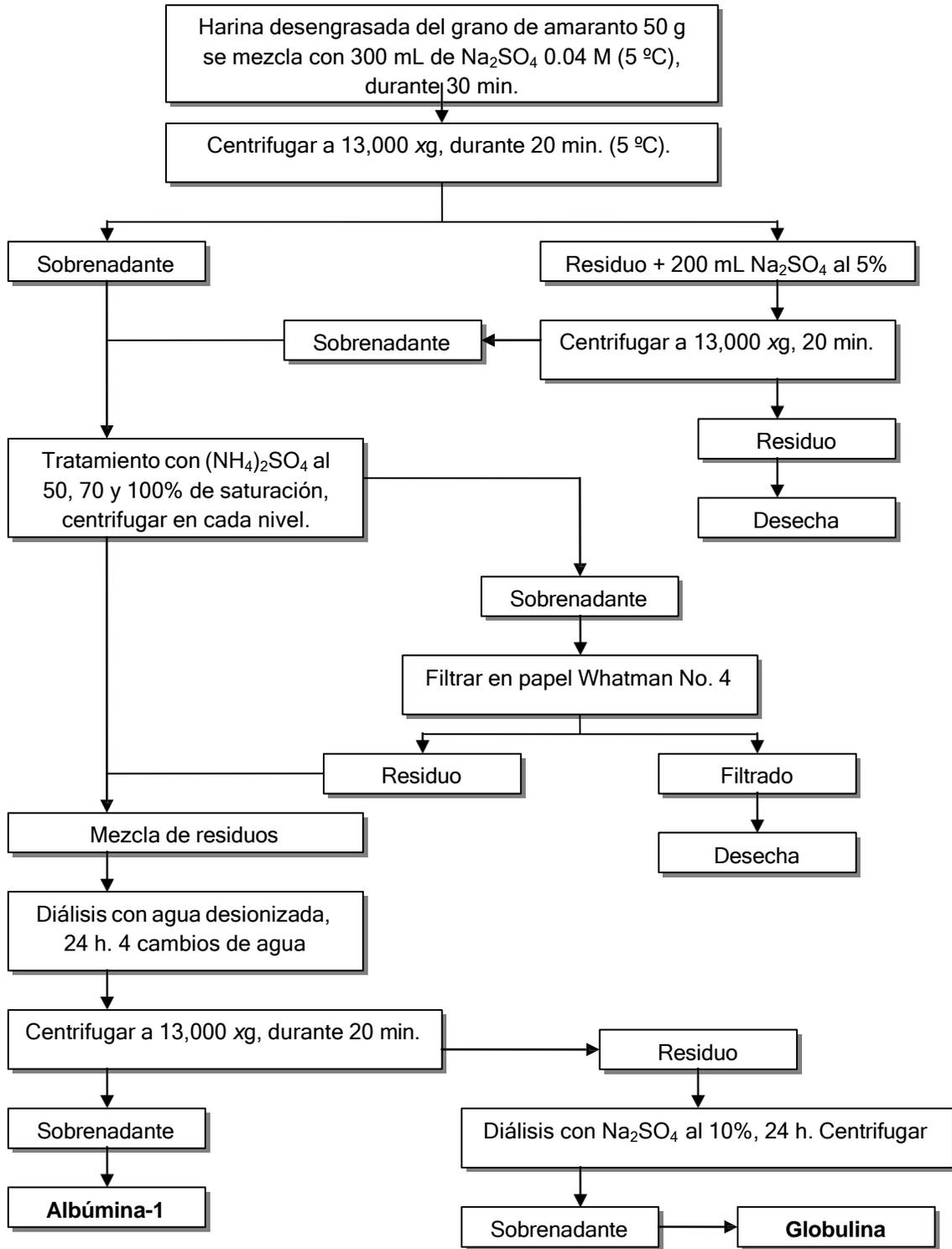


Figura 15. Método de extracción de Albúmina 1 y Globulina del grano del amaranto.

6.4 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina con alcalasa.

La hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina del grano de amaranto se llevó a cabo utilizando el método de Surovset y cols. (2001), utilizando alcalasa como enzima proteolítica, a una concentración de 2.4 mUA/mL, esta enzima es una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* con actividad endopeptidasa (actividad específica de 2.4 UA/g).

La hidrólisis se llevó a cabo añadiendo 320 μ L de buffer de fosfatos 0.5 M a pH 7.4, seguido de 600 μ L de albúmina 1 o globulina (5 mg/mL) la mezcla se incubó durante 5 min a 50 °C. Posteriormente se añade 80 μ L de solución de alcalasa (2.4 mUA/mL) en buffer de fosfatos 0.5 M a pH 7.4 a 50 °C, obteniéndose una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g. La hidrólisis se realizó durante los siguientes intervalos de tiempo: 1, 9, 12, 18 y 24 h. Se utilizó un blanco al cual se le añaden todos los reactivos pero no se somete a hidrólisis. La reacción es detenida añadiendo 100 μ L de solución de fenilmetilsulfonil (PMSF) 2 mg/mL en etanol.

6.5 Grado de hidrólisis de albúmina 1 y globulina con TNBS.

El grado de hidrólisis se determinó utilizando el método de Alder-Nissen (1979), que consiste en la cuantificación de los grupos amino libres y tiene su fundamento en la reacción de los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis con el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS).

El ensayo consistió en mezclar 125 μ L de muestra (albúmina 1 o globulina hidrolizada) en un tubo de ensaye con 1 mL de buffer de fosfatos 0.5 M a pH 8.2 con un 1 mL de solución de TNBS al 0.1% en agua e incubar a 50 °C durante 1 h, en la oscuridad. Después se añadió 2 mL de HCl 0.1 N para detener la reacción, los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 min., posteriormente se lee la absorbancia en un espectro a una longitud de onda de 340 nm [Figura 16].

6.6.4 Inhibición de la agregación plaquetaria de los hidrolizados de la albúmina 1 y globulina.

La actividad de la inhibición de la agregación plaquetaria, se determinó de acuerdo al método De La Peña y cols., (1993), con modificaciones. Este método se fundamenta en el PRP es agregado y varios agentes agregantes son adicionados, cuando las plaquetas se agregan, aumenta la cantidad de luz capaz de pasar a través del cambio en la densidad de la luz (% Transmisión) en el espectrofotómetro, es entonces registrado, dando un patrón típico de agregación [Figura 17].

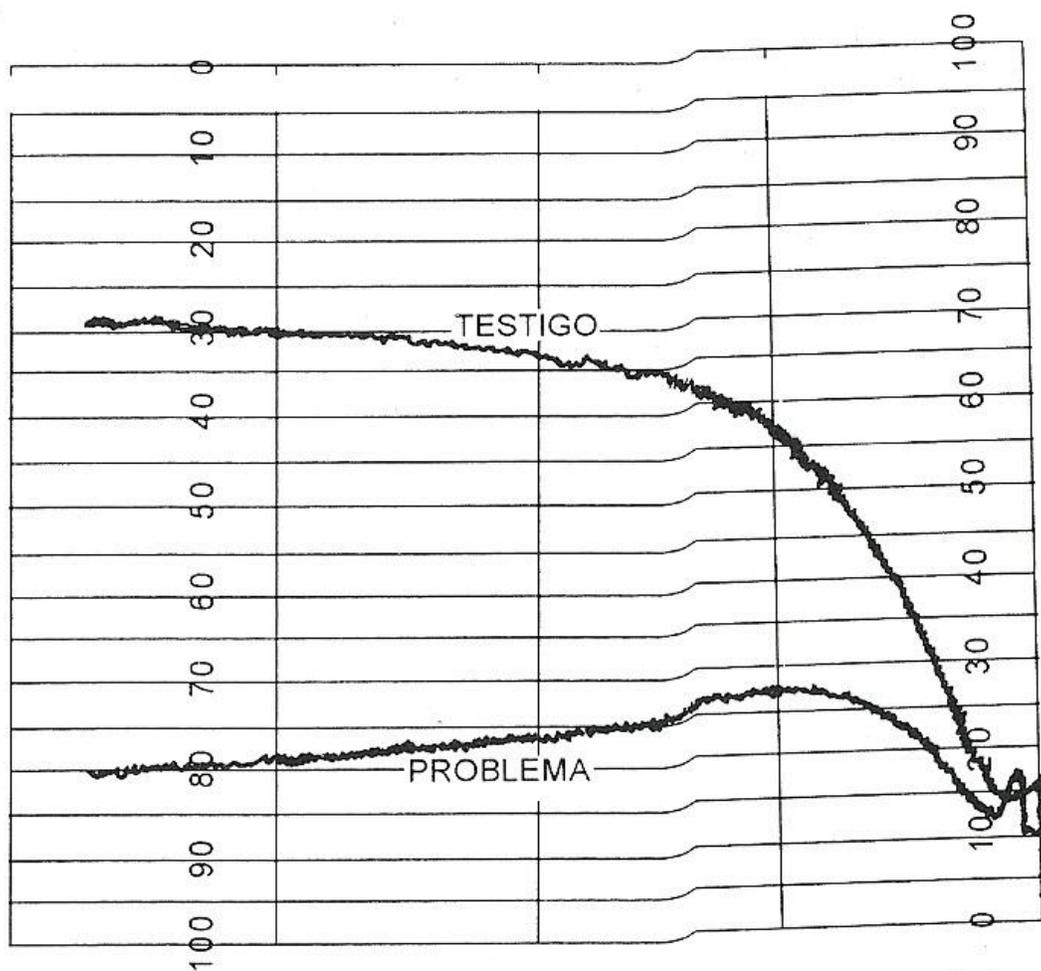


Figura 17. Agregación plaquetaria con ADP 5 µM. Relación entre el testigo normal y el problema.

Los ensayos se llevaron a cabo dentro de las 2 h, después que la sangre se había extraído. Se realizaron las pruebas en dos canales Agregómetro-Luminiscencia (Chronolog Model 560), se adiciono una cantidad de 450 μ L de plasma rico en plaquetas (PRP) para cada ensayo. Posteriormente se añadió 50 μ L del producto derivado del hidrolizado de 24 h de albúmina 1 y globulina, así como sus fracciones de péptidos correspondientes. La agregación se indujo con ADP 3 μ M. La agregación máxima se alcanza en aproximadamente 2-3 min y se expresa en unidades arbitrarias. Se realizaron los controles con el plasma pobre en plaquetas (PPP) correspondiente y el resultado de la agregación del control promedio se consideró como 100% de la agregación plaquetaria.

6.7 Determinación del valor de IC₅₀ de los hidrolizados de la albúmina 1 y globulina.

El valor IC₅₀ se define como la concentración de hidrolizados de proteína expresada en mg/ml requerido para inhibir el 50% de la agregación plaquetaria en condiciones de ensayo establecidas. Se determino por análisis de regresión lineal.

6.8 Cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-15.

Las muestras de hidrolizados de albúmina 1 y globulina que presentaron el mayor % de inhibición antitrombótica (24 h respectivamente) se hicieron pasar a través de una columna de filtración en gel empaquetada con Sephadex G-15, de un rango de fraccionamiento de peso molecular de 1-1500 Da y se equilibró previamente con 30 mL de buffer A (32.5 mM K₂HPO₄, 2.6 mM KH₂PO₄, 0.4 M NaCl, 20 mM mercaptoetanol y 0.02% azida de sodio, la cual tuvo una fuerza iónica de 0.5 y pH de 7.5). Para la determinación del volumen vacío (V₀) y del volumen total (V_t) de la columna se utilizó azul dextrano (2 mg/mL) y DNP-alanina (0.5 mg/mL).

El volumen inyectado fue de 500 μL y se eluyó con el mismo buffer utilizando un flujo de 20 mL/h, se colectaron fracciones de 1.5 mL en un colector de fracciones. En cada una de las fracciones colectadas se midió la absorbancia a 280 nm.

Se seleccionaron las fracciones que mostraron los picos mayores de absorbancia y en éstas se determinó la inhibición de la agregación plaquetaria, así como su peso molecular relativo mediante una curva patrón de marcadores de peso molecular conocido: triosa-fosfato-isomerasa (26.6 kDa), mioglobina (17 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa), aprotinina (6.5 kDa), insulina (3.5 kDa) y bradicinina (1.06 kDa).

6.9 Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de los péptidos antitrombóticos.

Los ensayos se llevaron a cabo dentro de las 2 horas después de que la sangre se había extraído. Se realizaron las pruebas en dos canales Agregómetro-Luminiscencia (Chronolog Model 560), se adiciono una cantidad de 475 μL de plasma rico en plaquetas (PRP) para cada ensayo. Posteriormente se añadió 25 μL del producto derivado de la fracción A1 (albúmina 1) y G2 (globulina). La agregación se indujo con ADP 5 μM , epinefrina 10 μM y colágeno 20 $\mu\text{g/ml}$. La agregación máxima se alcanza en aproximadamente 2-3 minutos y se expresa en unidades arbitrarias. Se realizaron los controles con el plasma pobre en plaquetas (PPP) correspondiente y la agregación de control promedio se considero como 100%.

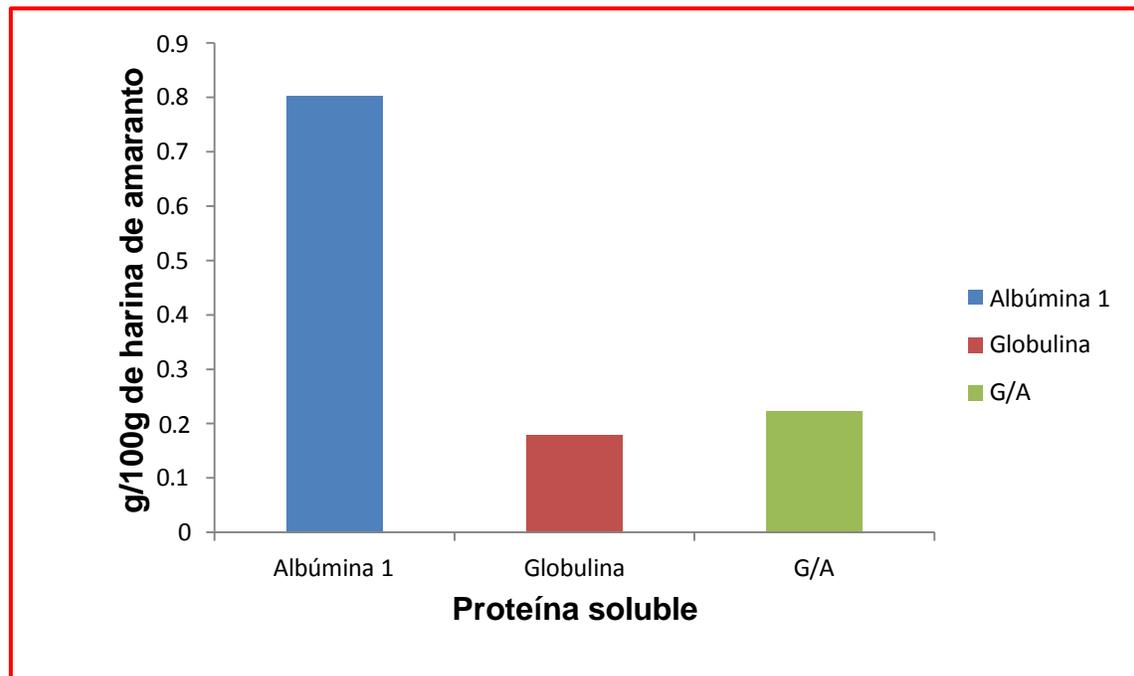
6.10 Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante una Prueba de Dunnett, con un nivel estadístico de significancia de $p < 0.05$, utilizando el Software GraphPad Prisma 5 para Windows. Este método se fundamenta para comparar un tratamiento control (testigo) con otros tratamientos (muestra).

7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Extracción de albúmina 1 y globulina con Na_2SO_4 al 5%.

En la Gráfica 1 se muestra el contenido de proteína soluble determinado por el Método de Bradford para la albúmina 1 y la globulina de la harina desengrasada, aisladas con Na_2SO_4 0.04 M.



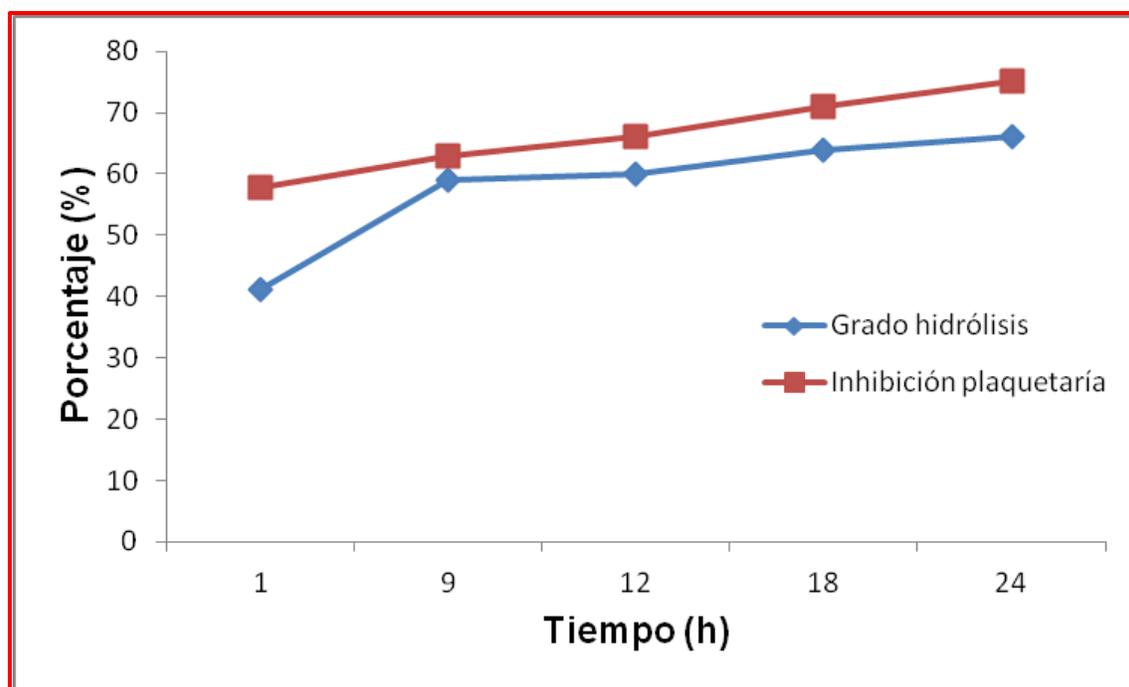
Gráfica 1 Cuantificación de la albúmina 1 y globulina de la harina desengrasada del amaranto por el Método de Bradford.

El grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L*), proporciona un valor nutricional adecuado. Su contenido de proteína cruda es de 12% a 18% (Konishi y cols., 1985; Singhal y Kulkarni, 1988). Su composición de las fracciones de proteína se encuentra la albúmina del 20% a 23% y la globulina del 18% a 21% (Breassani y García-Vela, 1990). Por lo cual, el propósito de este estudio fue la obtención de péptidos antitrombóticos a partir de la albúmina 1 y globulina del grano de amaranto.

La harina desengrasada de amaranto posee una alta concentración de proteína cruda del 15.38% comparada con otros cereales y una baja concentración de extracto etéreo del 0.22% (Tovar-Pérez y cols., 2009). Por lo que, este proceso de extracción con acetona es eficiente, eliminando la grasa y concentrando la proteína contenida en la harina, obteniéndose la materia prima para llevar a cabo la extracción de las proteínas del amaranto.

Las proteínas de la harina de amaranto han sido aisladas basados en la solubilidad en soluciones salinas utilizando Na_2SO_4 al 5% (Soriano Santo y cols., 1992). En la tabla 1 se observa un mayor rendimiento de albúmina 1 (0.8030 ± 0.280 g/100g) respecto a la globulina (0.1795 ± 0.005 g/100g), resultando una relación globulina/albúmina 1 de 0.2235, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Soriano-Santos y cols., 1992; Tovar-Pérez y cols., 2009; Ortiz-Hernández y cols., 2013). Además, representan el 67% del nitrógeno total y el 44% de las proteínas totales del grano de amaranto (Segura-Nieto y cols., 1992). Por tal motivo en este trabajo se decidió trabajar con estas proteínas.

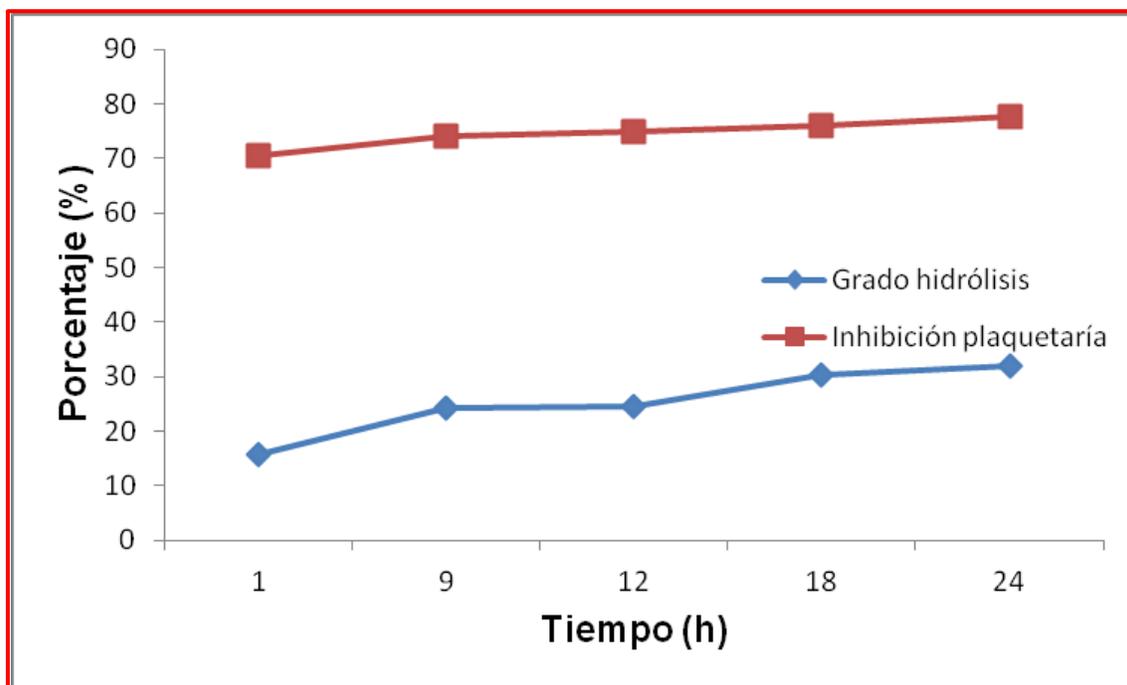
7.2 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa y el porcentaje de inhibición plaquetaria.



Gráfica 2. Grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la albúmina 1 a diferentes tiempos.

En la gráfica 2 se observa que aun tiempo de hidrólisis de 24h, para la albúmina 1 se obtiene un grado de hidrólisis de $66.10 \pm 0.98\%$ y un mayor porcentaje de inhibición plaquetaria del $75.21 \pm 0.05\%$, al cual le corresponde un valor de IC_{50} de 0.4311 ± 0.001 mg/mL [Gráfica 3].

7.3 Hidrólisis enzimática de globulina con alcalasa y el porcentaje de inhibición plaquetaria.



Gráfica 4. Grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la globulina a diferentes tiempos.

En la gráfica 4 se observa que a un tiempo de hidrólisis de 24 h, para la globulina se obtiene un grado de hidrólisis de $32.03 \pm 0.69\%$ y un mayor porcentaje de inhibición plaquetaria del $77.68 \pm 0.05\%$, al cual le corresponde un valor de IC_{50} de 0.0128 ± 0.001 mg/mL [Gráfica 5].

Los péptidos bioactivos con potencial antitrombótico pueden ser liberados por un proceso de hidrólisis enzimática *in vitro* de proteínas (Vioque y cols., 2000). En la tabla 2 y 3 se observa un máximo grado de hidrólisis de albúmina 1 ($66.10 \pm 0.98\%$) y de globulina ($32.03 \pm 0.69\%$) con alcalasa a las 24 h. La cual ha sido frecuentemente utilizada para la obtención de péptidos con actividad biológica: antitumoral (Barrio y Añon, 2009); antihipertensivo (Tovar-Pérez, 2009); antioxidante (Tironi y Añon, 2010), la cual se sabe que se requiere de tiempos de hidrólisis de 4 h a 18 h y superiores a 24 h, para obtener péptidos antitrombóticos.

Es decir, que estos péptidos están conformados por aminoácidos aromáticos (fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, tirosina, triptófano, valina), ya que la alcalasa hidroliza enlaces peptídicos con amplia especificidad (Markland y Smith, 1971) y liberando oligopéptidos de entre 2 a 6 aminoácidos y por consiguiente es necesario alcanzar grados de hidrólisis elevados, alrededor del 20% o superior, con una distribución de pesos moleculares <1000 Daltons (Camacho Rubio y cols., 1993).

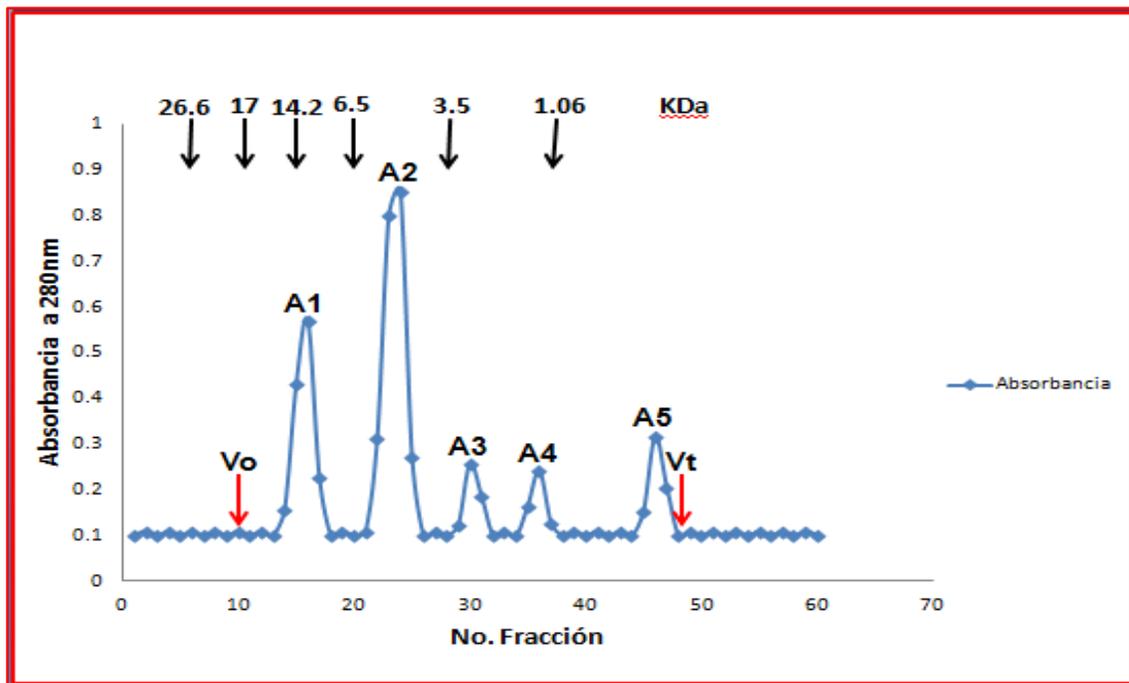
Orozco-Condorí y cols. (2014), reportaron la presencia de péptidos bioactivos en semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus*), con actividad antitrombótica de hidrolizados con gránulos de Kéfir a las 72 h con un % de Inhibición de la coagulación del 60% con un $IC_{50} = 2.22$ mg/mL. En la tabla 2 y 3 se observa el % de Inhibición de la coagulación de albúmina 1 del $75.21 \pm 0.05\%$ con un $IC_{50} = 0.4311 \pm 0.001$ mg/mL y de globulina del $77.68 \pm 0.05\%$ con un $IC_{50} = 0.0128 \pm 0.001$ mg/mL hidrolizados con alcalasa a las 24 h. Se han reportado aislados proteicos de amaranto con actividad antitrombótica: hidrolizados con alcalasa y tripsina con un $IC_{50} = 5$ mg/mL (Sabbione y Scilingo, 2010); hidrolizados con una proteasa aspártica con un $IC_{50} = 5.9$ mg/mL (Ibáñez, 2012). Es decir, que el poder de inhibición de los hidrolizados de 24 h de albúmina y globulina es mayor ya que sus valores de IC_{50} son menores a los reportados en la literatura.

Otros ensayos de péptidos con actividad antitrombótica *in vitro* e *in vivo* obtenidos a partir: de κ -caseína y del glicomacropéptido con un IC_{50} = 0.5 y 2 mg/mL (Rutherford y Gill, 2000); de clara de huevo IC_{50} = 25 mg/mL (Yang y cols., 2007); de semillas de colza con un IC_{50} = 27 mg/mL (Zhang y cols., 2008) respectivamente.

De acuerdo con varios estudios realizados en hidrolizados de péptidos con actividad antitrombótica, obtenidos de diferentes fuentes proteínicas, se han observado valores de IC_{50} en un rango de 0.5 a 30 mg/mL. Por lo que los valores obtenidos de IC_{50} en este trabajo se encuentra dentro de los reportados en la literatura, destacando el valor de IC_{50} de 0.0128 mg/mL en la globulina a partir de la hidrólisis de 24h. Se puede decir que se trata de unos de los péptidos antitrombóticos con mayor capacidad de inhibición de la coagulación obtenido de una fuente natural como lo es el grano de amaranto. Por lo cual se decidió seleccionar únicamente los hidrolizados de 24 h de albúmina 1 y globulina para realizar la purificación por filtración en gel Sephadex G-15.

7.4 Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado (24 h) de albúmina 1.

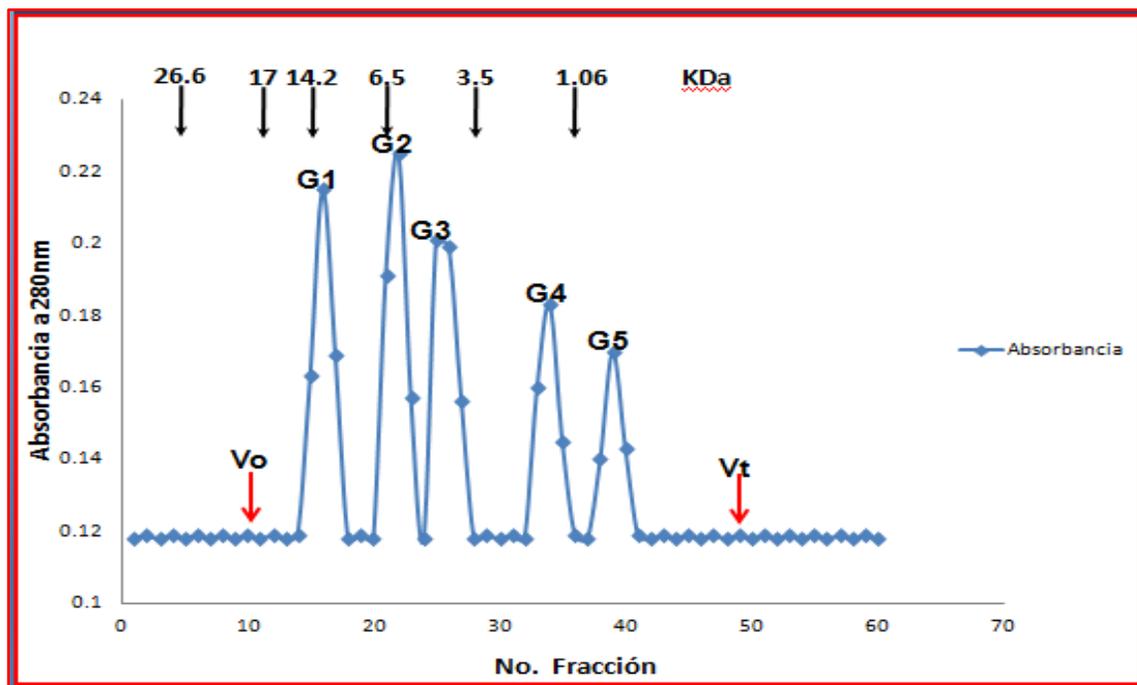
En la gráfica 4 se muestra el cromatograma obtenido de la columna de filtración en gel Sephadex G-15, al hacer pasar el hidrolizado de 24 h de la albúmina 1, se observó que el peso molecular mínimo (0.57 KDa) corresponde a la fracción A5 y el peso molecular máximo (12.6 KDa) corresponde a la fracción A1.



Gráfica 6. Cromatograma de los hidrolizados de 24 h de la albúmina 1.

7.5 Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado (24 h) de globulina.

En la gráfica 5 se muestra el cromatograma obtenido de la columna de filtración en gel Sephadex G-15, al hacer pasar el hidrolizado de 24 h de la globulina, se observó que el peso molecular mínimo (0.79 KDa) corresponde a la fracción G5 y el peso molecular máximo (10.7 KDa) corresponde a la fracción G1.



Gráfica 7. Cromatograma de los hidrolizados de 24 h de la globulina.

Actualmente no solo se hidrolizan a las proteínas con la finalidad de aumentar su digestibilidad, si no para que los péptidos liberados aporten beneficios para la salud. Por ello se busca conocer características como el peso molecular, su composición de aminoácidos y sus funciones biológicas, características que están relacionados y que le dan un alto potencial de utilidad en la formulación de nuevos nutracéuticos y nutricosméticos (Wu y cols., 2005; Morales y cols., 2009; Tabor y Blair, 2009).

Específicamente, los péptidos antitrombóticos reportados se caracterizan por ser oligopéptidos de cadena corta de entre 2 a 16 aminoácidos cuya composición predominan: alanina, arginina, asparagina, aspartato, fenilalanina, glicina, glutamato, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina y valina (Silvia-Sánchez y cols., 2008; Hartmann y Meisel, 2007; Rutherford y cols., 2000; Mazoyer y cols., 1990; Dziuba y cols., 2009) con una distribución de pesos moleculares que van desde 2 a 1880 Daltons (Rojas Ronquillo, 2012; Yang, 2008).

En la tabla 4 y 5 se observa que está conformado por 5 diferentes fracciones de péptidos correspondientes a sus pesos moleculares (KDa) respectivos: Albúmina 1 (A1= 12.6, A2= 5.55, A3= 2.99, A4= 1.61, A5= 0.57); Globulina (G1= 10.7, G2= 5.44, G3= 3.87, G4= 1.39, G5, 0.79), cuyos oligopéptidos van de entre 5 a 114 aminoácidos para la albúmina 1 y de entre 7 a 107 aminoácidos para globulina. Es decir, que los valores de peso molecular como de oligopéptidos obtenidos en este trabajo sobrepasan a los reportados en la literatura.

Es importante clasificar a las especies hidrolíticas de acuerdo al porcentaje contenido [Tabla 32]. Algunas de ellas se han realizado en el trigo (Wang y cols., 2007) y en el grano de amaranto (Ortiz-Hernández, 2013), ya que esta composición (cantidad y tamaño) se relaciona con la actividad biológica que presentan y su posible uso en la formulación de productos farmacéuticos y cosméticos.

Es decir, que la Fracción A5 (0.57 KDa) de la albúmina 1 muestra un patrón de peso molecular similar a la Fracción F2 (0.55 KDa) y F5_b (0.53 KDa), por lo cual, además de presentar actividad antitrombótica pueda poseer propiedades antihipertensivas y antioxidantes [Tabla 32]. En este trabajo se observa péptidos potencialmente multifuncionales cuyas bioactividades puedan regular positivamente contra enfermedades cardiovasculares.

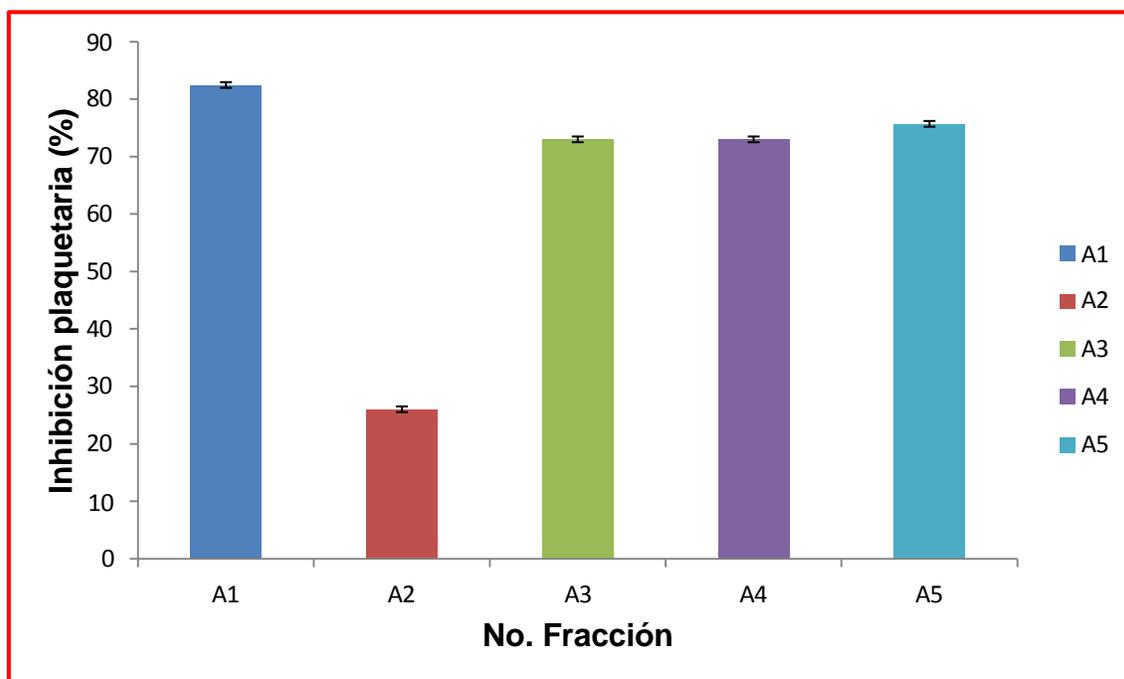
Especie	Peso molecular	Albúmina 1		Globulina	
Proteínas	>20 KDa				
Proteosas	5-10 KDa	A1= 12.6 ^A	F3= 10.8 ^C	G1= 10.7 ^A	
Peptonas	1-5 KDa	A2= 5.55 ^A A3= 2.99 ^A A4= 1.61 ^A	F1= 4.70 ^B F4= 2.94 ^C F5 _a = 1.44 ^C	G2= 5.44 ^A G3= 3.87 ^A G4= 1.39 ^A	F2= 4.70 ^B
Péptidos	200-500 Da	A5= 0.57 ^A	F2= 0.55 ^B F5 _b = 0.53 ^C	G5= 0.79 ^A	F3= 0.55 ^B
Aminoácidos	75-200 Da				

Tabla 32. Guadix y cols., 2000. Clasificación de las especies obtenidas por cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-15 del hidrolizado de 24 h de albúmina 1 y globulina.

A= Antitrombótico; B= Antihipertensivo (Tovar-Pérez, 2009); C= Antioxidante (Ortiz-Hernández, 2013).

7.6 Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.

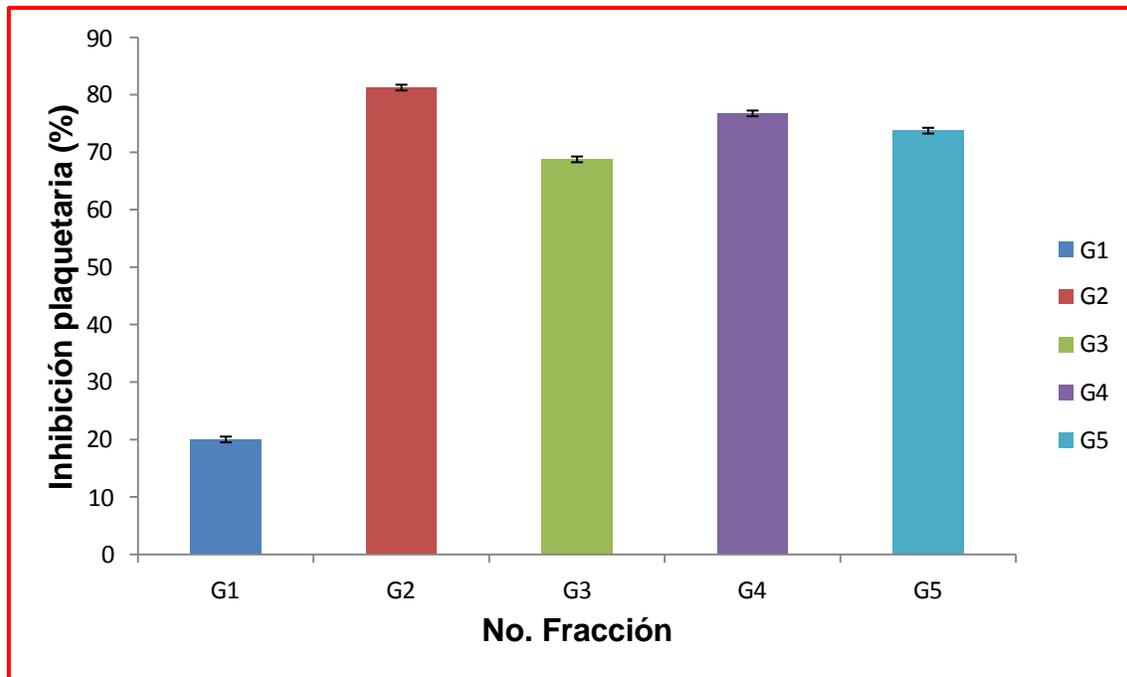
En la gráfica 8 se observa que para la fracción A2 le corresponde un mínimo porcentaje de inhibición plaquetaria de $26.00 \pm 0.05\%$ y para la fracción A1 le corresponde un máximo porcentaje de inhibición plaquetaria de $82.44 \pm 0.05\%$.



Gráfica 8. Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.

7.7 Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina.

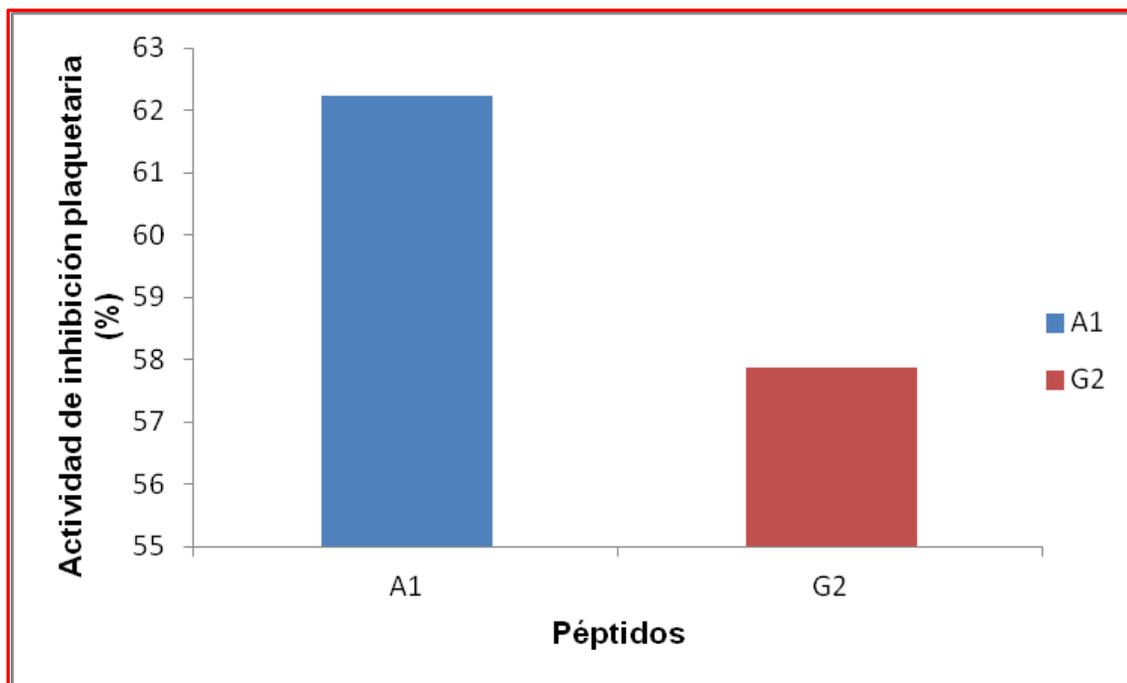
En la gráfica 9 se observa que para la fracción G1 le corresponde un mínimo porcentaje de inhibición plaquetaria de $20.00 \pm 0.05\%$ y para la fracción G2 le corresponde un máximo porcentaje de inhibición plaquetaria de $81.25 \pm 0.05\%$.



Grafica 9. Porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina.

7.8 Inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP.

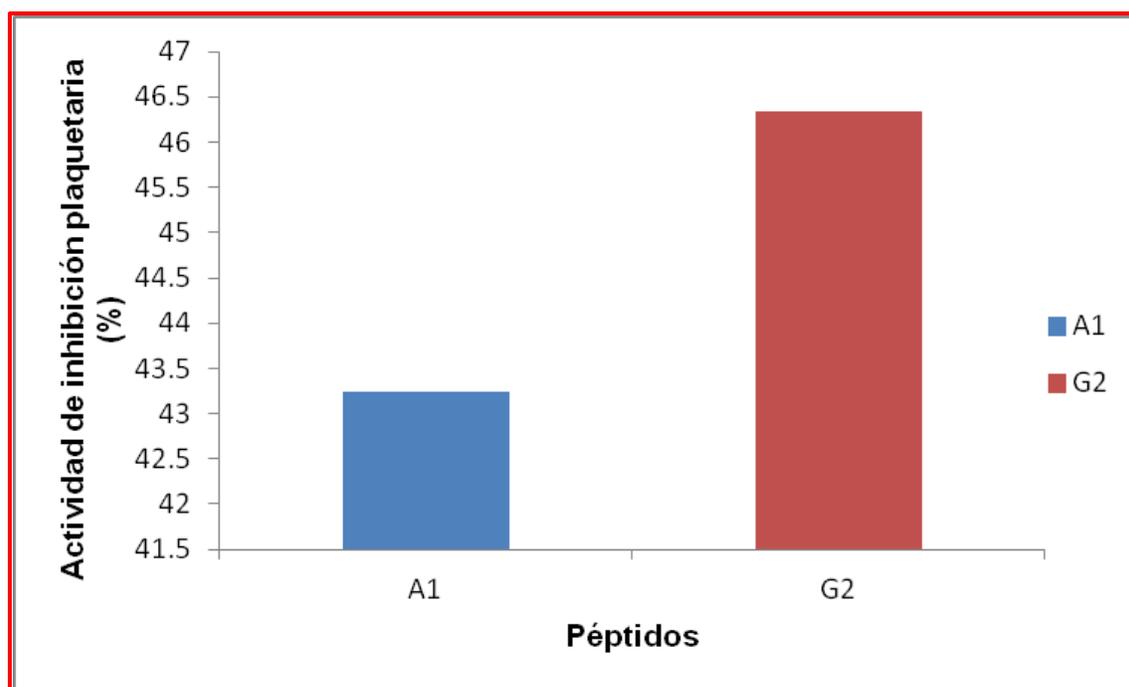
En la gráfica 10 se observa que para la fracción A1 le corresponde un porcentaje de activación plaquetaria de $62.23 \pm 8.51\%$ y para la fracción G2 le corresponde un porcentaje de activación plaquetaria de $57.86 \pm 12.8\%$ inducido con ADP respectivamente.



Gráfica 10. Porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP.

7.9 Inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con epinefrina.

En la gráfica 11 se observa que para la fracción A1 le corresponde un porcentaje de activación plaquetaria de $43.24 \pm 16.0\%$ y para la fracción G2 le corresponde un porcentaje de activación plaquetaria de $46.34 \pm 13.2\%$ inducido con epinefrina respectivamente.



Gráfica 11. Porcentaje de activación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con epinefrina.

Rojas-Ronquillo y cols. (2012), reportaron la presencia de péptidos antitrombóticos en suero de leche y caseínas fermentadas por *L. casei Shirota* y *S. thermophilus* encontrando un % de actividad antitrombótica de las fracciones: D9 (53.5%) y E10 (30.0%) respectivamente. En la tabla 6 y 7 se observa que, en cuanto al porcentaje de actividad antitrombótica, la fracción A1 mostró la mayor actividad ($82.44 \pm 0.05\%$), seguido de las fracciones A5 (75.68 ± 0.05), A3 y A4 (72.98 ± 0.05) y A2 (26.00 ± 0.05) para la albúmina 1; la fracción G2 mostró la mayor actividad ($81.25 \pm 0.05\%$), seguido de las fracciones G4 (76.75 ± 0.05), G5 (73.75 ± 0.05), G3 (68.75 ± 0.05) y G1 (20.00 ± 0.05) para la globulina respectivamente. Recientemente Domínguez-González (2014), reportaron la presencia de péptidos antitrombóticos en un producto lácteo fermentado por *L. casei Shirota* y *S. thermophilus* encontrando un % de actividad antitrombótica de las fracciones: F27 (41.1 ± 0.90), F24 (36.3 ± 10.8) y F17 (29.5 ± 3.00) respectivamente. Cabe señalar que la actividad antitrombótica no depende del tamaño del péptido (Tabla 4 y 5), pero si puede influir en el mecanismo de inhibición de la trombina, es decir, el péptido puede interactuar con el sitio activo, con unos de los exositos ó con el sitio activo y unos de los exositos (Ciprandi y cols., 2006; Segers y cols., 2007; Baetz y Spinler, 2008).

Otros ensayos de péptidos con actividad antitrombótica *in vitro* evaluados en plaquetas obtenidos a partir de la semilla de la uva con un % de actividad antitrombótica del $45 \pm 3.6\%$ (Vitseva, 2005) y de semillas de frijol lima con un % de actividad antitrombótica del 88.00% (Córdoba Lizama, 2013) respectivamente. En la tabla 8 y 9 se observa un % de actividad antitrombótica para A1 ($62.23 \pm 8.51\%$), para G2 ($57.86 \pm 12.8\%$) inducido por ADP y para A1 ($43.24 \pm 16.0\%$), para G2 ($46.34 \pm 13.2\%$) inducido por epinefrina. Recientemente, De la Peña y cols. 1993, han descrito el efecto antiplaquetario del prolame, buame y procame sobre la agregación plaquetaria *in vitro* inducido por ADP ($5 \mu\text{M}$) y epinefrina ($10 \mu\text{M}$), estas propiedades farmacológicas novedosas de los aminoestrogenos estudiados son similares a los péptidos antitrombóticos del grano del amaranto con interesantes posibilidades abiertas para la aplicación de estrategia clínicas contra las enfermedades trombóticas.

In vitro, se encontraron dos tipos distintos de respuesta de agregación plaquetaria: a) Primaria reversible, asociado con un cambio de forma que se produce sin liberación gránulos de las plaquetas y se asocia con la unión de fibrinógeno; b) Secundaria irreversible que se correlaciona con una amplificación en los mecanismos de señalización celular. La activación plaquetaria inducida por ADP promueve una rápida afluencia de calcio desde el medio extracelular asociado con los canales de calcio operados por receptores y la movilización posterior de reservas internas de calcio (Gachet y cols., 1997). Las fracciones peptídicas A1 y G2 inhiben la segunda fase de agregación plaquetaria inducida por ADP, lo que sugiere un deterioro en la movilización de calcio de las reservas internas. Además, inhiben la conversión de ácido araquidónico a tromboxano A₂ inducido por epinefrina, lo que sugiere que actúa sobre sus receptores y provoca una respuesta de calcio intracelular retardada (De la Peña y cols., 2001).

Es decir que las fracciones peptídicas A1 y G2 podrían ejercer su acción antiplaquetaria mediante la inhibición de los receptores de ADP (P2Y₁, P2Y₁₂) y de tromboxano (TxA₂) ó inclusive inhibiendo la acción de las enzimas que promueven la agregación plaquetaria (fosfodiesterasa y ciclooxigenasa). Esto se puede transpolar debido a que existen fármacos con mecanismos de acción similares como el ácido acetilsalicílico y el clopidogrel, los cuales se emplean para inhibir la agregación plaquetaria y evitar la formación de trombos (Palomo y cols., 2009).

Esta investigación establece que las principales fracciones de péptidos de la albúmina 1 (A1) y globulina (G2) presentan actividad de inhibición de los receptores de ADP (P2Y₁, P2Y₁₂) y de epinefrina (α -2 adrenérgico), por lo cual, le dieron un giro al trabajo, sin duda la presencia de estos péptidos con actividad antiplaquetaria establece el potencial de futuras investigaciones *in vivo* en el campo de alimentos funcionales o “nutracéuticos” en beneficio de la salud humana.

8.0 CONCLUSIONES.

- Todos los hidrolizados de albúmina 1 y globulina (1, 9, 12, 18 y 24 h) presentaron inhibición de la agregación plaquetaria, bajo las siguientes condiciones de ensayo:
 - [Sustrato] = 5 mg/mL
 - [Enzima] = 2.4 mUA/mL
 - [E/S] = 0.8 UA/g
 - pH = 7.4
 - T = 50 °C
- La mayor inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* fue de 75.21±0.05% para la albúmina 1 y de 77.68±0.05% para la globulina que se registraron a las 24 h, respectivamente.
- Los valores de IC₅₀ alcanzados en las condiciones de ensayo, siendo de 0.4311±0.001 mg/mL para la albúmina 1 y de 0.0128±0.001 mg/mL para la globulina de la hidrólisis enzimática de 24 h respectivamente.
- La mayor inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* de las fracciones del hidrolizado a las 24 h fue de 82.44±0.05% para la A1 (12.67 KDa) y de 81.25±0.05% para la G2 (5.44 KDa).
- La inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* inducido con ADP fue de 62.23±8.51% para la A1; de 57.86±12.8% para la G2 y de 43.24±16.0% para la A1 y de 46.34±13.2% para la G2 inducido con epinefrina.

9.0 PERSPECTIVAS.

- Optimizar las condiciones de hidrólisis enzimática utilizando alcalasa y otras enzimas hidrolíticas.
- Caracterizar la composición peptídica de los hidrolizados que se obtienen por la acción de la alcalasa.
- Estudiar la relación entre la estructura química de los péptidos antitrombóticos con sus receptores plaquetarios.
- Realizar estudios *in vivo* utilizando como modelo experimental trombosis de la arteria carótida en ratas Wistar con el propósito de evaluar la estabilidad de la actividad biológica de los péptidos antitrombóticos.
- Diseñar nutracéuticos con los hidrolizados que contengan los péptidos antitrombóticos, así como sus propiedades funcionales, su alergenicidad y su vida de anaquel.
- Realizar un análisis de mercado de los alimentos funcionales que contengan los péptidos antitrombóticos para su posible comercialización.

10. APENDICES.

10.1 Determinación de proteínas por el Método de Bradford.

Tabla 33. Orden de adicción de los reactivos para la cuantificación de proteínas de albúmina 1 y globulina.

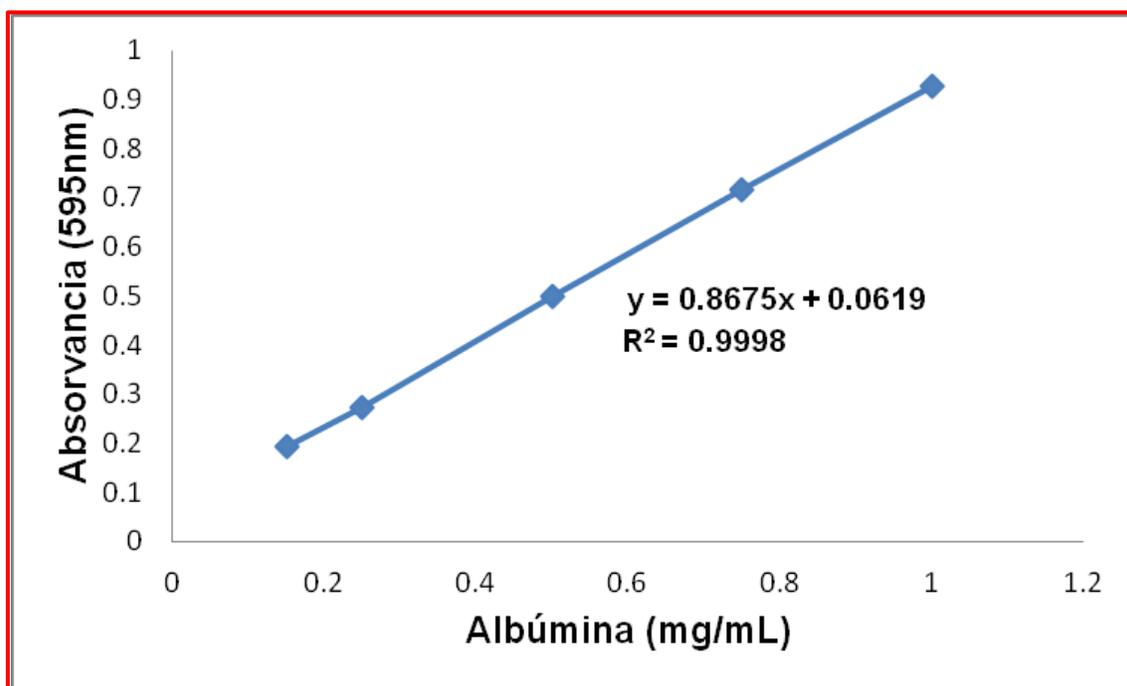
Sustancias	Numero de Tubos						
	Blanco	1	2	3	4	5	Solución problema
BSA 0.01%	-----	150	250	500	750	1000	-----
Muestra problema	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1000
NaCl 0.15 M	1000	850	750	500	250	-----	-----
Reactivo Bradford	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Incubar 5 min a temperatura ambiente							
Leer a temperatura ambiente a 595 nm							
NOTA: Todas las cantidades están referidas en μL							

10.2 Curva estándar de albúmina sérica bovina.

Tabla 34. Valores de absorbancia correspondientes a la curva estándar de albúmina bovina.

Albúmina (mg/mL)	Absorbancia (595 nm)
0.15	0.194 ±0.03 ^a
0.25	0.273 ±0.00 ^a
0.50	0.500 ±0.01 ^a
0.75	0.715 ±0.02 ^a
1.00	0.927 ±0.01 ^a

^a Desviación estándar.



Gráfica 12. Curva estándar de albúmina bovina.

10.3 Extracción de albúmina 1 y globulina con Na₂SO₄ al 5%.

Tabla 35. Valores obtenidos de la cuantificación de la albúmina 1 y globulina por el Método de Bradford.

Determinación	Albúmina 1	Globulina
Proteína soluble	* 0.8030±0.280 ^a	* 0.1795±0.005 ^a
Relación Globulina/Albúmina	0.2235	

* gramos de proteína/100g de harina de amaranto

^a Desviación estándar

10.4 Determinación del grado de hidrolisis enzimática por el Método de Adler-Nissen.

Tabla 36. Orden de adicción de los reactivos para la proteólisis de albúmina 1 y globulina.

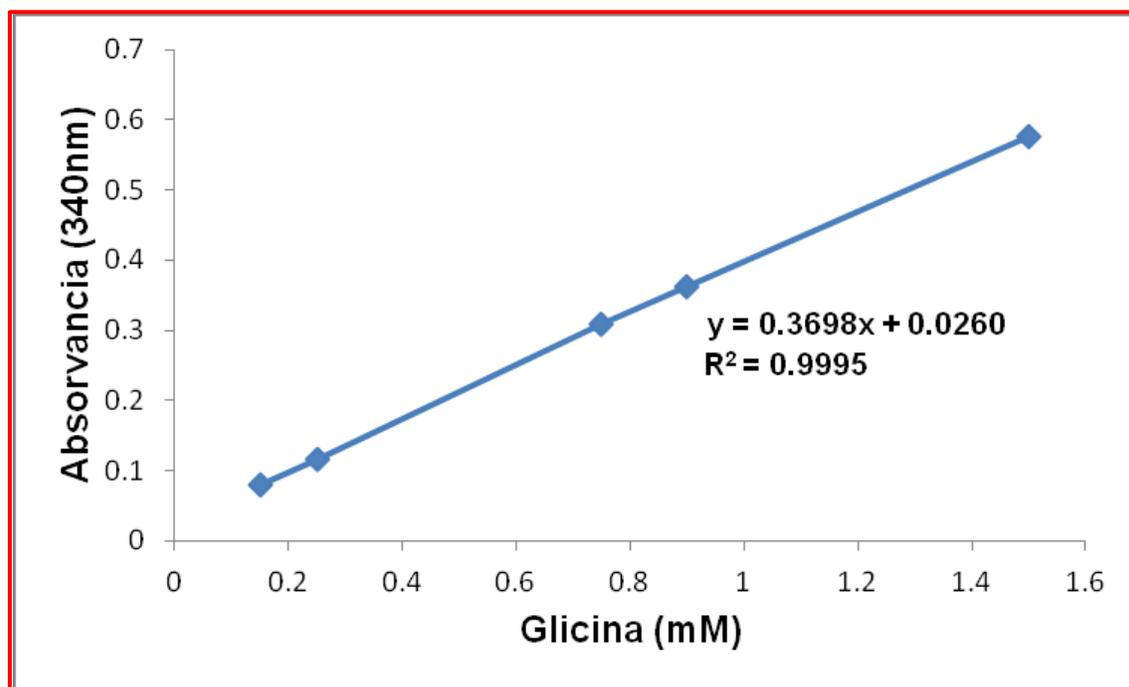
Adición de reactivos	Volumen añadido
Buffer de fosfatos 0.5 M, pH 7.4	320 μ L
Albúmina 1 o globulina (5 mg/mL)	600 μ L
Incubar 5 minutos a 50°C	
Alcalasa 2.4 mUA/mL en Búfer de fosfatos 0.5 M, pH 7.4 a 50 °C	80 μ L
PMSF en etanol (2 mg/mL) Añadir 100 μ L	Tiempo de hidrólisis (1, 9, 12, 18 y 24 h)
Cuantificación de los grupos amino libres con TNBS	
De la solución anterior tomar	125 μ L
Buffer de fosfatos 0.5 M, pH 8.2	1 mL
TNBS (0.1% en agua)	1 mL
Incubar 1 hora a 50 °C en la oscuridad	
HCl 0.1 N	2 mL
Leer en frío a 340 nm	
NOTA: Orden de adicción de los reactivos para el blanco de lectura:	
Alcalasa-PMSF-albúmina 1 o Globulina-TNBS-HCl	

10.5 Curva estándar de glicina.

Tabla 37. Valores de absorbancia correspondientes a la curva estándar de glicina.

Glicina (mM)	Absorbancia (340 nm)
0.15	0.079 ±0.003 ^a
0.25	0.116 ±0.003 ^a
0.75	0.309 ±0.006 ^a
0.90	0.362 ±0.004 ^a
1.50	0.576 ±0.005 ^a

^a Desviación estándar.



Gráfica 13. Curva estándar de glicina.

10.6 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 y globulina con alcalasa y el porcentaje de inhibición plaquetaria.

Tabla 38. Valores obtenidos del grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la albúmina 1 a diferentes tiempos.

Tiempo (h)	Grado de hidrólisis (%)	Inhibición plaquetaria (%)
1	*41.06±0.79 ^a	*57.69±0.32 ^a
9	59.09±0.55 ^a	*62.87±0.25 ^a
12	59.88±0.84 ^a	*66.17±0.15 ^a
18	*63.97±0.50 ^a	*71.05±0.23 ^a
24	*66.10±0.98 ^a	*75.26±0.17 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 39. Valores obtenidos del grado de hidrólisis y % de inhibición plaquetaria de la globulina a diferentes tiempos.

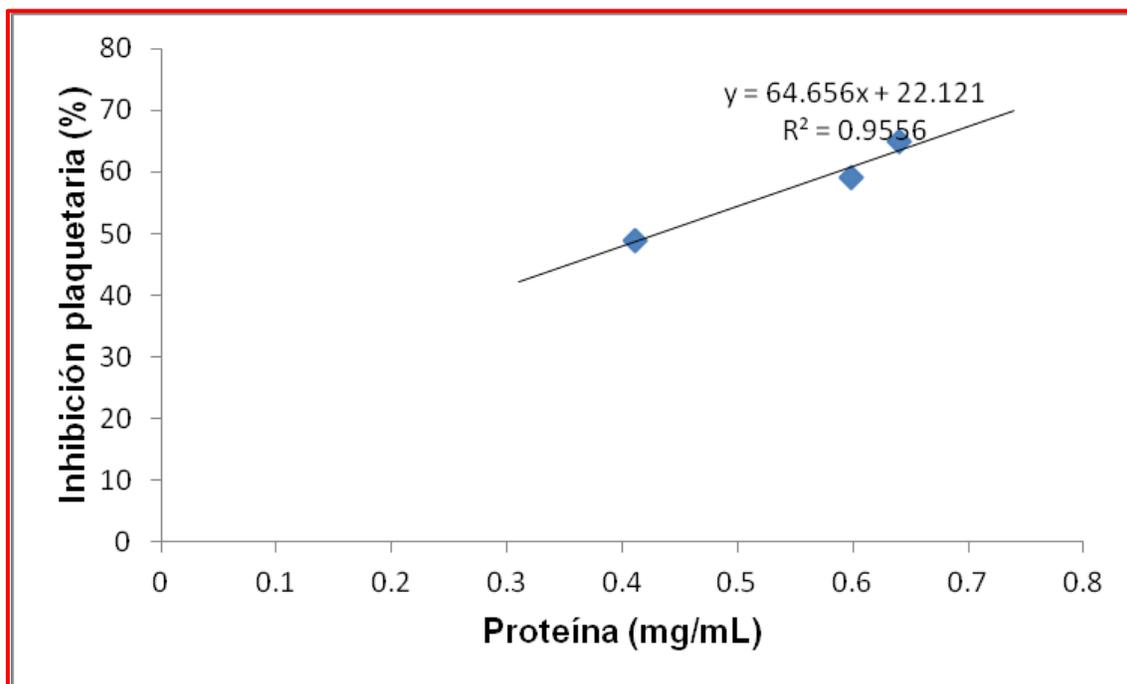
Tiempo (h)	Grado de hidrólisis (%)	Inhibición plaquetaria (%)
1	*15.85±0.46 ^a	*70.51±0.32 ^a
9	24.29±0.45 ^a	*74.23±0.26 ^a
12	24.44±0.37 ^a	*75.26±0.21 ^a
18	*30.26±0.29 ^a	*75.89±0.01 ^a
24	*32.03±0.69 ^a	*77.70±0.01 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05).

10.7 Regresión lineal del valor de IC₅₀ del hidrolizado de 24 h de la albúmina 1 y de la globulina.

Tabla 40. Valores obtenidos para la determinación del valor de IC₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24 h de la albúmina 1.

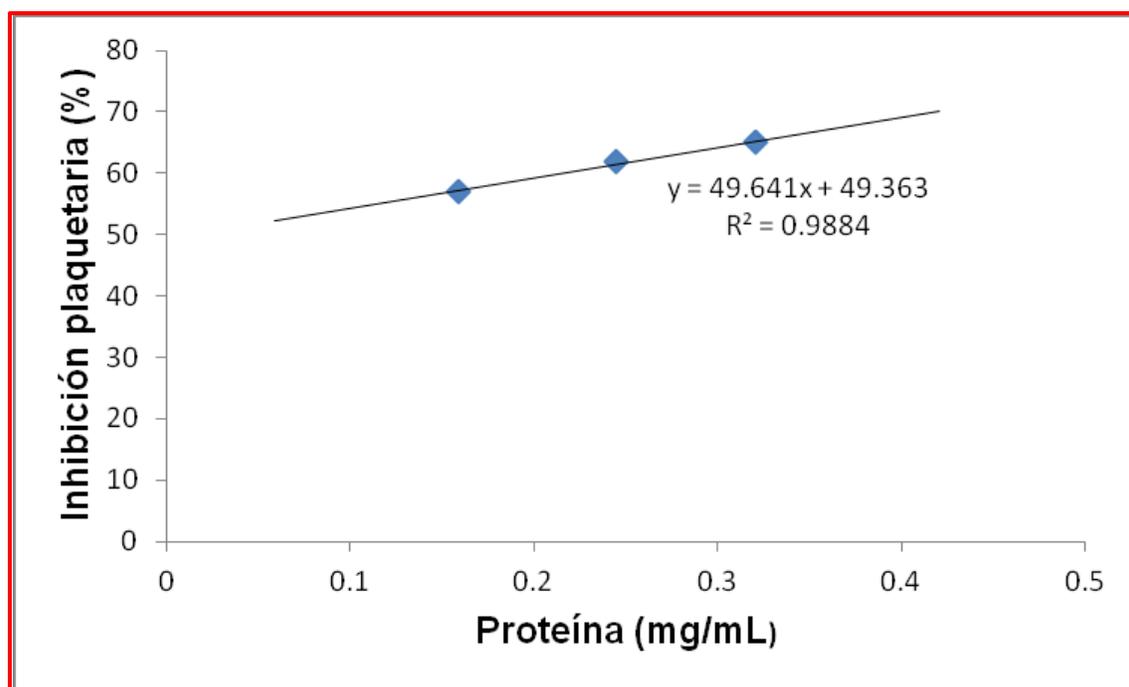
Proteína (mg/mL)	Inhibición agregación plaquetaria (%)
0.41	49.0
0.60	59.0
0.64	65.0



Gráfica 3. Regresión lineal para la determinación del valor de IC₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24 h de la albúmina 1.

Tabla 41. Valores obtenidos para la determinación del valor de IC₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24 h de la globulina.

Proteína (mg/mL)	Inhibición agregación plaquetaria (%)
0.16	57.0
0.24	62.0
0.32	65.0



Gráfica 5. Regresión lineal para la determinación del valor de IC₅₀ de inhibición de la agregación plaquetaria del hidrolizado de 24 h de la globulina.

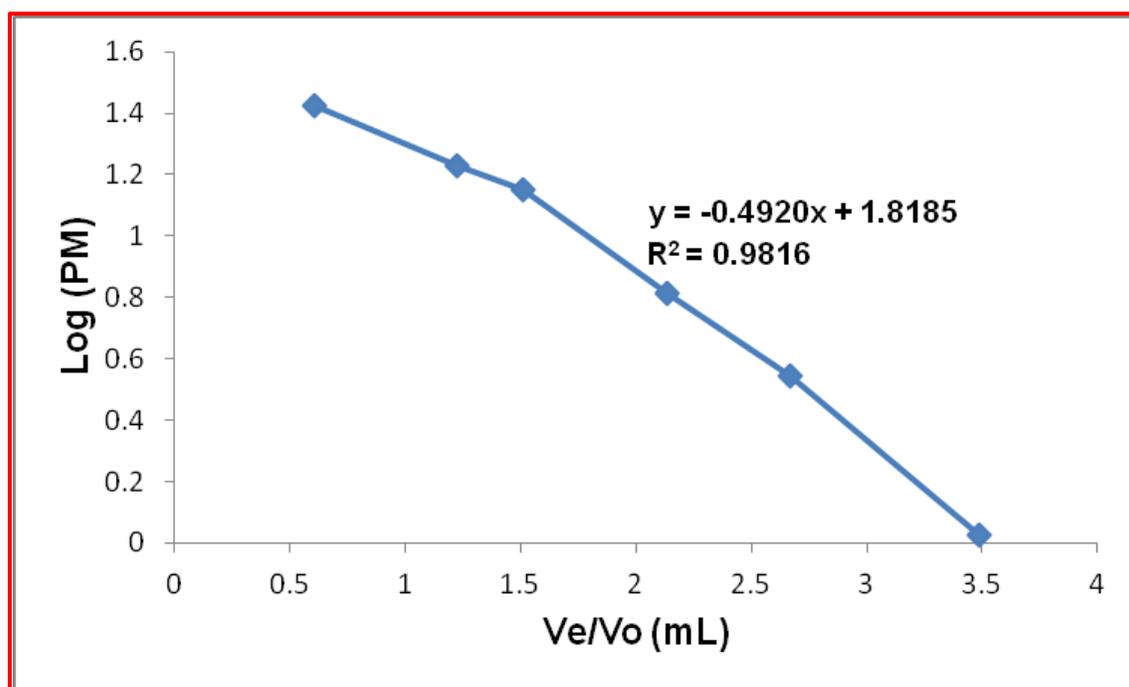
10.8 Curva estándar de marcadores utilizados en gel de Sephadex G-15.

Tabla 42. Valores de los logaritmos de pesos moleculares correspondientes a la curva estándar de marcadores utilizados para la filtración en gel Sephadex G-15.

Proteína	Ve/Vo ^a	Log PM ^b
Triosa-Fosfato-Isomerasa	0.607	1.425
Mioglobina	1.221	1.230
α -Lactato-Albúmina	1.513	1.152
Aprotinina	2.133	0.813
Insulina	2.667	0.544
Bradicinina	3.487	0.025

^a Volumen de elución/Volumen de vacío.

^b Logaritmo del peso molecular.



Gráfica 14. Curva estándar de marcadores para la filtración en gel de Sephadex G-15.

10.9 Perfil de filtración en gel de Sephadex G-15 de los hidrolizados de 24 h de albúmina 1 y globulina.

Tabla 43. Valores obtenidos de los pesos moleculares relativos de las fracciones de la albúmina 1.

No. Fracción	Peso molecular (KDa)
A1	12.6
A2	5.55
A3	2.99
A4	1.61
A5	0.57

Tabla 44. Valores obtenidos de los pesos moleculares relativos de las fracciones de la globulina.

No. Fracción	Peso molecular (KDa)
G1	10.7
G2	5.44
G3	3.87
G4	1.39
G5	0.79

10.10 Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1 y globulina.

Tabla 45. Valores obtenidos del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la albúmina 1.

No. Fracción	Inhibición agregación plaquetaria (%)
A1	*82.48±0.35 ^a
A2	*26.08±0.33 ^a
A3	72.61±0.79 ^a
A4	73.25±0.27 ^a
A5	*75.65±0.27 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 46. Valores obtenidos del porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos de la globulina.

No. Fracción	Inhibición agregación plaquetaria (%)
G1	*19.99±0.23 ^a
G2	*81.28±0.17 ^a
G3	*68.48±0.64 ^a
G4	*76.86±0.37 ^a
G5	*73.69±0.19 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05) .

10.11 Inhibición de la agregación plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 inducido con ADP.

Tabla 47. Valores obtenidos del porcentaje de inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 con ADP.

Péptido	Activación plaquetaria (%)
A1	*62.23±8.51 ^a
G2	*57.86±12.8 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05).

Tabla 48. Valores obtenidos del porcentaje de inhibición plaquetaria de las fracciones de péptidos A1 y G2 con epinefrina.

Péptido	Activación plaquetaria (%)
A1	*43.24±16.0 ^a
G2	*46.34±13.2 ^a

^a Desviación estándar, * Diferencia significativa (p<0.05).

11. BIBLIOGRAFÍA.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of degree of hidrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1256-1262.

Angiolillo, D. J., Capodanno, D., Goto, S. (2010). Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *European Heart Journal*, 17-28.

Argente, H. A., Álvarez, M. E. (2013). *Semiología Médica. Fisiopatología, Semiología y Propedéutica*. México D. F.: Panamericana.

Baetz, B. E., Spinler, S. A. (2008). Dabigatran etexilate: an oral direct thrombin inhibitor for prophylaxis and treatment of thromboembolic diseases. *Pharmacotherapy*, 1354-1373.

Barrio, D. A., Añon, M. C. (2009). Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European Journal of Nutrition*, 73-82.

Becker, R., Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stanford, A. E., Crosjean, O. K., Betschart, A. A., Saunders, R. M. (1981). A compositional study of amaranth grain *Journal of Food Science*, 1175-1180.

Bick, R. L., Murano, G. (1994). Physiology of hemostasis. *Clinics Laboratory Medicine*, 677-707.

Bouhallab, S., Bouglé, D. (2004). Biopeptides of milk: caseinophosphopeptides and mineral bioavailability. *Reproduction Nutrition Development*, 493-498.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254.

Bressani, R. (2003). Amaranth. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 166-173.

Bressani, R. y García-Vela, L. A. (1990). Proteins fraction in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 1205-1209.

Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (2012). *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México D. F.: McGraw-Hill.

Camacho Rubio, F., González Tello, P., Páez Dueñas, M., Márquez Moreno, M. C., Fernández Cuadrado, V. (1993). Hidrólisis de caseína con alcalasa. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 59-70.

Chackalamannil, S. (2006). Thrombin receptor (protease activated receptor-1) antagonists as potent antithrombotic agents with strong antiplatelet effects. *Journal of Medicine Chemistry*, 5389-5403.

Ciprandi, A., Kobe, S., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C. (2006). *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Experimental Parasitology*, 40-46.

Córdova Lizama, A., Ruiz Ruiz, J., Segura Campos, M., Betancur Ancona, D., Chel Guerrero, L. (2013). Actividad antitrombótica y anticariogénica de hidrolizados proteínicos de frijol lima (*Phaseolus lunatus*). *Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias*, 123-137.

De la Peña, A., Baños, A., Izaguirre, R., Mandoki, J. J., Fernández-G, J. M. (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids*, 407-409.

De la Peña, A., Izaguirre, R., Baños, G., Viveros, M., Enriquez, R. G., Fernández, G. S. (2001). Effect of perezone, aminoperezone and their corresponding isomers isoperezone and isoaminoperezone upon in vitro platelet aggregation. *Phytomedicine*, 465-468.

Domínguez-González, K. N., Cruz-Guerrero, A., González-Márquez, H., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., Jiménez-Guzmán, J., Rodríguez-Serrano, G. (2014). Antihypertensive and antithrombotic activities of a commercial fermented milk product made with *Lactobacillus casei shirota* and *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Dairy Technology*, 358-364.

Dziuba, M., Dziuba, B., Iwaniak, A. (2009). Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 71-90.

Fiat, A. M., Migliore-Samour, D., Jollés, P., Drouet, L., Bal dit Sollier, C., Caen, J. (1993). Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *Journal of Dairy Science*, 301-310.

Gachet, C., Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Leray, C., Ohlmann, P., Cazenave, J. P. (1997). Activation of ADP receptors and platelet function. *Thrombosis Haemostasis*, 271-275.

García-Chávez, J., Carrillo-Esper, R., Majluf-Cruz, A. (2007). Fisiología del sistema de coagulación. *Gaceta Médica de México*, 7-9.

Goto S. (2004). Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under blood flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Current Vascular Pharmacology*, 23-32.

Guadix, A., Guadix, E. M., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., Camacho, F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *ARS Pharmaceutica*, 79-89.

Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 163-169.

Heemskerk, J. W., Bevers, E. M., Lindhout, T. (2002). Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*, 186-193.

Hoffman, M., Monroe, D. M. (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis And Haemostasis*, 958-965.

Ibañez, S. M. (2012). *Determinación de la actividad biológica de hidrolizados proteicos de amaranto preparados por acción de una proteasa endógena*. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencia Exactas.

Jollés, P., Lévy-Tokedano, S., Fiat, A. M., Soria, C., Gillssen, D., Thomaidis, A., Dunn, F. W., Caen, J. P. (1986). Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function. *European Journal of Biochemistry*, 379-382.

Jollés, P., Loucheux-Lefebvre, M.H., Henschen, A. (1978). Structural relatedness of kappa-casein and fibrinogen gamma chain. *Journal of molecular Evolution*, 271-277.

Katzung, B.G., Masters, S. B., Trevor, A. J. (2013). *Farmacología básica y clínica*. McGraw-Hill. México D.F. pp 1215.

Konishi, Y., Fumita, Y., Ikeda, K., Okuno, K., Fuwa, H. (1985). Isolation and Characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1453-1459.

Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. (2010). *Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional*. México D.F.: ELSEVIER.

Lijnen, H. R., Collen, D. (1995). Fibrinolytic agents: mechanisms of activity and pharmacology. *Thrombosis and Haemostasis*, 387-390.

Lijnen, H. R., Collen, D. (1997). Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 343-350.

Mackman, N. (2008). Review article triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 914-918.

Majluf-Cruz, A. (2003). La realidad de la prevalencia de la trombosis. *Gaceta Médica de México*, 66-68.

Majluf-Cruz, A., Espinosa-Larrañaga, F. (2007). Fisiopatología de la trombosis. *Gaceta Médica de México*, 11-14.

Markland Jr, F. S., Smith, E. L. (1971). *6 Subtilisins: primary structure, chemical, and physical properties*. 561-608: *The Enzymes*.

Martínez-Murillo, C. (2006). Mecanismo de activación de la coagulación. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 51-58.

Martínez-Murillo, C., Quintana González, S. (2001). *Hemostasia y Trombosis*. Prado. México D. F. 469

Martínez-Murillo, C., Quintana González, S. (2008). *Hemostasia y Trombosis*. Prado. México D. F. 469

Martínez-Murillo, C., Quintana-González, S. (2005). Factores de riesgo para trombosis. *Revista de Hematología*, 1-7.

Martínez-Murillo, C., Quintana-González, S., Ambriz Fernández, R., Hernández Paula, M. (2000). El problema trombótico. *Hematología*, 17-20.

Mazoyer, E., Lévy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat, A. N., Jollés, P., Caen, J. (1990). KRDS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *European Journal of Biochemistry*, 43-49.

Meisel, H. (2001). Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy*, 83-91.

Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 430-443.

Morales, J. A. G., Fernández, A. M. S., Bautista, M. A., Vargas, N.M., Madrigal, E. O. S. (2009). *Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas*. Pachuca, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Orosco Condorí, E. A. (2013). *Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos*. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencia Exactas.

Ortiz-Hernández, A. (2013). *Efecto de biopéptidos antioxidantes derivados de la albúmina 1 del grano de amaranto en el estrés oxidativo ex vivo para piel humana*. México D.F: Universidad Autónoma Metropolitana.

Padhye, V. W., Salunkhe, D. K. (1977). Biochemical studies on black gram (*Phaseolus mungo*): I. Solubilization and electrophoretic characterization of the proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 111-129.

Palomo, G. I., Torres, U. C., Moore Carrasco, R., Alarcón, L. M. (2008). Mecanismos de acción de los principales antiagregantes plaquetarios. *Revista Latinoamericana de Actualidades Biomédicas*, 38-42.

Paredes-López, O. (1994). Biochemistry of amaranth proteins. *Amaranth: biology, chemistry and technology*, 75-107.

Paredes-López, O., Guevara-Lara, F., Bello-Pérez, L. A. (2006). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. *Fondo de cultura económica*, 88-104.

Pearson, T. A., LaCava, J., Weil, H. F. (1997). Epidemiology of thrombotic hemostatic factors and their associations with cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1674-1682.

Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, M., Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Science of Food and Agriculture*, 960-965.

Raghavan, S. A. V., Dikshit, M. (2002). Recent advances in the status and targets of antithrombotic agents. *Drugs of the Future*, 669-683.

Raina, A., Datta, A. (1992). Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proceedings of the National Academy of Science*, 11774-11778.

Rastogi, A., Shukla, S. (2013). Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 109-125.

Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J. P., Jiménez-Guzmán, J., García-Garibay, M. (2012). Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *International dairy Journal*, 147-154.

Rosendaal, F. R. (1997). Thrombosis in the young: epidemiology and risk factors. a focus on venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 1-6.

Rutherford, K. J., Gill, H. S. (2000). Peptides Affecting coagulation. *British Journal of Nutrition*, 99-102.

Sabbione, A. C., Scilingo, A. (2010). *Actividad antitumoral y antitrombótica de proteínas de amaranto modificadas por hidrólisis enzimática*. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencia Exactas.

Schrier, R. W., Abraham, W. T. (1999). Hormones and hemodynamics in heart failure. *New England Journal Medicine*, 577-585.

Segers, K., Dahlbäck, B., Bock, P. E., Tans, G., Rosing, J., Nicolaes, G. A. (2007). The role of thrombin exosites I and II in the activation of human coagulation factor V. *Journal of Biological Chemistry*, 33915-33924.

Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazquez, H., Olguin-Martinez, L. E., Rodriguez-Nester, C., Herrera-Estrella, L. (1992). Characterization Of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L) seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1553-1558.

Silvia-Sánchez, C., Barba De La Rosa, A. P., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., De León-Rodríguez, A., González De Mejía, E. (2008). Bioactive peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1233-1240.

Singhal, R. S., Kulkarni, P. R. (1988). Amaranths-an underutilized resource. *International Journal of Food Science and Tecnology*, 125-139.

Soriano-Santos, J., Iwabuchi, S., Fujimoto, K. (1992). Solubility of amaranth seed proteins in sodium of sulphate and sodium chloride. *International Journal of Food Science and Technology*, 337-346.

Surovtsev, V. I., Fjodorov, T. V., Baydus, A. N., Borozdina, M.A., Gusev, V.V., Chuprunov, V.P. (2001). Use of trinitrophenylation for quantification of protease and peptidase activities. *Biochemistry (Moscow)*, 531-534.

Tabor, A., Blair, R. M. (2009). Beauty from within. *Nutritional Cosmetics*, 584.

Tironi, V. A., Añon, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*, 315-322.

Tovar-Pérez, E. G., Guerrero-Legarreta, I., Farrés-González, A., Soriano-Santos, J. (2009). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*, 437-444.

Vecchi, B., Añon, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 864-870.

Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hidrolisis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chemistry*, 758-764.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 361-365.

Virchow, R. L. K. (1978). Cellular pathology. London, UK: John Churchill.

Vitseva, O., Varghese, S., Chakrabarti, S., Folts, J. D., Freedman, J. E. (2005). Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. *Journal Cardiovascular Pharmacology*, 445-451.

Wang, J. S., Zhao, M. M., Zhao, Q. Z., Bao, Y., Jiang, Y. M. (2007). Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *Journal of Food Science*, 103-107.

Weitz, J. I., Crowther, M. A. (2003). New anticoagulants: current status and future potential. *American Journal Cardiovascular Drugs*, 201-209.

Wootton, D. M., Ku, D. N. (1999). Fluid Mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 299-329.

Wu, K. K., Matijevic-Aleksic, N., (2005). Molecular aspects of thrombosis and antithrombotic drugs. *Critical Reviewa in Clinical Laboratory Sciences*, 249-277.

Xiong, J., Fang, W., Fang, W., Bai, L., Huo, J., Kong, Y., Yunman, L. (2009). Anticoagulant and antithrombotic activity of a new peptide pENW (pGlu-Asn-Trp). *Journal of Pharmacy Pharmacology*, 89-94.

Yang, W. G., Wang, Z., Xu, S. Y. (2007). A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *chinese chemical Letters*, 449-451.

Zhang, S. B., Wang, Z., Xu, S. Y. (2008). Antioxidant and antithrombotic of Rapeseed Peptides. *Journal of the American Oil Chemist Society*, 521-527.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00204

Matrícula: 208381224

EVALUACION DE PEPTIDOS
ANTITROMBOTICOS OBTENIDOS DE
ALBUMINA 1 Y GLOBULINA DEL
GRANO DE AMARANTO
(*Amaranthus hypochondriacus*
L)

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 30 del mes de julio del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ
DRA. MARIA JOSE SERRANO MALDONADO
DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ
DR. HECTOR BERNARDO ESCÁLONA BUENDIA



PEDRO MARTINEZ BAUTISTA
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
DE: PEDRO MARTINEZ BAUTISTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. GERARDO DIAZ GODINEZ

VOCAL

DRA. MARIA JOSE SERRANO MALDONADO

VOCAL

DRA. MARIA DEL CARMEN FAJARDO ORTIZ

SECRETARIO

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA
BUENDIA