

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA BIOQUÍMICA

**“Caracterización bioquímica y evaluación biológica de los
péptidos bioactivos de dos variedades de frijol ayocote
(*Phaseolus coccineus* L.)”**

Tesis

QUE PARA OBTENER

EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

PRESENTA:

M. en C. GERARDO TENIENTE MARTÍNEZ

DIRECTOR:

DRA. AUREA BERNARDINO NICANOR

CO-DIRECTOR:

DRA. MARÍA DEL CARMEN VALADEZ VEGA

Celaya, Gto., México. Abril, 2019





"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

Celaya, Gto., 13/Marzo/2019

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

No. de Oficio PIBQ-01-01-2019

Asunto: Autorización de Impresión Tesis

ING. TERESA SÁNCHEZ PÉREZ
JEFA DEL DEPTO. DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA
PRESENTE.

De acuerdo con la convocatoria hecha por la jefatura a su digno cargo, para que en reunión de los miembros del comité tutorial de la tesis avalada por el Programa del Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica se examinara la tesis titulada

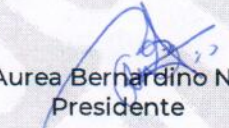
"Caracterización bioquímica y evaluación biológica de los péptidos bioactivos de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus* L.)"


Presentada por el alumno (la) C. M.C. Gerardo Teniente Martínez, con número de control D1503002, Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Después de intercambiar opiniones, los miembros del comité tutorial, manifestaron a **APROBAR Y AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes


ATENTAMENTE


La técnica por un México mejor®

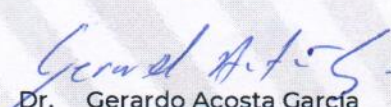
EL COMITÉ TUTORIAL



Dra. Aurea Bernardino Nicanor
Presidente

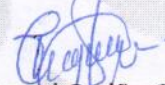

Dra. María del Carmen Valadez Vega
Co-director



Dr. Leopoldo González Cruz
Secretario


SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE CELAYA
POSGRADO ING BIOQUÍMICA


Dr. Gerardo Acosta García
Vocal


Dr. Eloy Conde Barajas
Vocal


Dra. Raquel Carriño Cortés
Asesor Externo


DR. LEOPOLDO GONZÁLEZ CRUZ
COORDINADOR DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TSP/LGC/mgg





DEDICATORIA

A Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desesperar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la fe en mí mismo, ni desfallecer en el intento.

A mis padres Teresa y J. Piedad, por su apoyo, consejos, comprensión, amor y por ayudarme en los momentos difíciles ya que con sabiduría y paciencia han sabido guiarme en toda mi carrera, además de haberme dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y sin lugar a dudas, sin su apoyo hubiera sido imposible lograr este objetivo tan importante en mi vida.

A mis hermanos Gabriela, Cristian y Alejandro, así como a su esposa Refugio, y mis muy queridos sobrinos Yuliana, Alejandro y Andrés, quienes me han mostrado su cariño y apoyo, en todo este trayecto para lograr cumplir todas mis metas.

Muchas gracias.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora y directora de tesis la Dra. Aurea Bernardino Nicanor, por la orientación, apoyo, amistad, confianza y consejos tanto para la vida académica como para la personal, brindada a lo largo del doctorado y de toda mi carrera profesional, ya que esto me permitió forjar el carácter que será fundamental para mi desarrollo como investigador.

Agradezco a mi asesora externa la Dra. María del Carmen Vega Valadez, por haberme dado un cálido recibimiento en mi estancia en ICSa (UAEH), por su apoyo, paciencia y sobre todo por el conocimiento que me brindo y compartió para la realización de este trabajo además de sus consejos y su visión crítica que me permitieron concluir el proyecto.

Agradezco a mi Comité de tesis por sus observaciones y sugerencias en la elaboración y mejora del trabajo, espero que las vean reflejadas en el producto final; empiezo por el Dr. Leopoldo González Cruz por su guía y apoyo, brindados con calidez y confianza en todo momento a lo largo del proyecto además de su sencillez y actitud solidaria para compartir sus conocimientos y experiencias de investigación. Al Dr. Gerardo Acosta García por compartir su tiempo, entusiasmo y conocimientos. Al Dr. Eloy Conde Barrajas por el apoyo y aporte para llevar a cabo la investigación. Ala Dra. Raquel Cariño Cortés, por brindar sus consejos y recomendación tanto en lo académico como en la vida cotidiana.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de alimentos del Tecnológico de Celaya y del laboratorio de Toxicología de la UAEH, MC. Ivette Galván, MC. Jocelyn Hernández, IBQ. Alma Nery Hernández, IBQ. Karla Militza Mendoza a los estudiantes de residencia, Noé Pineda, Oscar y Paloma, también a Karla Anahí, Lorenzo y Oscar Octavio por brindarme su apoyo, consejos, confianza y sobre todo su amistad.

A todos Ustedes
Muchas gracias



El presente trabajo de Doctorado fue realizado en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Celaya (ITC) departamento de Ingeniería Bioquímica y en colaboración con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) en el Instituto de Ciencias de la Salud (ICSa).





ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Capítulo 1 ANTECEDENTES.....	8
1.1. Enfermedades crónico degenerativas.....	8
1.1.1 Hipertensión.....	9
1.1.1.1 El sistema renina-angiotensina.....	10
1.1.2. Cáncer	13
1.1.2.1. Cáncer de mama	14
1.1.2.1.1 Líneas celulares de cáncer de mama	18
1.1.2.2. Cáncer cérvico uterino	21
1.1.2.2.1. Líneas celulares de cáncer cérvico uterino	23
1.1.3. Relación actividad antioxidante-cáncer	24
1.2. El frijol.....	25
1.3 Frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i>).....	30
1.3.1 Frijol ayocote como fuente de compuestos nutraceuticos	32
1.4 Proteínas y péptidos bioactivos	32
1.4.1. Péptidos y cáncer	34
1.4.1.1 Eliminación de compuestos mutagénicos como el Glutión	34
1.4.1.2 Lactoferrina como potenciador de la respuesta inmune	36
1.4.1.3 Inhibidor de Bowman Birk (BBI) como inhibidor de la proliferación de células cancerosas.....	37
1.4.1.4 Lunasina como inhibidor de la acetilación de las histonas	38
JUSTIFICACIÓN.	40
HIPOTESIS.....	41
OBJETIVOS	42
OBJETIVO GENERAL.	42
Objetivos específicos.	42
Capítulo 2 . MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.1. Material vegetal	43



2.2. Obtención de los aislados proteínicos del frijol ayocote	43
2.3. Hidrólisis de los aislados.	43
2.4. Separación de los grupos de péptidos por ultrafiltración	44
2.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	45
2.6 Determinación de la actividad antioxidante.....	46
2.7 Determinación de contenido de fenoles totales	46
2.8 Cultivo Celular	47
2.9 Ensayo de viabilidad y citotoxicidad celular	47
2.9.1 Ensayo MTT.....	48
2.9.2 Ensayo MTT modificado.....	48
2.10 Desarrollo Experimental.....	50
Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1. Material vegetal.	51
3.2. Obtención de los aislados proteínicos del frijol	51
3.3. Hidrólisis enzimática y Porcentaje de Hidrolisis (%H).....	52
3.4. Separación de péptidos mediante ultrafiltración	53
3.5. Actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración sobre la ECA.	54
3.6. Determinación de la Actividad antioxidante	55
3.7. Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)	56
3.8. Evaluación de viabilidad y citotoxicidad de las células expuestas a los grupos de péptidos de frijol morado y frijol negro.	58
3.8.1 Efecto citotóxico de péptido con respecto al tiempo.....	61
3.8.1.1. Efecto sobre células SiHa	61
3.8.1.2. Efecto sobre células MDA	65
3.9 Correlación entre la actividad antioxidante–actividad anticancerígena	69
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA.....	74



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema renina-angiotensina.....	11
Figura 2. Anatomía de las glándulas mamarias humanas.....	14
Figura 3. Cinco tipos de cáncer de mama.....	15
Figura 4. Células mamarias normales hasta la formación de cáncer ductal.	16
Figura 5. Formación del cáncer lobular.....	17
Figura 6. Cáncer inflamatorio.....	18
Figura 7. Tipos de cáncer cérvicouterino.....	22
Figura 8. Tipo de germinación de <i>P. vulgaris</i>	28
Figura 9. Forma y tamaño de la vaina y de la semilla de <i>P.vulgaris</i>	29
Figura 10. Planta y variedades de semilla de Frijol Ayocote (<i>P. coccineus</i>)..	30
Figura 11. Difusión de GSH a través de uniones entre las células cercanas.	35
Figura 12. Mecanismos de acción propuestos para la lactoferrina.	37
Figura 13. Inhibidor de Bowman Birk.....	37
Figura 14. Secuencia y función de la lunasina.....	39
Figura 15. Frijol ayocote.....	51
Figura 16. Viabilidad de las células SiHa a 24 h.....	58
Figura 17. Viabilidad de las células MDA a 24 h.....	59
Figura 18. Viabilidad de las células cancerígenas a 24 h.....	60
Figura 19. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol negro contra las células SiHa.	62
Figura 20. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol morado contra las células SiHa.....	63
Figura 21. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol negro contra las células MDA.....	67
Figura 22. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol morado contra las células MDA.....	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Líneas celulares obtenidas de tejido metastásico	20
Tabla 2. Variedades de frijol y su efecto nutracéutico.....	26
Tabla 3. Compuestos bioactivos del frijol ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i>)... 32	
Tabla 4. Péptidos bioactivos y su efecto benéfico a la salud.....	33
Tabla 5. Comparación del Grado de hidrólisis del frijol ayocote con respecto a otras leguminosas.....	53
Tabla 6. Porcentaje de proteína de las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol Ayocote.	54
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de los grupos de péptidos de ambas variedades.....	55
Tabla 8. Concentraciones del IC ₅₀ de ambas variedades de frijol ayocote, para la actividad antioxidante.....	56
Tabla 9. Determinación de fenoles totales en dos variedades de frijol ayocote, negro y morado.	57
Tabla 10. Valores del IC ₅₀ (µg/mL) de los grupos de péptidos del frijol ayocote de ambas variedades con la prueba MTT en la línea celular SiHa.....	64
Tabla 11. Valores del IC ₅₀ (µg/mL) de los grupos de péptidos del frijol ayocote de ambas variedades con la prueba MTT en la línea celular MDA.....	69
Tabla 12. Comparación de la concentración con mayor actividad anticancerígena (SiHa) con las actividad antihipertensiva y antioxidante.....	70
Tabla 13. Comparación de la concentración con mayor actividad anticancerígena (MDA) con las actividad antihipertensiva y antioxidante	72



RESUMEN

Las enfermedades crónico degenerativas representan la principal causa de muerte en México y el mundo, entre ellas, las de mayor incidencia son el cáncer (de mama y cérvico uterino) y la hipertensión, es por ello, que actualmente se han buscado alternativas para su prevención y tratamiento, siendo el uso de compuestos bioactivos provenientes de fuentes vegetales, un área de interés para lograrlo. Entre los componentes vegetales que han mostrado mayor bioactividad se encuentra las proteínas, específicamente los péptidos que pueden ser obtenidos por medio de hidrólisis enzimática, química o física. Entre los péptidos que han mostrado propiedades para prevención o tratamiento de enfermedades crónico degenerativas se encuentran los péptidos obtenidos de las leguminosas, en particular aquellas provenientes del género *Phaseolus*, siendo el Frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*), una variedad promisorio para dicho efecto, es por ello que el objetivo del presente trabajo fue; evaluar el efecto antioxidante, antihipertensivo y anticancerígeno de los péptidos bioactivos de las dos variedades de frijol ayocote, para lo cual, se obtuvieron grupos de péptidos de diferente peso molecular a partir de la hidrólisis enzimática de la proteína de 2 variedades de frijol ayocote (negro y morado), y se determinó su potencial antihipertensivo por medio de la actividad sobre la enzima ECA, antioxidante por DPPH y anticancerígeno sobre células SiHa y MDA. Los resultados obtenidos indican que los grupos de péptidos mayores a 30, ≤ 30 kDa y ≤ 10 kDa del frijol morado presentan mayor actividad antioxidante mientras que los grupos de péptidos ≤ 10 kDa y ≤ 5 kDa del frijol negro fueron los que presentaron la mayor actividad antihipertensiva. Por otra parte, los grupos de péptidos que mostraron mayor actividad anti proliferativa sobre la línea celular SiHa fueron los >30 kDa para ambas variedades de frijol, mientras que para la línea celular MDA el mayor efecto fue producido por los grupos de péptidos ≤ 30 kDa de frijol negro a la concentración mayor (5000 mg/mL). Se encontró que existe correlación entre la actividad antioxidante y la capacidad anticancerígena.



INTRODUCCIÓN

El frijol es una de las leguminosas más consumida en México y el mundo, en nuestro país gran parte de la producción se destina al consumo humano (Secretaría de Economía, 2012). Recientemente se ha prestado atención al frijol, por sus características nutricionales y nutraceuticas, ya que se ha demostrado su capacidad para prevenir o reducir enfermedades crónicas degenerativas (Paredes y Valverde, 2006; Figueroa *et al.*, 2010), principalmente la hipertensión y el cáncer, enfermedades de mayor impacto no solo en nuestro país sino en el mundo.

La hipertensión es una enfermedad que se caracteriza por un incremento continuo de la presión sanguínea por arriba de los límites (120/80 mm Hg) lo que aumenta el riesgo de riesgos cardiovasculares, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal (Giraldo *et al.*, 2013), se puede clasificar en hipertensión primaria o esencial (responsable del 90-95% de los casos) e hipertensión secundaria (afecta al 5-10% de los pacientes y se produce por factores metabólicos) (Oparil *et al.*, 2003; García-Mora, 2016).

El cáncer, por su parte, es originado por alteraciones en la información genética, las cuales son resultado de mutaciones en la estructura de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo cual, la secuencia de bases nitrogenadas alteradas es transmitida a la otra generación celular, provocando una división celular continua de forma autónoma, invadiendo e interfiriendo en la función de los tejidos (Trossero *et al.*, 2006).

En investigaciones recientes se han utilizado proteínas, péptidos y aminoácidos de diferentes fuentes alimentarias para la prevención y tratamiento tanto de la hipertensión (Oparil *et al.*, 2003) como de distintos tipos de cáncer (García-Mora, 2016). Es por ello, que el presente trabajo se enfocó a determinar la capacidad antihipertensiva, antioxidante y anticancerígena de grupos de péptidos de diferente peso molecular, obtenidos a partir de la hidólisis enzimática de las proteínas del frijol negro y morado.



Capítulo 1 ANTECEDENTES.

1.1. Enfermedades crónico degenerativas

Las enfermedades se pueden clasificar como simples y complejas, las primeras son aquellas que, generalmente son resultado de alteraciones recientes, sin modificar amplia o sustancialmente la fisiología del organismo. Por ejemplo, la apendicitis la cual, a pesar de ser una enfermedad grave y que en poco tiempo puede matar a una persona, con una intervención quirúrgica relativamente simple se resuelve el problema y después del procedimiento aparentemente la fisiología se recupera *ad integrum* (González-González *et al.*, 2015).

Mientras que, las enfermedades complejas entre las que se encuentran las enfermedades crónico-degenerativas, son aquellas que producen una serie de alteraciones fisiopatológicas amplias, complejas y profundas que contribuyen a la mortalidad mediante un pequeño número de acontecimientos fisiológicos (Córdova-Villalobos *et al.*, 2008) y se caracterizan por que casi siempre son el resultado de una predisposición genética compleja (pueden participar una gran cantidad de genes), en combinación con factores ambientales y adquiridos, propicios para el desarrollo de una o varias alteraciones patológicas. Dichas alteraciones se reflejan como producción excesiva, disminuida y/o modificaciones estructurales y funcionales de varias biomoléculas, pueden alterar en mayor o menor grado la mayoría de los tejidos y órganos a su vez con las cascadas de desregulación, además alteran la comunicación biológica intra e intercelular (González-González *et al.*, 2015). Hasta el momento, no hay solución terapéutica total ni definitiva para dichas enfermedades, ya que tienden a ser de carácter crónico y progresivo. Es por ello que son uno de los mayores retos que enfrenta el sistema de salud. Lo son por varias razones; el gran número de casos afectados, su creciente contribución a la mortalidad general y el costo elevado de su tratamiento (Bodenheimer *et al.*, 2002; Rivera *et al.*, 2004; González-Pier *et al.*, 2007). Entre estas enfermedades, las más comunes son; la hipertensión, el cáncer, la diabetes mellitus, las enfermedades respiratorias crónicas, entre otras; las cuales están directamente relacionadas



principalmente a la predisposición genética, así como al estilo de vida, siendo el sedentarismo en conjunto con el tabaquismo y la dieta desequilibrada, los principales factores de riesgo responsables de su desarrollo, y de casi el 60% de las muertes en el mundo y del 46% de las enfermedades mundiales (Gómez *et al.*, 2010).

1.1.1 Hipertensión

Es una de las principales causas de la aparición de riesgos cardiovasculares, cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal (Giraldo *et al.*, 2013). Se caracteriza por un incremento crónico de la presión de la sangre proveniente del corazón contra las paredes de los vasos sanguíneos (García-Mora 2016), provocando daños sobre las arterias y en diversos conglomerados de células, de igual diámetro formando meatos entre sí que pueden elaborar y almacenar sustancias, en especial en el corazón, cerebro, riñón y retina cuyo daño es proporcional tanto a la magnitud como a la duración de la hipertensión (Guevara-Valderrama, 2016).

La presión arterial tiene dos componentes: presión arterial sistólica que corresponde al valor máximo de la tensión arterial en sístole (cuando el corazón se contrae) y presión arterial diastólica que corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está en diástole (entre latidos cardíacos). La hipertensión se caracteriza por una sístole igual o superior a 140 mm Hg y una diástole igual o superior a 90 mm Hg (García-Mora, 2016).

Según su causa, la hipertensión se puede clasificar en hipertensión primaria o esencial e hipertensión secundaria. La hipertensión primaria es responsable del 90-95% de los casos diagnosticados siendo los factores genéticos, socioeconómicos y conductuales claves en su desarrollo (Oparil *et al.*, 2003). La secundaria solamente afecta al 5-10% de los pacientes hipertensos y, aunque en ocasiones tiene una base genética, en la mayoría de los casos se produce como consecuencia de la existencia de factores metabólicos como diabetes, hipercolesterolemia, sobrepeso y obesidad (García-Mora, 2016).



Los tratamientos para la hipertensión arterial se basan en la inhibición farmacológica del Sistema Renina Angiotensina en tres puntos: Enzima Convertidora de Angiotensina I, acción directa de la Angiotensina II y renina (Castillo-Yam *et al.*, 2013).

1.1.1.1 El sistema renina-angiotensina

Es un sistema hormonal que ayuda a regular el volumen extracelular corporal y la presión sanguínea pero, en ocasiones, la desregulación de este sistema o su persistente activación puede provocar un aumento crónico de la presión sanguínea y daños de órganos diana (Crowley y Coffman, 2012). Aunque la renina por sí sola no produce la elevación de la presión sanguínea, es capaz de iniciar la cascada enzimática por la que se produce un potente péptido vasoconstrictor denominado angiotensina II. La renina es una aspartil proteasa sintetizada en las células yuxtaglomerulares (células granulares) del riñón que es liberada al torrente sanguíneo cuando se produce un aumento de la osmolaridad del plasma o una disminución del flujo sanguíneo en el riñón (Crowley y Coffman, 2012). La renina cataliza la hidrólisis del angiotensinógeno (Sielecki *et al.*, 1989), una glucoproteína sintetizada en el hígado, produciendo angiotensina I. Éste, es hidrolizado por la enzima convertidora de angiotensina I (ECA), produciendo angiotensina II, un potente péptido vasoconstrictor. La ECA, además, hidroliza la bradiquinina, péptido que presenta un potente efecto hipotensor, a péptidos inactivos (**Figura 1**), (García-Mora, 2016).

Paralelamente, la ECA estimula la activación de la aldosterona, una enzima segregada por la glándula suprarrenal que produce la reabsorción de sodio en las células de los túbulos distales y de los túbulos colectores corticales, induciendo la secreción de potasio y la reabsorción de sodio produciendo, consecuentemente, un aumento de la presión sanguínea (Hall *et al.*, 2012). Se ha demostrado, que los pacientes hipertensos presentan niveles más elevados de aldosterona en orina que los normotensos (García-Mora, 2016).



La angiotensina II ejerce su función fisiológica a través de su unión a dos subclases de receptores específicos de membrana (AT1 y AT2) (Peters, 1995). El receptor AT1 media la mayoría de acciones de la angiotensina II, entre las que destacan la vasoconstricción, la activación de la proliferación celular y la liberación de aldosterona y vasopresión produciendo, consecuentemente, la activación del sistema nervioso simpático (Banday and Lokhandwala, 2008).

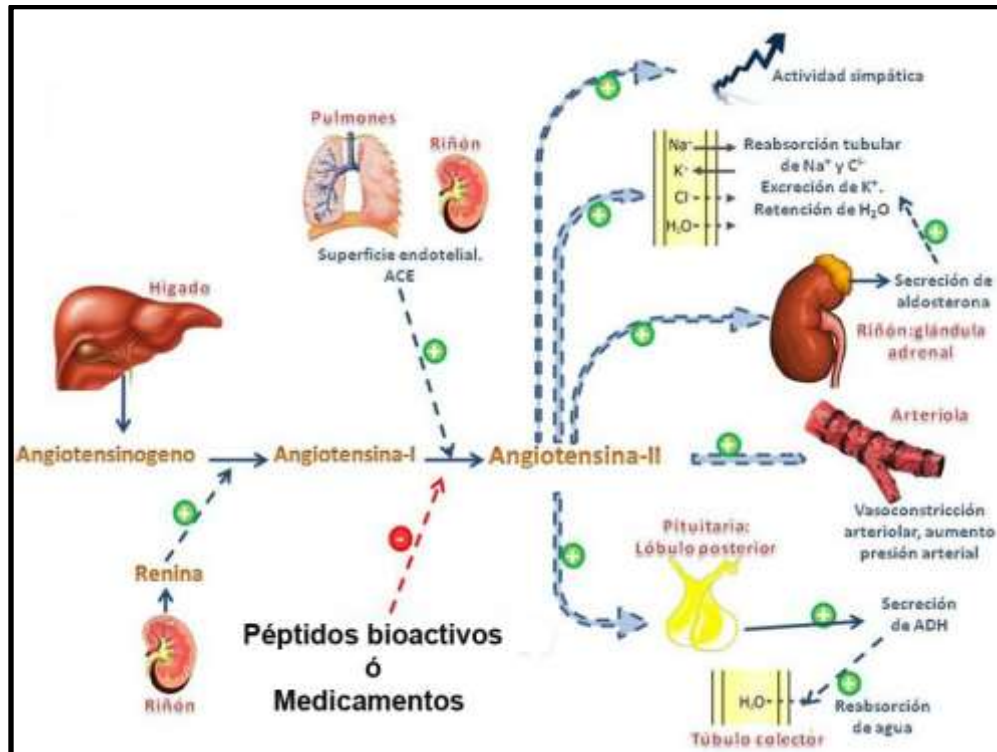


Figura 1. Sistema renina-angiotensina (Modificado de Campón-Sánchez, 2010).

En lo que respecta al receptor AT2, se encuentra codificado en el cromosoma X y se expresa de manera predominante durante la etapa fetal. Por el contrario, en la etapa adulta, la expresión de este receptor es mínima y solo se incrementa ante situaciones de estrés y daño tisular (Carey y Padia, 2008). Fisiológicamente, los efectos del receptor AT2 son contrarios a los del receptor AT1, es decir, inhiben la proliferación celular, promueven la apoptosis, producen vasodilatación e intervienen en el desarrollo fetal y en la diferenciación tisular (Oparil *et al.*, 2003).



Por otra parte, en las células del endotelio vascular, en el corazón y riñones se ha identificado una enzima homóloga a la ECA, conocida como ECA2 (Crackower *et al.*, 2002). Se trata de una monocarboxil peptidasa que presenta afinidad por la angiotensina I, angiotensina II y bradiquinina (Gurley and Coffman, 2008). La ECA2 cataliza la hidrólisis de angiotensina II por su extremo del carbono terminal, dando lugar a la formación del péptido angiotensina 1-7 que es biológicamente activo y produce un incremento de la concentración de óxido nítrico y bradiquinina y de la síntesis de prostaglandinas, por lo que es capaz de reducir la presión sanguínea (Rosivall, 2009). Diferentes estudios en ratas hipertensas sugieren que la disminución de los niveles de ECA2 origina graves problemas de la contractilidad cardíaca, y aumento de la angiotensina II, por lo que se considera una enzima crucial en la regulación de las funciones cardíacas (Crackower *et al.*, 2002).

Debido al importante papel que juega la ECA en la regulación de la presión sanguínea, el empleo de inhibidores de esta enzima es una estrategia valiosa para prevenir y controlar la hipertensión (Pacurari *et al.*, 2014). Los inhibidores sintéticos se unen al centro activo de la enzima evitando así la unión del sustrato.

Las técnicas de espectroscopía de absorción electrónica han demostrado que el mecanismo por el que los péptidos inhiben la ECA está relacionado con la reducción de las láminas- β y hélices- α que conforman la estructura secundaria de la enzima (He *et al.*, 2014). La inhibición de la ECA provoca el bloqueo de la hidrólisis de angiotensina I a angiotensina II y el aumento de la biodisponibilidad de la bradiquinina (Tousoulis *et al.*, 2012).

Actualmente, existen en el mercado una amplia variedad de fármacos sintéticos que ejercen su acción interactuando con el grupo zinc que la ECA contiene en su centro activo. Los más usados hasta el momento son: Benazepril, Captopril, Enalapril, Fosinopril, Lisinopril, Moexipril, Perindopril, Quinapril, Ramipril y Trandolapril (Sweitzer, 2003). A pesar de su eficacia en la reducción de la presión sanguínea, estos fármacos pueden provocar reacciones adversas en algunos pacientes. El efecto secundario más común de dichos fármacos es la tos seca, que afecta aproximadamente a un 15% de los pacientes tratados. La hinchazón causada por una pequeña fuga de sangre en los vasos sanguíneos es otro de los posibles



efectos adversos que ocurre en 0,1-0,5% de los casos (Riordan, 2003). Además, se ha comprobado que en pacientes con colesterol o que presentan diabetes, el tratamiento con inhibidores de la ECA puede ocasionar disfunción renal (Sweitzer, 2003). Es por ello que una alternativa al consumo de fármacos que puede ayudar a prevenir la hipertensión son los péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ECA ya que tienen una baja incidencia de efectos adversos. Estos péptidos bioactivos se obtienen mediante tratamientos enzimáticos de proteínas alimentarias y pueden ser introducidos en la dieta como ingredientes en alimentos funcionales (García-Mora, 2016).

1.1.2. Cáncer

El cáncer es una de las principales enfermedades crónicas degenerativas de mayor incidencia en el mundo. En 2018 se estimaron 18.1 millones de nuevos casos nuevos y 9.6 millones de muertes por cáncer en todo el mundo. El riesgo acumulado de incidencia, indica que 1 de cada 8 hombres y 1 de cada 10 mujeres desarrollarán la enfermedad (Bray *et al.*, 2018).

EL cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento anormal y diseminado de células que, al desarrollarse en forma incontrolada, avanzan entre los tejidos normales y los destruyen, alterándose así el funcionamiento del organismo, se inicia casi siempre como una enfermedad localizada (Escandón *et al.*, 1992), tiene origen multifactorial y su desarrollo depende de la interacción de los genes del organismo con el medio ambiente, aun cuando existen cánceres de tipo hereditario, es decir aquellos donde la genética del paciente es el principal determinante de su desarrollo, la mayor parte de las tumoraciones es de tipo esporádico, esto es, se origina a partir de cambios genéticos somáticos de *novo*, promovidos por la exposición a agentes carcinógenos ambientales (Fuentes-Panán *et al.*, 2009).

Los órganos que se ha demostrado ser más susceptibles a ser atacados por ésta enfermedad son el pulmón, estómago, hígado, colon, próstata, mamá y cérvix, éstos dos últimos representan las mayores problemáticas de salud en nuestro país y a



pesar de los avances en las pruebas de detección y tratamiento durante las últimas décadas, muchas mujeres nunca se han realizado una mamografía o un frotis de Papanicolaou, o no se examinan regularmente (Austin *et al.*, 2002; Gospodarowicz *et al.*, 2009; Campero *et al.*, 2014.). De acuerdo a las estadísticas actuales se reconoce que en México las principales neoplasias causantes de mortalidad, principalmente en la población femenina fueron cáncer de mama con un 15.3% y en segundo lugar el cáncer cérvicouterino con un 10.4% (Reynoso-Noverón y Torres-Domínguez, 2018).

1.1.2.1. Cáncer de mama

Este tipo de cáncer es multifactorial dependiente de hormonas con una clara relación positiva a las altas concentraciones endógenas de estrógeno (Hankinson and Hunter, 2002), se caracteriza por una proliferación descontrolada de células epiteliales que revisten los conductos o lobulillos mamarios (Dickson and Lippman, 2001).

Las mamas, están formadas por tejido glandular (tejido conectivo), tejido adiposo (70 al 80 % del peso total de la mama), tejido de sostén (donde se encuentran las glándulas productoras de leche o lobulillos, conductos, vasos sanguíneos y linfáticos (**Figura 2**))

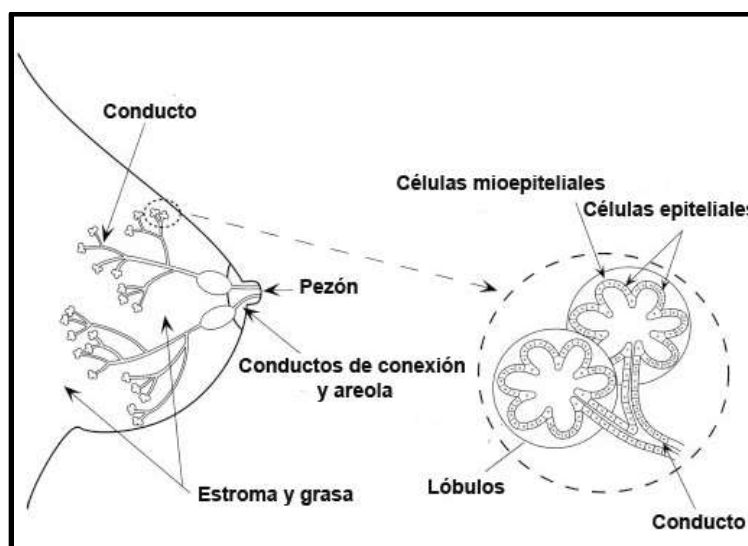


Figura 2. Anatomía de las glándulas mamarias humanas (Hondermarck, 2003).



Los conductos linfáticos transportan el líquido linfático cuyo contenido principal son proteínas y células del sistema inmunológico las cuales son llevadas a los ganglios linfáticos axilares ubicados sobre la clavícula y otros lo conducen a los ganglios mamaros internos ubicados cerca del esternón (Dickson and Lippman, 2001; Muñoz-Islas, 2010).

Estudios recientes sugieren que el cáncer de mama no es una enfermedad homogénea, sino que consta de al menos 5 subtipos moleculares distintos (**Figura 3**) con diferentes opciones de tratamiento y pronósticos (Sims *et al.*, 2007).

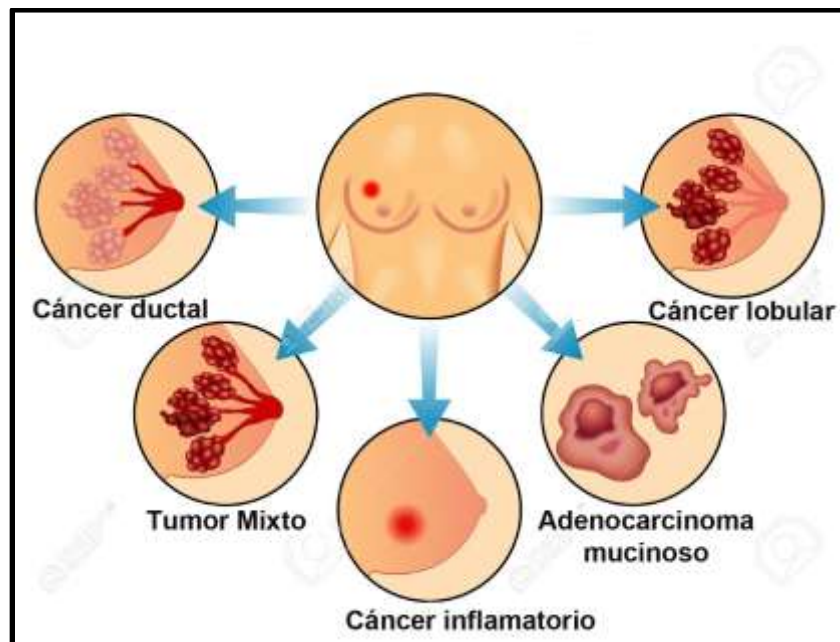


Figura 3. Cinco tipos de cáncer de mama

- a) **Carcinoma ductual**; el cual puede ser de dos tipos; invasivo y no invasivo; el primero representa el 75% de todos los cánceres de mama y se caracteriza por comenzar en las células que revisten un conducto de leche en el seno, sobrepasa la pared del conducto, e invade los tejidos mamaros cercanos, en este punto puede tener la capacidad de propagarse (hacer metástasis) hacia otras partes del cuerpo a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo. Por su parte, el carcinoma no invasivo o ductal *in situ* (CDIS), tiene la



característica de ser preinvasivo y se localiza en las células que revisten los conductos cuando han cambiado a células cancerosas, pero no se han propagado a través de las paredes de los conductos al tejido cercano del seno, sin embargo, éste puede llegar a convertirse en invasivo con el tiempo. Por lo cual, el cáncer de mama puede generar un carcinoma ductal (**Figura 4**) el cual comienza en los conductos que mueven la leche del seno al pezón (Hirshaut and Pressman, 1996; Manoharan and Pugalendhi, 2010; ACS, 2017).

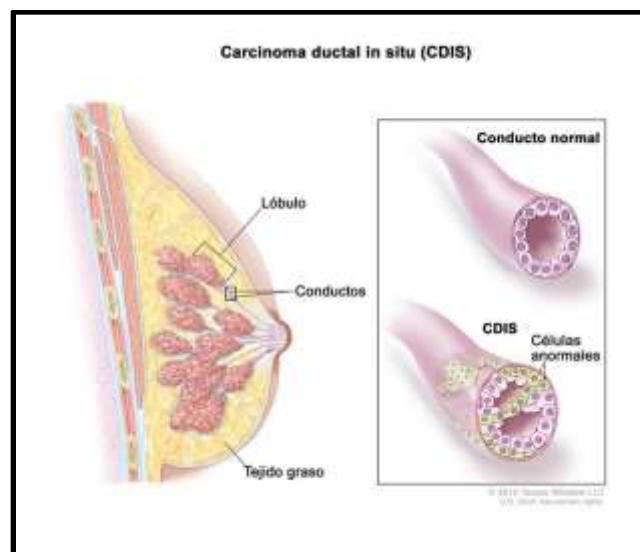


Figura 4. Células mamarias normales hasta la formación de cáncer ductal (INC, 2015).

- b) **El carcinoma lobular** comienza en las partes del seno, llamadas lóbulos que producen leche (**Figura 5**) y al igual que el carcinoma ductal puede ser invasivo y no invasivo, el primero representan del 5% al 10% de todos los cánceres de mama, con la característica de que puede penetrar en la membrana que rodea los lóbulos o conductos. Mientras que carcinoma no invasivo o *in situ*, se caracteriza por que las células cancerosas crecen en las glándulas productoras de leche del seno (llamados lobulillos), pero no atraviesan la pared de los lobulillos, generalmente, se presenta en mujeres que no están en la etapa de la menopausia (Hirshaut and Pressman, 1996; Manoharan and Pugalendhi, 2010; ACS, 2017).

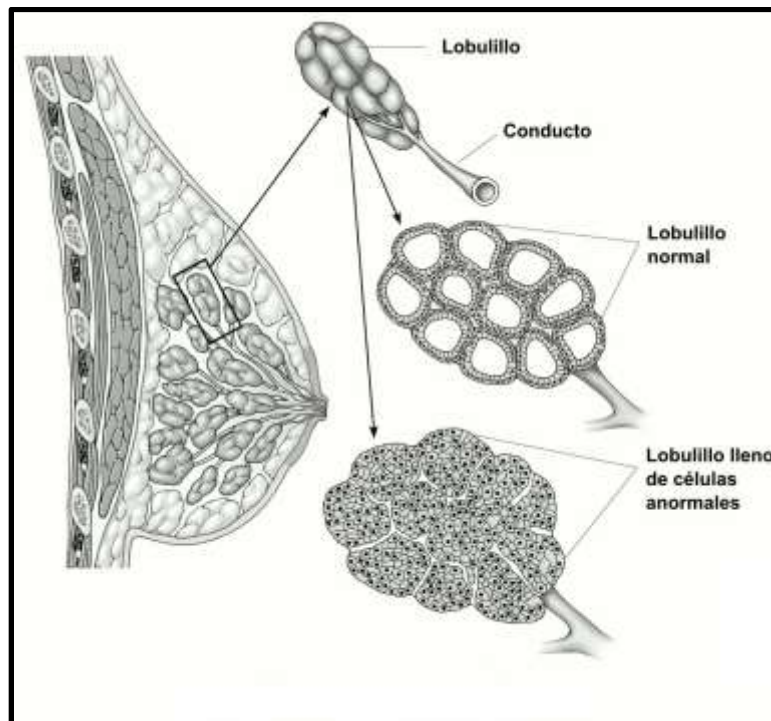


Figura 5. Formación del cáncer lobular (Modificada de ACS, 2017)

c) **El carcinoma inflamatorio** es un tipo de carcinoma muy serio y de rápida propagación que representa aproximadamente el 1% de todos los cánceres de mama (Manoharan and Pugalendhi, 2010). Se caracteriza por presentar una coloración rojiza en la mama que puede variar desde un tono leve hasta rojo intenso, se extiende difusamente sobre el seno, el cual se vuelve picado, y edematoso, presentándose en apariencia como la piel de la naranja, mientras tanto el cáncer se expande rápidamente por el seno como una induración difusa. El tamaño de la mama puede aumentar hasta tres veces más su tamaño original, en el transcurso de pocas semanas (Monge-Castro *et al.*, 2013) (**Figura 6**)

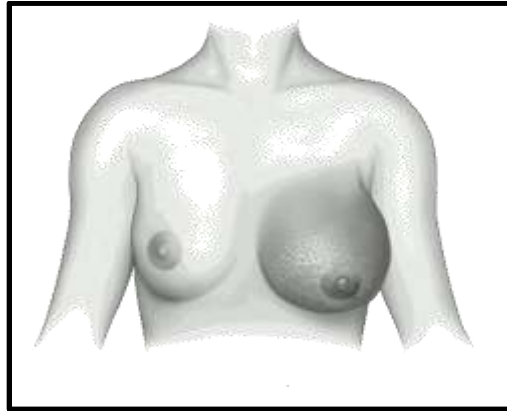


Figura 6. Cáncer inflamatorio (Modificada de ACS, 2017).

- d) **El adenocarcinoma mucinoso** de la mama, representa un tipo histológico bien diferenciado del adenocarcinoma ductal invasivo, se caracteriza por la producción de mucosidad en cantidad variable. La presencia de la mucosidad indica la naturaleza menos agresiva del tumor que, además, actúa como barrera mecánica para impedir la invasión celular en los márgenes (Ortega *et al.*, 2003)
- e) **Tumor mixto** se caracteriza por contener una combinación de células ductales y lobulares cancerosas. Este tipo de cáncer también se denomina cáncer de mama invasivo o carcinoma mamario infiltrante, sin embargo, se trata como un carcinoma ductal (ACS, 2017).

1.1.2.1.1 Líneas celulares de cáncer de mama

Para la investigación del cáncer de mama humano se dispone de una amplia variedad de líneas celulares obtenidas principalmente de pacientes. Aunque ciertos investigadores cultivan líneas propias no comercializadas. Se dispone de información de 33 de estas líneas, 22 de ellas aisladas en la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, Maryland) y 11 en el *Arizona Cancer Center, College of Medicine* de la Universidad de Arizona (Tucson, Arizona). Alrededor de un 85% de ellas son derivadas de carcinomas intraductales. El resto deriva de carcinomas ductales con componente papilar, medular o lobular, una línea celular de



Cystosarcoma phyllodes y 4 líneas celulares de tejido normal de mama (Hay et al., 1994; Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003).

Una primera gran clasificación se basa en la separación de la línea celular del tumor primario o bien de una fase de metástasis. Cultivos a corto plazo de tejidos cancerosos procedentes de cánceres de mama humano son relativamente fáciles de obtener utilizando varios medios (Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003); sin embargo, el mantener estas células el tiempo suficiente para obtener alguna línea celular inmortal es realmente difícil, ya que ello obedece a un hecho fortuito y ocasional tras múltiples intentos de cultivo más o menos prolongados en diferentes medios, es por ello que las células inmortales se obtienen de tumores primarios avanzados cuando ya se ha producido la metástasis, al menos a ganglios linfáticos (Smith *et al.*, 1987; Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003).

Las líneas celulares obtenidas de tejido mamario primario pueden ser de diferentes tipos histológicos las más frecuentes son:

- 1) Líneas celulares de carcinoma intraductal: en cultivo forman cúmulos o colonias de células epiteliales muy compactos en los cuales es difícil visualizar la estructura interna de las células. Son células con núcleo de gran tamaño, una relación núcleo/citoplasma elevada y presentan varios nucleolos. Generalmente no forman una completa monocapa.
- 2) Líneas celulares de carcinoma ductal con componente papilar: sólo una línea celular (BT-549) ha sido aislada de tejido canceroso primario tipificado como carcinoma papilar intraductal. Forma monocapa en cultivo.
- 3) Líneas celulares de carcinoma ductal con componente medular.
- 4) Tipos histológicos menos frecuentes.

Las líneas celulares obtenidas de tejido metastásico (**Tabla 1**) son bastante más fáciles de obtener que en el caso de los tumores primarios, especialmente cuando las metástasis son a líquido pleural, y en general son mucho más heterogéneas que las obtenidas del tumor primario. Se clasifican en función a la localización metastásica a partir de la cual han sido aisladas (Hay et al., 1994; Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003).



Tabla 1. Líneas celulares obtenidas de tejido metastásico

Metástasis a líquido pleural	Metástasis a líquido ascítico
De carcinoma intraductal MCF-7, MDA-MB-134VI, MDA-MB-415, MDA-MB-435s, T47D, ZR-75-27, MDA-MB-468, EFM-19, EP, MW, 600 PE, 21-MT-1, 21MT-2, MFM-223, VACC-245, VACC-265, VAVV-1179	De carcinoma intraductal ZR-75-1, ZR-75-30
De carcinoma papilar MDA-MB-175VII, DMC-42	
De adenocarcinoma SK-BR-3, MDA-MB-436, MDA-MB-453	
De carcinoma medular MDA-MB-231	
De carcinoma lobular MDA-MB-330	

Fuente: Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003

Es de destacar la utilización de células primarias senescentes del epitelio mamario, como las HMEC (*human mammary epithelial cells*), que generalmente se utilizan como control cuando se estudia alguna de las líneas referenciadas. A pesar de la dificultad para obtener líneas celulares mamarias, se ha podido enumerar una lista importante, pero se debe tener en cuenta que han sido aisladas a lo largo de muchos años, desde 1958 en que Lasfargues y Ozzello aíslan la línea BT-208 hasta 1992 en que Leibovitz y Massey aíslan la UACC-11799. De todas estas líneas, sólo algunas han sido profundamente investigadas desde el punto de vista de su dependencia hormonal, de los receptores de membrana para diferentes factores de crecimiento, de la acción mitogénica o antimitogénica de éstos, etc. Cuando es de interés estudiar células cancerosas hormonodependientes, la línea celular más



utilizada es MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation*), mientras que uno de los prototipos más utilizados para el estudio de células hormonoindependientes es MDA-MB-231 (*M.D. Anderson - Main Building - 231*), y más recientemente MDA-MB-468 (*M.D. Anderson - Main Building - 468*) (Martínez-Carpio y Navarro-Moreno, 2003).

1.1.2.2. Cáncer cérvico uterino

El cáncer cérvicouterino (CaCu) incluye las neoplasias malignas que se desarrollan en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina. Su aparición está determinada por la existencia de algunas lesiones cervicales consideradas con poder carcinogénico y por tanto preinvasoras (Martínez-Pinillo *et al.*, 2010; Espín-Falcón *et al.*, 2012).

Se pueden identificar 4 diferentes subtipos:

- a. **Carcinoma de las células escamosas**, que se origina a expensas del epitelio pavimentoso, es el más frecuente (aproximadamente 80 % de los casos): El precursor inmediato de este carcinoma son las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado.
- b. **Adenocarcinoma cervical**, que constituye el 15 % de los casos y se desarrolla a partir de lesiones precursoras denominadas adenocarcinoma *in situ*, surgen en el endocérvix, el subtipo más frecuentemente encontrado en el cuello uterino es el adenocarcinoma mucinoso de tipo endocervical. Estos tumores pueden infiltrar de manera profunda hacia el estroma del cérvix, algunas veces con extensión parametrial y metástasis a ganglios.
- c. **Carcinomas adenoescamosos y neuroendocrinos**, constituyen el 5 %, el adenoescamoso está conformado por un componente glandular y un componente escamoso, ambos mutados, ocupando aproximadamente la tercera parte de los carcinomas cervicales con diferenciación glandular. Mientras que el neuroendócrino, posee áreas con características



citonucleares de un carcinoide, con células que contienen gránulos neuroendócrinos intracitoplasmáticos y es semejante al carcinoide intestinal.

Todos los tipos de tumores (**Figura 7**), indicados presentan las mismas características clínicas y factores de riesgo (Espín-Falcón *et al.*, 2012)

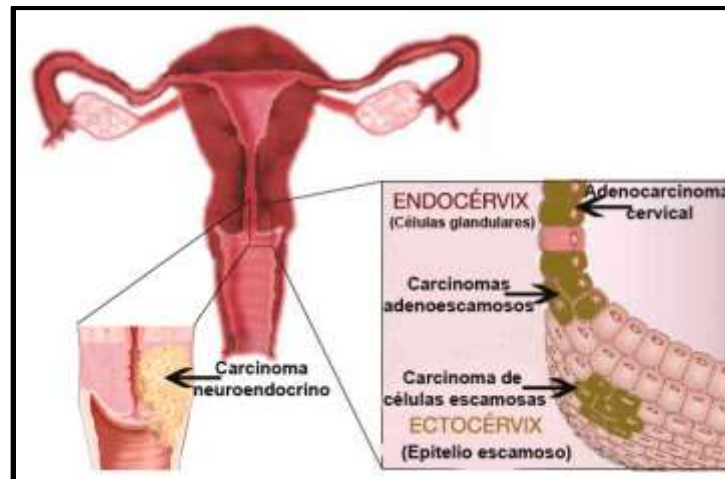


Figura 7. Tipos de cáncer cervicouterino.

Se ha encontrado, el 99,8% de los casos de cáncer del cuello uterino, se deben a tipos específicos de un virus tumoral transmitido por vía sexual, que se denomina virus del papiloma humano (VPH), de éstas el 30.3% corresponde al subtipo HPV-16, 8.2% al subtipo HPV-18, 4.8% al subtipo HPV-31 y 3.9% al subtipo HPV-45. (Bosch *et al.*, 2002). El enlace entre el CaCu y el VPH fue demostrado a principios de los años 80's por el doctor Harald zur Hausen y la infección es un requisito necesario para el desarrollo de esta enfermedad (López-Saavedra y Lizano-Soberón, 2006).

El CaCu de células escamosas es el más común, mientras que el 10 % de los casos son de origen glandular, es decir adenocarcinoma. Este también contiene VPH pero la correlación es menos pronunciada y es dependiente de la edad. Cerca del 50% de las mujeres con adenocarcinoma *in situ*, tienen también neoplasia intraepitelial cervical y es a menudo encontrado en pacientes que han sido operados por carcinoma escamoso (Walboomers *et al.*, 1999).



El adenocarcinoma invasor puede ser puro o mezclado con carcinoma de células escamosas, con lo que se denomina carcinoma adenoescamoso. La incidencia de estos cánceres aumenta en los países desarrollados sobre todo en mujeres jóvenes (López–Saavedra y Lizano-Soberón, 2006). Es por ello que es muy importante el diagnóstico oportuno ya que durante los primeros estadios esta enfermedad puede ser tratada con éxito, aunque en teoría es una enfermedad prevenible, actualmente se le considera como un problema de salud pública (Flores *et al.*, 2003).

1.1.2.2.1. Líneas celulares de cáncer cérvico uterino

Las distintas líneas celulares de cáncer cérvicouterino son dependientes del virus del papiloma humana (VPH) y de algunas proteínas asociadas, tales como las proteínas E6 y E7, las cuales actúan como oncoproteínas virales, además de ser las responsables de perturbar el control del ciclo celular y de iniciar la serie de alteraciones asociadas con la transformación celular. La primera indicación del papel en carcinogénesis de éstas proteínas surgió de las líneas celulares derivadas de cáncer cervical SiHa y CaSki, en las cuales, el ADN del VPH está integrado aleatoriamente en el genoma de la célula. Por otra parte, se sabe que durante la integración del ADN del VPH en la célula, puede perderse o inclusive alterar algunos de sus genes, excepto los genes E6 y E7, los cuales se transcriben activamente. Por lo que, las proteínas E6 y E7 interfieren activamente en el ciclo celular, apoptosis y mantenimiento de la estabilidad cromosomal al interactuar con las proteínas supresoras de tumores p53 y pRB, respectivamente (Tommasino *et al.*, 2003; Sekaric *et al.*, 2008; Tungteakkhun and Duerksen-Hughes, 2008; Ghittoni *et al.*, 2010; Tungteakkhun *et al.*, 2010).

Las líneas celulares HeLa, C4-I y SW756 contienen ADN de VPH 18 amplificado aproximadamente de 10 a 50 veces junto con las secuencias celulares flanqueantes, mientras que las células SiHa y C4-I contienen una única copia integrada de ADN de VPH 16 y 18, respectivamente. En estas líneas celulares y en la mayoría de los carcinomas genitales positivos al VPH, uno de los puntos de apertura para la integración viral se encuentra en la región temprana del genoma



viral E1 / E2 (E1: Reconoce y se une al DNA del VPH en su punto de origen; E2: Se une al promotor de la transcripción viral, interactúa y recluta E1 llevándola al punto de origen) (Durst *et al.*, 1987).

1.1.3. Relación actividad antioxidante-cáncer

En los últimos años se ha tenido una gran controversia respecto a los antioxidantes y su efecto contra el cáncer, ya que se ha observado que muchos de los fármacos que se administran durante la quimioterapia inducen al estrés oxidativo en las células cancerígenas, lo que las conduce a su destrucción por necrosis o apoptosis (Moiseeva, 2007), es por ello, que se han descrito numerosos efectos de estos compuestos sobre las células cancerosas, como la posibilidad de inhibir el ciclo celular, la proliferación celular y el estrés oxidativo, e inducir la detoxificación de enzimas, la apoptosis, y de estimular el sistema inmune (Del Rio *et al.*, 2009).

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado una asociación entre el consumo de alimentos y bebidas ricas en polifenoles y la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer. La controversia inicia cuando algunos estudios han demostrado que los compuestos antioxidantes pueden impedir la muerte de las células cancerígenas, tal como lo hace el galato de epigalocatequina (EGCG), el cual se encuentra en el té verde, e interfiere con los efectos anticancerígenos de Bortezomib (fármaco usado para el tratamiento del mieloma y linfoma) ya que bloquea su función inhibidora del proteosoma (Herrera-Calderón, 2014). Sin embargo, hay otros estudios que demuestran lo contrario, tal es el caso de la quercetina que ha presentado actividad anticancerígena, y ello se ha relacionado con su actividad antioxidante, su capacidad para inhibir enzimas que activan carcinógenos, y con su actividad para modular diferentes rutas de transducción de señales, se ha demostrado que un tratamiento a corto plazo con quercetina tiene un efecto antioxidante y antiapoptótico, mientras que un tratamiento a largo plazo resulta en una acción pro-oxidante y pro-apoptótica (Hanahan and Weinberg, 2012).



Por su parte, la vitamina E, además de ser antioxidante, puede inducir la apoptosis en cáncer colorrectal (línea HT-29) y aumenta la inhibición del crecimiento de estas células tratadas con 5-fluorouracilo; por esto la vitamina E es un tratamiento complementario para este tipo de cáncer. Investigaciones en animales sugieren que altas dosis de esta vitamina aumentan la eficiencia de la quimioterapia antineoplásicas (Vallejo-Zamudio *et al.*, 2017).

De acuerdo a las investigaciones que se han llevado acabo con los compuestos antioxidantes y su relación con el cáncer, se han encontrado que dicho efecto depende de la concentración y del tipo de célula cancerígena utilizada, ya que se ha probado que a concentraciones altas es cuando mayor efecto anticancerígeno presentan (Herrera-Calderón, 2014).

Dada la relevancia de encontrar compuestos que permitan prevenir o disminuir la prevalencia del cáncer y de ésta manera reducir el índice de mortandad, en los últimos años, las proteínas alimentarias y péptidos se han convertido en un grupo de nutracéuticos cuyos efectos benéficos se han demostrado, logrando incluso la prevención de las diferentes etapas de cáncer, incluyendo iniciación y progresión (De Mejia y Dia, 2010), siendo compuestos con ventajas como su alta afinidad, especificidad fuerte para los objetivos, baja toxicidad y buena penetración de los tejidos, además de ser utilizados para el control y prevención de diferentes tipos de el cáncer (colon, cervicouterino) (Bhutia y Maiti, 2008).

1.2. El frijol

Con base en las evidencias arqueológicas, históricas y botánicas, se ha identificado a México como el centro de origen y domesticación del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) (Gepts y Dpbouk, 1991; Papa y Gepts, 2003; Papa *et al.*, 2005). El frijol común es una leguminosa ampliamente consumida en todo el mundo y se reconoce como la principal fuente de proteína en la dieta en muchos habitantes de los países de América Latina (Shellie-Dessert y Bliss, 1991). En México se han encontrado 45 de las 55 especies que abarca el género (Debouck, 1986). La mayoría de las



especies ocupa más de una zona de distribución en México, mientras que otras son endémicas y sólo se encuentran en un área delimitada (Debouck, 1987).

Gran parte de la producción de frijol en México, se destina al consumo humano siendo así que a nivel mundial ocupa el quinto lugar en producción y el tercero en consumo (Secretaría de Economía, 2012).

Recientemente se ha prestado atención al frijol, por sus características nutricionales y nutraceuticas, ya que previene o reduce enfermedades cardiovasculares y cáncer desarrollado en diferentes órganos. Dentro de las características más importantes que destacan el valor nutritivo de las leguminosas en la nutrición humana es que tienen de 2 a 3 veces más proteína que los cereales. Además de un alto contenido de minerales, especialmente Fe, Ca y Zn (Paredes y Valverde, 2006; Figueroa *et al.*, 2010).

1.2.1. El frijol como fuente de compuestos nutraceuticos

En comparación con otros vegetales, el frijol presenta mayor número de compuestos nutraceuticos (**Tabla 2**). Por ejemplo, una porción de 100g de frijol cocido puede aportar el 60% del requerimiento diario de fibra, 40% de hierro y 66% de ácido fólico (Figueroa *et al.*, 2010), así como polifenoles, que incluyen fenoles solubles, taninos, antocianinas, flavonoides y ácido fólico (Paredes y Valverde, 2006; Figueroa *et al.*, 2010).

Tabla 2. Variedades de frijol y su efecto nutraceutico.

Leguminosa	Muestra	Ensayos	Referencia
Soya (<i>Glycine Max</i>)	Aislado proteínico	Reducción de cáncer de mama en rata Sprague-Dawley (SD)	Barnes <i>et al.</i> , 1990 y Hawrylewicz <i>et al.</i> , 1991
Frijol negro y blanco cocido (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Harina de frijol cocido	Efecto anticarcinogénico en ratas inducidas con cáncer de colon	Hangen y Bennink, 2002



Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	Aislado proteínico	Actividad antihipertensiva <i>In vivo</i>	Pedroche <i>et al.</i> , 2002
Frijol pinto zapata y Negro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Harina de frijol cocido	Disminución de la incidencia de tumores cancerígenos de colon en ratas y conejos	Herrera-Hernández y Guzmán-Maldonado, 2010
Frijol pinto zapata y Negro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Harina de frijol cocido	Disminución de la incidencia de tumores cancerígenos de colon en ratas y conejos	Herrera-Hernández y Guzmán-Maldonado, 2010
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Aislado proteínico	Efecto hipocolesterolémico en Rata SD con diabetes.	Thachibona <i>et al.</i> , 2013
Frijol Adzuki (<i>Vigna angularis</i>)	Globulina	Actividad antioxidante y antihipertensiva, por su capacidad para quelar iones hierro.	Durak <i>et al.</i> , 2013
Frijol terciopelo (<i>M. pruriens</i>)	Hidrolizados proteicos	Actividad antihipertensiva <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en ratas Wistar-Kyoto superior al 50%	Castillo-Yam <i>et al.</i> , 2015
Dos variedades de Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Hidrolizados proteicos	Actividad antioxidante por ABTS con inhibición del 64 y 73.	Mendoza-Jiménez <i>et al.</i> , 2018

De acuerdo a los avances en la investigación de los compuestos nutraceuticos extraídos del frijol se da por hecho que podrían ser una buen opción para usarse como ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales o pueden incluirse en matrices no alimentarias y ejercer efectos benéficos para la salud (Escudero *et al.*, 2012).

1.2.2. Especies de frijol

Entre las especies que se han registrado en México y América Central, 49 son cultivadas, entre las que se encuentran las distintas variedades de frijol. De las 55



especies descritas del género *Phaseolus*, alrededor de 45 son originarias de México de las cuales la más ampliamente estudiada es *P. vulgaris* (Sousa y Delgado, 1998; Castillo-Mendoza et al., 2006).

Las variaciones van entre el mismo género y dentro de las diferentes especies puede ser observada en las características morfológicas de los diferentes órganos de la planta, por ejemplo; se pueden clasificar de acuerdo a la ubicación de los cotiledones durante la germinación (**Figura 8**), las cuales pueden ser epigeos (es decir los cotiledón después de la geminación sobresale con la plántula) como en *Phaseolus vulgaris* L., *P. acutifolius* var. *acutifolius* A. Gray. y *P. lunatus* L., e hipogeos (los cotiledones permanecen sobre la tierra después de la germinación) en *P. coccineus* L., *P. leptostachyus* Benth. y *P. rotundatus* Freytag & Debouck (Freytag y Debouck, 2002; Castillo-Mendoza et al., 2006).

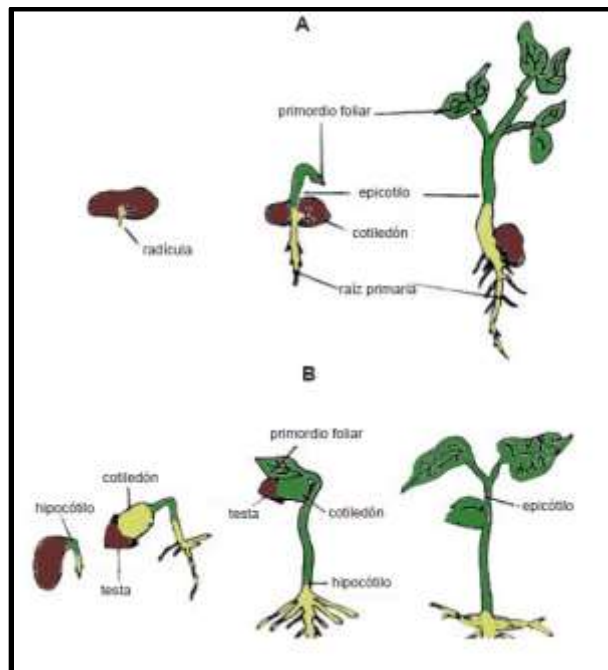


Figura 8. Tipo de germinación de *P. vulgaris* A) Hipogea, B) Epigea, (Modificada de Rosabal-Ayan et al., 2014)

Otra diferencia morfológica que resalta es que algunas especies poseen vainas pequeñas y con pocas semillas como en *P. microcarpus*, *P. micranthus* Hook. &



Arn. y *P. leptostachyus* Benth, o bien pueden tener vainas y semillas grandes como en *P. albescens*, *P. maculatus* subsp. *ritensis* y *P. lunatus* L. (**Figura 9**)

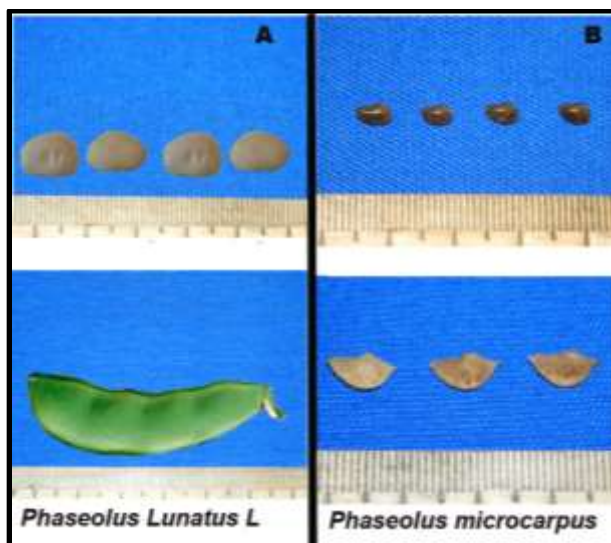


Figura 9. Forma y tamaño de la vaina y de las semilla de *P. vulgaris* (Modificada de Meza-Vázquez *et al.*, 2015; Cuny and Benrey, 2017)

Las especies de también pueden ser de ciclo anual como *P. vulgaris*, *P. parvifolius* y *P. acutifolius* var. *acutifolius* A. Gray, o perennes como en *P. coccineus*, *P. rotundatus*, *P. jaliscanus* Piper, (Freytag y Debouck, 2002; Lépiz y Ramírez, 2010; Castillo-Mendoza *et al.*, 2015).

Algunas especies poseen características muy particulares, como *P. microcarpus* con vainas de una sola semilla, *P. leptostachyus* de hábito determinado, *P. maculatus* subsp. *maculatus* de hábito rastrero, y *P. micranthus* que emite raíces en los tallos en contacto con el suelo que simulan estolones (Castillo-Mendoza *et al.*, 2015).

Sin embargo, debido a que éste género es muy amplio, existen muchas especies silvestres que pueden provocar mayor variabilidad (Castiñeiras-Alonso, *et al.*, 2001). Es por ello, que la domesticación de las especies del frijol se considera relevante para lograr reducir esta diversidad genética por un fenómeno denominado "cuello de botella de la domesticación", que consiste en la reducción de la diversidad genética de la población en comparación con su ancestro (Ladizinsky, 1998), y la posterior selección con base en características particulares que reduce aún más la



diversidad genética de loci específicos y regiones genómicas circundantes (Papa *et al.*, 2006).

Entre las especies del género *Phaseolus*, que son más comúnmente consumidas y cuyas características morfológicas aún se mantienen como las de sus ancestros, se encuentran *P. vulgaris* L, *P. Polyanthus* Greenman, *P. coccineus* L, *P. lunatus* L y *P. acutifolius* Asa Gray. (Delgado-Salinas, 1988; Debouck, 1991).

1.3 Frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

El frijol ayocote (*P. coccineus*) es una planta perenne cultivada como anual, trepadora, con un gran vigor vegetativo; los tallos alcanzan varios metros de longitud, aunque hay algunos cultivares que son de mata, con hojas compuestas, vaina de 8 a 10 cm de largo y semillas grandes, de color variable, con una inflorescencia de 20 cm, con flores de color rojo escarlata (**Figura 10**) (Benavides *et al.*, 2010).

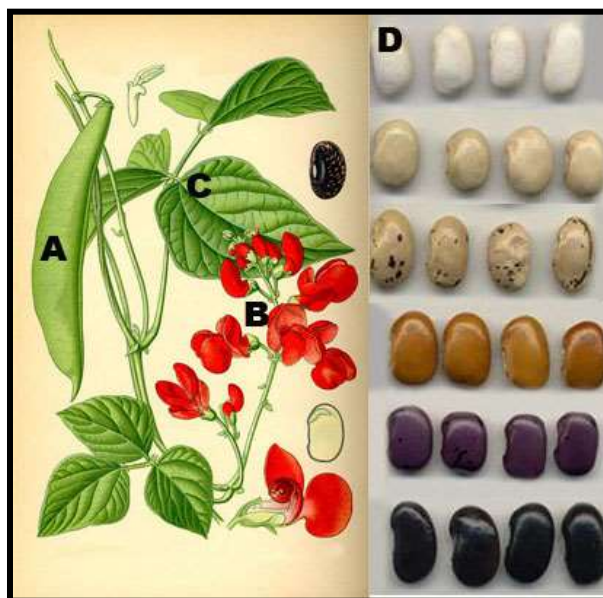


Figura 10. Planta y variedades de semilla de Frijol Ayocote (*P. coccineus*): A) Vaina, B) Inflorescencia y flor, C) hoja compuesta y D) Colores de la semilla. (Adaptada de Ruíz-Salazar, 2009)



El frijol ayocote es nativo de Mesoamérica, se encuentra generalmente en las zonas altas tropicales y húmedas de México, en tiempos precolombinos, se cultivó extensivamente en el altiplano mexicano (Vargas *et al.*, 1998 y Benavides *et al.*, 2010), siendo tan antiguo como el frijol lima, actualmente esta especie no se cultiva en forma tan amplia como el frijol común, tiene cuatro subespecies, dos de las cuales presentan formas cultivadas: *P. coccineus* subsp. *coccineus* distribuida especialmente en la zona de México y Guatemala, y *P. coccineus* subsp. *polyanthus* que se encuentra tanto en México y Guatemala como en Colombia, Ecuador y Venezuela y las otras dos subespecies no cultivadas son; *P. coccineus* subsp. *formosus* y *P. coccineus* subsp. *obvallatus* (Vargas *et al.*, 1998).

Actualmente, las especies cultivadas se producen a baja escala en algunos estados de nuestro país, donde además se aprovechan sus variedades silvestres (Benavides *et al.*, 2010). Se siembra en monocultivo de temporal e intercalado con el maíz, éstas últimas pueden ser de guías cortas, o plantas trepadoras que maduran mucho después que el maíz. En los municipios de Libres y Serdán, Puebla, el frijol ayocote se siembra en monocultivo, mientras que en regiones de los estados de Hidalgo, México y Tlaxcala se siembran, junto al maíz o al frijol común (*P. vulgaris*). También se cultiva y consume el frijol ayocote en otras regiones del país, como las partes altas del estado de Chiapas, donde por lo general se asocia con el maíz, y en los estados de Chihuahua, Durango y Zacatecas, donde se cultiva junto al frijol común (*P. vulgaris* L.) de temporal. A nivel mundial, se cultiva en países de Centro y Sudamérica, además de Inglaterra y Estados Unidos. (Vargas-Vázquez *et al.*, 2011).

El aporte nutricional del frijol ayocote es comparable al de *P. vulgaris* L., por lo que las vainas verdes se aprovechan como verdura y la semilla madura como una leguminosa; además la planta se usa también como ornamental, de cobertura (se usa como techo principalmente de habito indeterminado trepador) y como forraje (Benavides *et al.*, 2010).

Aunque México es el centro de origen del frijol ayocote, la atención que se le ha dado ha sido insuficiente para impulsarlo como alternativa de producción y mucho menos como fuente de compuestos nutraceuticos.



1.3.1 Frijol ayocote como fuente de compuestos nutraceuticos

Se ha demostrado que el frijol ayocote además de representar una fuente importante de carbohidratos y proteínas, presenta compuestos con características nutraceuticas que aportan beneficios a la salud; tales como; la reducción del contenido de colesterol en sangre, tolerancia a la glucosa, disminución de enfermedades cardiovasculares y prevención de ciertos tipos de cáncer (Messina, 1999; Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1998) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Compuestos bioactivos del frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)

Frijol Ayocote (<i>Phaseolus coccineus</i>)	Extracto	Ensayos realizados	Referencia Bibliográfica
Escarlata	Peptido coccinina	Actividad antimicrobiana contra: <i>Coprinus comatus</i> , <i>Mycosphaerella arachidicola</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , entre otras; capacidad anticancerígena contra células Leukemia L1210 y HL60.	Ngai and Ng, 2004
Escarlata	Péptido phaseococcina	Actividad antifúngica contra, <i>Mycosphaerella arachidicola</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> y capacidad anti bacteriana. Actividad anticancerígena contra células de Leukemia L1210 y HL60	Ngai and Ng, 2005
Negro, morado y café	Hidrolizado de frijol crudo y de frijol cocido.	Capacidad antioxidante y actividad antihipertensiva.	López-Martínez et al., 2017

1.4 Proteínas y péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son pequeñas cadenas peptídicas compuestas por 2 a 15 residuos de aminoácidos, aunque puede haber excepciones ya que existen péptidos



con más de 20 residuos de aminoácidos (Torruco-Uco *et al.*, 2008), se encuentran inactivos en la proteína nativa, sin embargo, pueden ser liberados durante la digestión del alimento o por un procesado previo del mismo (hidrólisis enzimática), lo que les permite ejercer diversos efectos benéficos para la salud (Vioque *et al.*, 2006).

Los péptidos bioactivos han sido aislados de diferentes fuentes tanto animales como vegetales; como el plasma de la sangre de humanos y plasma de sangre de bovino, carne de pollo, yema de huevo, músculo y esqueleto de pescado, proteína de la leche (caseínas), gluten de trigo, soya, girasol, espinaca, frijol mungo, entre otros; mostrando diversas actividades biológicas (**Tabla 4**), como antihipertensivos, opioides, antioxidantes, anticolesterolémicos, antimicrobianos, anticariogénicos, antitrombóticos, anticancerígenos e inmunomoduladores (Torruco-Uco, 2009).

Tabla 4. Péptidos bioactivos y su efecto benéfico a la salud.

Péptidos	Efecto benéfico
Inmunomoduladores	Estimula la respuesta inmune
Inhibidores del enzima convertidor de angiotensina (ECA)	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Antioxidantes	Previenen enfermedades degenerativas y envejecimiento
Reguladores del tránsito intestinal	Mejoran la digestión y absorción
Reguladores de la proliferación celular	Reducen la proliferación de tumores cancerígenos
Antimicrobianos	Reducen el riesgo de infecciones
Quelantes	Mejoran la absorción de minerales y metales
Hipocolesterolémicos	Reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares
Anticoagulantes	Reducen los riesgos de padecer trombos



1.4.1. Péptidos y cáncer

Las proteínas, péptidos y aminoácidos han sido implicados en la prevención de distintos tipos de cáncer, su modo de acción sobre las células es muy variado y depende de un tipo a otro de péptidos, por lo que, en muchos casos, no se ha descubierto como es su mecanismo de acción (Martínez-Agustín y Martínez de Victoria, 2006). Sin embargo, hasta el momento se ha encontrado 4 modos de acción; 1) eliminación de compuestos mutagénicos entre ellos el glutatión (glutatión transferasa y la glutatión peroxidasa), 2) potenciación de la respuesta inmune por ejemplo la lactoferrina, 3) evitar que las células cancerosas absorban los compuestos necesarios para su proliferación, tal es el caso del inhibidor de proteasas Bowman-Birk y 4) evitar la acetilación de las histonas como el péptido lunasina extraído de la proteína de soya (Ramos, 2009).

1.4.1.1 Eliminación de compuestos mutagénicos como el Glutatión

De acuerdo a las investigaciones se ha encontrado que células cancerígenas pueden generar una elevada cantidad de peróxido de hidrogeno (H_2O_2), la cual contribuye al daño y mutación de tejidos, facilitando el crecimiento y la invasión del tumor. Por lo que el estado persistente de *stress* oxidativo explica parcialmente algunas características importantes del cáncer (Handelman, 2000; Navarro *et al.*, 1999).

El aumento de glutatión (Glu-Gly-Cys) que puede aparecer en células tumorales se puede explicar como consecuencia de un aumento de la actividad mitótica. Los cambios de la velocidad de proliferación coinciden con cambios en la concentración intracelular de la Glutatión (GSH) (**Figura 11**). Cuando las células tumorales proliferan se producen más peróxidos, hay aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y consecuentemente se oxida el GSH. Si disminuye la velocidad de proliferación, también lo hace el nivel de peróxidos (Navarro *et al.*, 1997). Se puede atribuir, el crecimiento del tumor al aumento y liberación del glutatión oxidado (GSSG) desde los tejidos hasta la sangre cercana al tumor, un ejemplo es la anemia,



la cual es un síntoma frecuentemente encontrado en los pacientes con cáncer; también se aprecian cambios enzimáticos que orientan hacia el estado oxidado (Martínez-Sarrasague *et al.*, 2006).

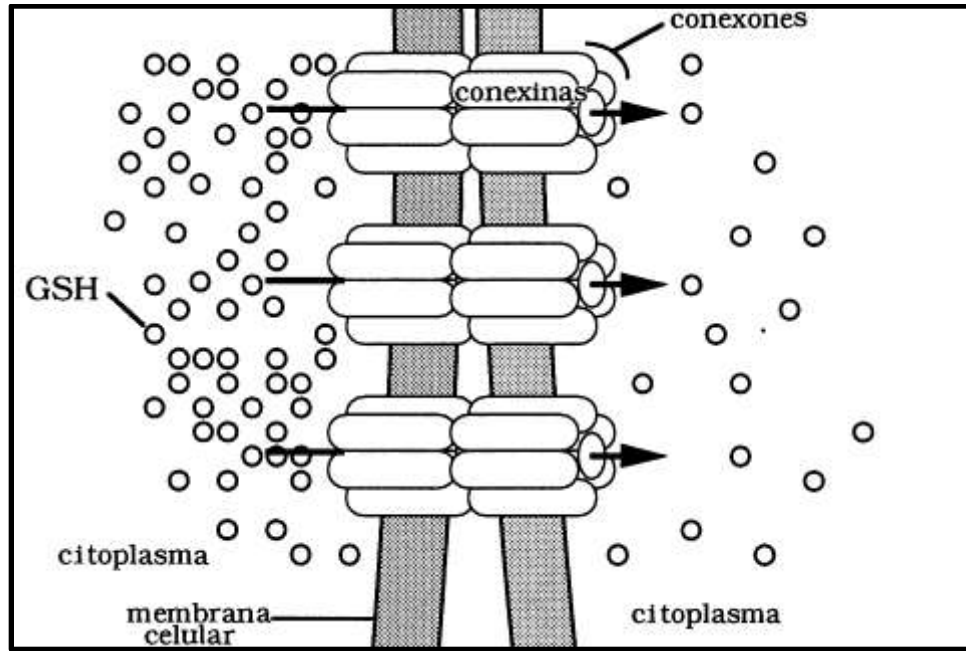


Figura 11. Difusión de GSH a través de uniones entre las células cercanas (Modificada de Chen *et al.*, 1998)

Es por ello que frente a casos de resistencia en la terapia contra el cáncer se considera de utilidad el conocimiento de la relación GSH/GSSG. Ya que los ésteres del GSH son fármacos precursores del tripéptido que por sus características químicas pueden penetrar en las células donde son hidrolizados; así se logran elevados niveles de GSH que protegen a las células linfáticas contra los efectos letales de la radiación, en especial con la glutatión transferasa y la glutatión peroxidasa. La función más importante del GSH en la quimioterapia es su participación en la detoxificación de xenobióticos, peróxidos orgánicos y metales pesados; de este modo protege a las macromoléculas de las células, como por ejemplo el ADN (Chen *et al.*, 1998; Navarro *et al.*, 1999).



1.4.1.2 Lactoferrina como potenciador de la respuesta inmune

Es una proteína de 80 kDa con capacidad de interactuar con el hierro, se descubrió por primera vez en las glándulas secretoras mamarias, pero se sintetiza en la mayoría de los tejidos de mamíferos (Farnaud and Evans, 2003). Está presente en altas concentraciones en humanos (1.0 a \approx 3.2 mg/ml) y leche bovina (0.02 a \approx 0.35 mg/ml) y en concentraciones más bajas en secreciones derivadas de células epiteliales (Rodrigues *et al.*, 2009). Su amplia distribución indica que la lactoferrina posiblemente esté involucrada en múltiples actividades fisiológicas importantes, tales como en las actividades anticancerígenas, sin embargo, los mecanismos involucrados en dicha actividad aún no están claros, generalmente pueden agruparse en efectos extracelulares, efectos intracelulares e inmunoestimulación. Los efectos extracelulares se relacionan principalmente con la interacción de la lactoferrina con la membrana celular y los receptores de membrana, mientras que los efectos intracelulares sugeridos por la mayoría de los estudios se relacionan principalmente con la apoptosis celular y la detención del ciclo celular (Fillenbeen *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2003). La acción inmunoestimuladora de la lactoferrina se logra principalmente activando las células inmunitarias para liberar los efectores citotóxicos tumorales. (Zhang *et al.*, 2014). Los mecanismos propuestos que subyacen a la citotoxicidad de la lactoferrina o sus derivados contra las células cancerosas son diversos y se derivan de experimentos *in vitro* (**Figura 12A**). Además, los hallazgos de los experimentos *in vivo* son generalmente similares (**Figura 12B**) (Tanaka *et al.*, 2000).

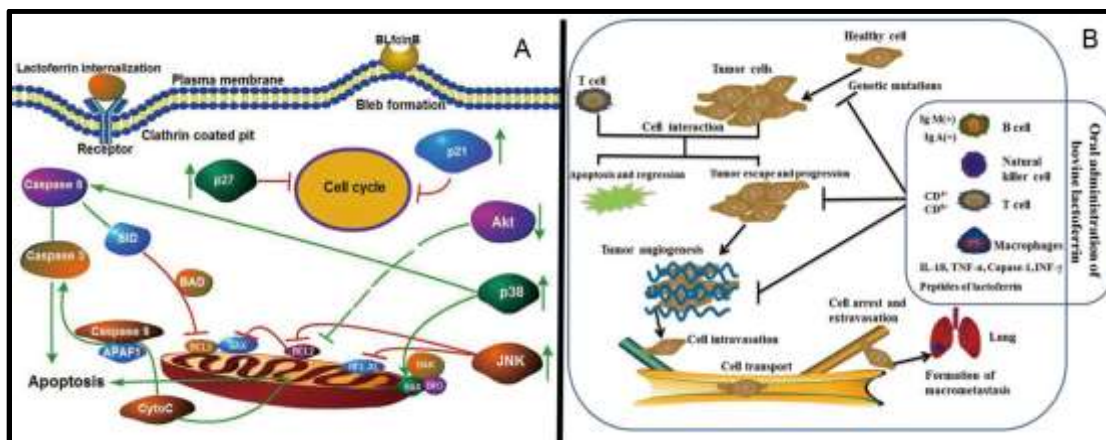


Figura 12. Mecanismos de acción propuestos para la lactoferrina. A) Efectos contra las células cancerosas in vitro, B) Efectos anticancerígenos in vivo de la lactoferrina bovina.

1.4.1.3 Inhibidor de Bowman Birk (BBI) como inhibidor de la proliferación de células cancerosas

El BBI es un péptido de 71 aminoácidos (**Figura 13**), con peso molecular de aproximadamente 8 kDa y una estructura rígida estabilizada por 7 puentes disulfuro, que es capaz de inhibir tanto a la enzima tripsina como a quimotripsina a través de dos sitios activos independientes, Lis₁₆-Ser₁₇ y Leu₄₃-Ser₄₄, respectivamente (Barac *et al.*, 2005).

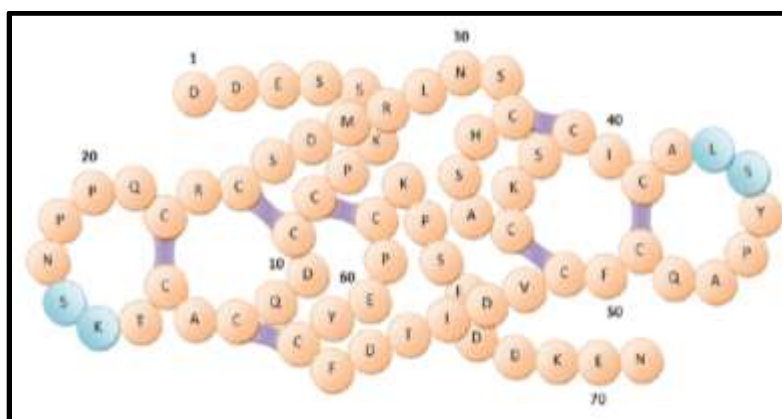


Figura 13. Inhibidor de Bowman Birk (Robles-Ramírez, 2010).



Se ha demostrado que éste péptido suprime la carcinogénesis en una variedad de sistemas, tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se indujo el cáncer con diferentes tipos de carcinógenos (Kennedy, 1998). Es un efectivo quimiopreventivo no tóxico contra lesiones premalignas orales (Armstrong *et al.*, 2000 a, b).

Por otra parte, estudios con ratones han demostrado que cantidades significativas de BBI son absorbidas en el tracto digestivo y son distribuidas en varios órganos tres horas después de su administración oral (Billings *et al.*, 1992), lo que podría facilitar la inhibición de proteasas intracelulares asociadas con la mutación de células normales a cancerosas (Robles-Ramírez, 2010). En otros estudios se demostró que este péptido inhibe específicamente la actividad proteosomal semejante a quimotripsina. Esta inhibición está asociada con la acumulación de proteínas ubiquitinadas y de los sustratos del proteosoma, p21 y p27, que acompañan la disminución de las ciclinas D1 y E, lo cual podría detener el ciclo celular en la fase G1/S (Chen *et al.*, 2005).

1.4.1.4 Lunasina como inhibidor de la acetilación de las histonas

La lunasina contiene 43 aminoácidos (**Figura 14**) con un peso molecular de 5400 Da, contiene en su extremo carboxilo nueve residuos de ácido aspártico precedidos por un motivo de adhesión celular formado por Arg-Gly-Asp (RGD), además de una estructura de hélice homóloga a una región conservada de proteínas unidas a la cromatina (EKHIMEKIQG). Es extraído principalmente de la soya, cebada (*Hordeum vulgare*) (Jeong *et al.*, 2002), trigo (*Triticum aestivum*) (Jeong *et al.*, 2007a), algunas especies de la familia Solanaceae (Jeong *et al.*, 2007b) y en amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) (Silva-Sánchez *et al.*, 2008).

A este péptido se le ha encontrado la cualidad de prevenir la mutación de células de mamíferos causada por oncogenes (Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). Por otra parte, estudios en animales indican que la lunasina presenta actividad anticancerígena y puede prevenir el cáncer del tracto digestivo (Galvez y De Lumen, 1999; Torruco-Uco *et al.*, 2008).



El modo de acción de la lunasina ha indicado que el péptido se introduce en la célula a través de su motivo de adhesión RGD; se localiza (unión del fragmento de péptido con proteínas) con la cromatina hipoacetilada y se une específicamente a las histonas H3 y H4 e inhibe su acetilación, una etapa crucial en la proliferación celular y en la formación de cáncer (Gálvez *et al.*, 2001 y Hernández-Ledesma *et al.*, 2009). La lunasina suprime la transformación de células de mama inducida tanto por oncogenes virales (Lam *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2003) como por carcinógenos químicos, su aplicación dérmica redujo en un 70% la incidencia de tumores en la piel de ratones tratados con dimetibenzaantraceno (Galvez *et al.*, 2001).

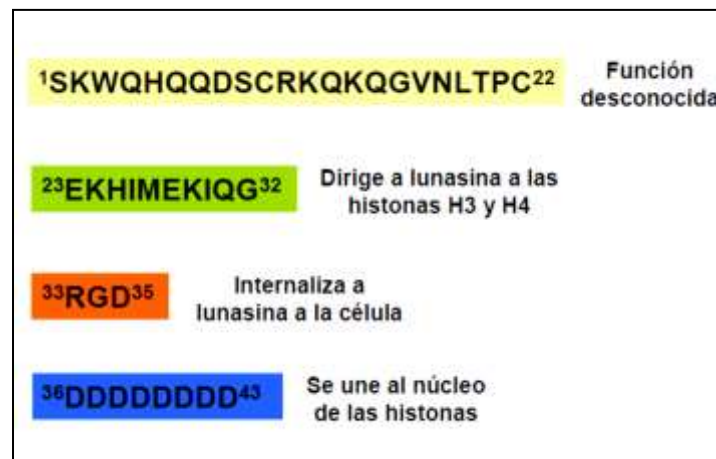


Figura 14. Secuencia y función de la lunasina (Jeong *et al.*, 2007).



JUSTIFICACIÓN.

Las enfermedades crónico degenerativas representan un problema de salud pública no solo en nuestro país sino en todo el mundo, específicamente la hipertensión como el cáncer, enfermedades cuyos tratamientos en muchas ocasiones, conllevan efectos secundarios, es por ello que se considera relevante encontrar compuestos que puedan prevenir o evitar el desarrollo de dichas enfermedades, siendo el frijol ayocote una fuente promisoría de péptidos que podrían tener efecto bioactivo, toda vez que los péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de su proteína han mostrado tener actividad antimutagénica, lo que es un indicio de su posible actividad anticancerígena.



HIPOTESIS

Al menos un grupo péptidos generados por hidrólisis enzimática de la proteína de frijol ayocote presenta alguna de las actividades biológicas determinadas (antihipertensiva, actividad antioxidante y anticancerígena).



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto antihipertensivo, antioxidante y anticancerígeno de los péptidos bioactivos de dos variedades de frijol ayocote.

Objetivos específicos.

- ❖ Hidrolizar enzimáticamente los aislados proteínicos de dos variedades del frijol ayocote (negro y morado).
- ❖ Separar los grupos de péptidos con base en su masa molecular.
- ❖ Determinar la actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y actividad antihipertensiva de los grupos de péptidos.
- ❖ Determinar la actividad anticancerígenas de los grupos de péptidos con diferentes concentraciones y tiempos de reacción sobre las líneas celulares de adenocarcinoma de Mama (MDA) y células cancerosas escamosas del cuello uterino (SiHa).
- ❖ Establecer la correlación entre la actividad antioxidante y la actividad anticancerígena.



Capítulo 2 . MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizaron 2 variedades de frijol ayocote (morada y negra) provenientes del municipio de Zacatlán ubicado en la Sierra Norte del estado de Puebla sus coordenadas geográficas son 19° 56' 5" latitud norte, 98° 12' 36" latitud occidental. Las semillas se limpiaron manualmente retirando materia extraña y granos dañados, se molieron en un molino manual y se tamizaron a través de la malla No 40, se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

2.2. Obtención de los aislados proteínicos del frijol ayocote

El aislamiento de las proteínas se realizó con el método de precipitación isoeléctrica de Bernardino-Nicanor *et al.*, 2000, partiendo de harina previamente desengrasada, el cual consistió en dos pasos: en el primero se determinó el pH de máxima solubilidad de las proteínas y en el segundo se determinó el pH de máxima precipitación. Se preparó una disolución con harina de frijol y agua destilada en una relación 1:14 (p/v), se ajustó a pH 11.8 con NaOH (0.1N) se centrifugó (Binder, Modelo FD115-UL, USA), a 3000 x g (30 minutos; 4°C), al sobrenadante se le ajustó el pH a 4 con HCl (0.1 N), se centrifugó a 6000 x g por 30 minutos, el precipitado fue separado y liofilizado (Scientz-10N Series, Freeze Dryer).

2.3. Hidrólisis de los aislados.

Los aislados proteínicos se hidrolizaron utilizando un tratamiento secuencial con pepsina, pancreatina), de acuerdo al método establecido por Mora-Escobedo *et al.*, 2009.

El aislado proteínico (2.5g de aislado en 50 mL de agua destilada) se ajustó a pH 2 con HCl (1.0 N) y se colocó en un digestor de vidrio de 100 mL, se digirió con 100 mg de pepsina (E/S= 1/25) (P7012, Sigma) por 60 minutos a 37°C, posteriormente



se ajustó el pH a 5.3 con NaHCO_3 0.9 M y se adicionaron 100 mg de pancreatina (E/S= 1/20) (P1750, Sigma), se ajustó nuevamente el pH a 7.5 con NaOH (1 N), se dejó digerir durante 120 minutos a 37°C. Para detener la digestión, la muestra se sumergió durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo.

2.3.1 Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se obtuvo obteniendo el porcentaje de proteína soluble, utilizando ácido tricloroacético (TCA), según el método descrito por Kim et al. 1990. Se solubilizó una alícuota de 10 mL de hidrolizado en una disolución de TCA al 10% se dejó reposar por 15 minutos, se centrifugó (Binder, Modelo FD115-UL, USA) a 12,000 xg durante 15 minutos. El contenido de nitrógeno del hidrolizado y del sobrenadante de la muestra tratada con TCA se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1997). El grado de hidrólisis (GH) se realizó utilizando la fórmula (1):

$$\%GH = \frac{N_2 \text{ soluble en TCA al 10\%}}{N_2 \text{ Total de la muestra}} * 100 \quad (\text{Fórmula 1})$$

Donde:

% GH es el porcentaje del grado de hidrólisis

N2 es el contenido de nitrógeno en la muestra

2.4. Separación de los grupos de péptidos por ultrafiltración

Los hidrolizados proteínicos se centrifugaron a 10,000 x g por 20 minutos. El sobrenadante con las fracciones solubles se utilizó para iniciar la separación por ultrafiltración. Se utilizó una unidad de ultrafiltración (Millipore Amicon, Modelo 8050, USA), la cual está equipada con un agitador magnético para evitar el sedimento de la muestra sobre las membranas, bajo un ambiente de Nitrógeno para evitar la degradación de los péptidos. Se utilizaron cinco membranas (Millipore) con diferentes cortes de peso molecular (MWCO): 30000 (30kDa), 10000 (10 kDa); 5000



(5 kDa); 3000 (3 kDa) y 1000 (1 kDa). Se obtuvieron seis fracciones peptídicas las cuales se denominaron; R30 (peso molecular >30 kDa), R10 (peso molecular entre 30 y 10 kDa), R5 (peso molecular entre 10 y 5 kDa), R3 (peso molecular entre 5 y 3 kDa), R1 (peso molecular entre 3 y 1 kDa) y P1 (peso molecular 1 y < 1 kDa).

2.5. Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración sobre la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

Para la evaluación de la actividad antihipertensiva se utilizó la metodología reportada por Cushman and Cheung, 1971, modificada por Chang-Bum *et al.*, 2012. Se tomaron 50 μ L de muestra con 50 μ L de disolución de la enzima ECA (Sigma-Aldrich, A2580) (25 mU/mL), se pre-incubó a 37°C por 10 min., se agregaron 150 μ L del sustrato (8.3 mM HHL en 50 mM de buffer de borato de sodio el cual contiene 0.3M NaCl a pH 8.3) y se incubó por 30 min., a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 250 μ L de HCl (1.0 M). Como resultado de esta reacción, se obtuvo ácido hipúrico el cual fue extraído con 500 μ L de acetato de etilo, se centrifugó a 1000 xg por 15 min., se colectaron 200 μ L del sobrenadante procurando tomarlos de la parte superior (primera fase formada), se secó a 80 °C por 10 min., pasado este tiempo se re suspendió con 1 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia del producto obtenido a una longitud de onda de 228nm. La concentración de cada uno de los extractos fue de 0.2% p/v en buffer de boratos en todos los ensayos. El porcentaje de inhibición se calculó con la fórmula (2):

$$\% \text{ Inhibición de ACE} = \frac{(A - C)}{(A - B)} * 100 \quad (\text{Fórmula 2})$$

Donde:

- A- Absorbancia del control negativo, el cual contiene enzima más sustrato.
- B- Absorbancia del blanco, el cual está conformado por inhibidor (enalaprilol al 0.2%) más Sustrato.
- C- Absorbancia obtenida de las muestras, las cuales esta constituidas con enzimas más sustrato más muestra.



2.6 Determinación de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó la técnica de DPPH (1,1-difenil-2 picrilhidrazil) descrita por Brand–Williams, 1995. El radical DPPH es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Consiste en preparar una curva de calibración con una disolución de DPPH (Sigma-Aldrich, D9132) 0.1 mM en metanol (80 %), para ello se realizaron cinco disoluciones en concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM, contando con un blanco, el cual sólo contenía 10 mL del disolvente, para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras se utilizaron 1.95 mL de la disolución de DPPH (0.1 mM) y 0.05 mL del extracto leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm, cada 10 minutos hasta completar 60 minutos. El porcentaje de inhibición o captación de radicales libres fue calculado por la fórmula 3:

$$\%Inhibición = \left(\frac{A-C}{A}\right) * 100 \quad (Fórmula 3)$$

Donde:

A- Absorvancia del DPPH

B- Absorvancia de la muestra

La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre DPPH (IC₅₀) fue calculada mediante la ecuación de la gráfica.

2.7 Determinación de contenido de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteau adaptada para alimentos por Singleton *et al.*, 1999. Esta técnica consistió en realizar una curva de calibración a partir de una disolución madre de ácido gálico (GAE) (Fermont), de 0 a 5 mg/L. De cada disolución se toman 1.58 mL (1580 µL) y se



mezclan con 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 8 minutos, posteriormente se agregaron 300 μL de disolución de Na_2CO_3 (20%), se agitó hasta su completa homogeneización y se dejó reposar por 2 horas a 20°C (o por 30 minutos a 40°C , o bien por 15 min a 50°C), pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 765 nm, usando como control la disolución con 0% GAE (se agregó 1.58 mL. de agua destilada). Para las muestras se realizó el mismo procedimiento utilizando 1.58 mL de cada disolución de muestra.

2.8 Cultivo Celular

Se utilizaron dos líneas celulares tumorales de adenocarcinoma, cérvicouterino (SiHa), y mama (MDA). El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad (en un gabinete de bioseguridad de clase II Delta Series Purifier de Labconco), usando material y disoluciones estériles). Las células se cultivaran en medio DMEM (Dubelco`s Modified Eagle Medium, Gibco) con suero fetal bovino (Gibco) al 10% (FBS) y 0.1% de antibiótico (estreptomicina y penicilina, ambas marca Pisa) se incubaron a 37°C en atmosfera humidificada y CO_2 al 5 % (Valadez-Vega *et al.*, 2014).

2.9 Ensayo de viabilidad y citotoxicidad celular

Se utilizó el ensayo colorimétrico del colorante tetrasolium, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 y l)-2-5-difeniltetrazolium (MTT) (Fermont). El fundamento de esta se basa en la reacción metabólica del MTT, el cual es un compuesto de color amarillo cuyo cambio es realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto denominado formazán (color azul), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. El anillo de tratazolio es reducido en la mitocondria activa, así la reacción ocurre en células vivas, ya que las células muertas son incapaces de reducir el MTT después de 30 min de lisis mediada por completo (Hansen *et al.*, 1989).



2.9.1 Ensayo MTT

Las células de las líneas MDA y SiHa se homogeizaron en medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium, marca Gibco), realizando la siembra de 10×10^3 células en cada pozo en una microplaca de 96 pozos, se colocaron en una incubadora (Sanyo MCO-18AIC) a 37 °C por 24 h.

El tratamiento consistió en; el control que son las células sin tratamiento y las muestras con los diferentes grupos de péptidos (R30, R10, R5, R3, R1, P1), a concentraciones de 5, 10, 50, 100, 1000 µg/mL. Después de la incubación, se eliminó la disolución de péptidos por aspiración, y se añadieron 110 µL de MTT (5 mg/mL) mezclado con DMEM, a cada pozo, posteriormente las placas se incubaron a 37 °C durante 3 h., después de este tiempo, la mezcla de MTT y DMEM se retiró de los pocillos y el producto (formazán intracelular) se disolvió con 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). La absorbancia de cada pocillo se medirá a 540 nm con un lector de microplacas (Espectrofotómetro para Microplacas Epoch) y se calculó el porcentaje de viabilidad e inhibición con las formulas 4 y 5:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(\frac{B * 100}{A} \right) \quad (\text{Fórmula 4})$$

Donde:

A- Absorbancia del control

B- Absorbancia de la muestra

$$\% \text{ Inhibición} = (\% \text{ Viabilidad} - 100) \quad (\text{Fórmula 5})$$

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.9.2 Ensayo MTT modificado.

Las células de las líneas MDA y SiHa se re suspendió en medio DMEM y se sembraron 5×10^3 células en cada pozo de una microplaca de 96 pozos, se incubaron



a 37 °C por 24 h. Primero se cultivaron en micro placas de 96 pozos en DMEM durante 24 h, se lavaron dos veces con BFS (Buffer de Fosfato monobásico de potasio al 0.2M, fosfato de dibásico de potasio al 0.2M, cloruro de sodio 0.4M y acida de sodio al 5%) y se trataron con diferentes concentraciones del extracto, a diferentes tiempos de incubación de 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h. Después de cada tiempo de incubación, se eliminó el extracto y se lavaran las células con PBS, se añadió a cada pozo el reactivo MTT (5 mg/mL), la placa se incubó a 37°C durante 3h. Pasado el tiempo, el medio se eliminó y el producto (formazán) oscuro insoluble en agua intracelular se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). La absorbancia de cada pozo se midió entonces mediante un lector de micro placas a una longitud de onda de 540 nm, y se calculó el porcentaje de viabilidad e inhibición con las fórmulas 6 y 7:

$$\% \text{Viabilidad} = \left(\frac{B * 100}{A} \right) \quad (\text{Fórmula 6})$$

Donde:

A- Absorbancia del control

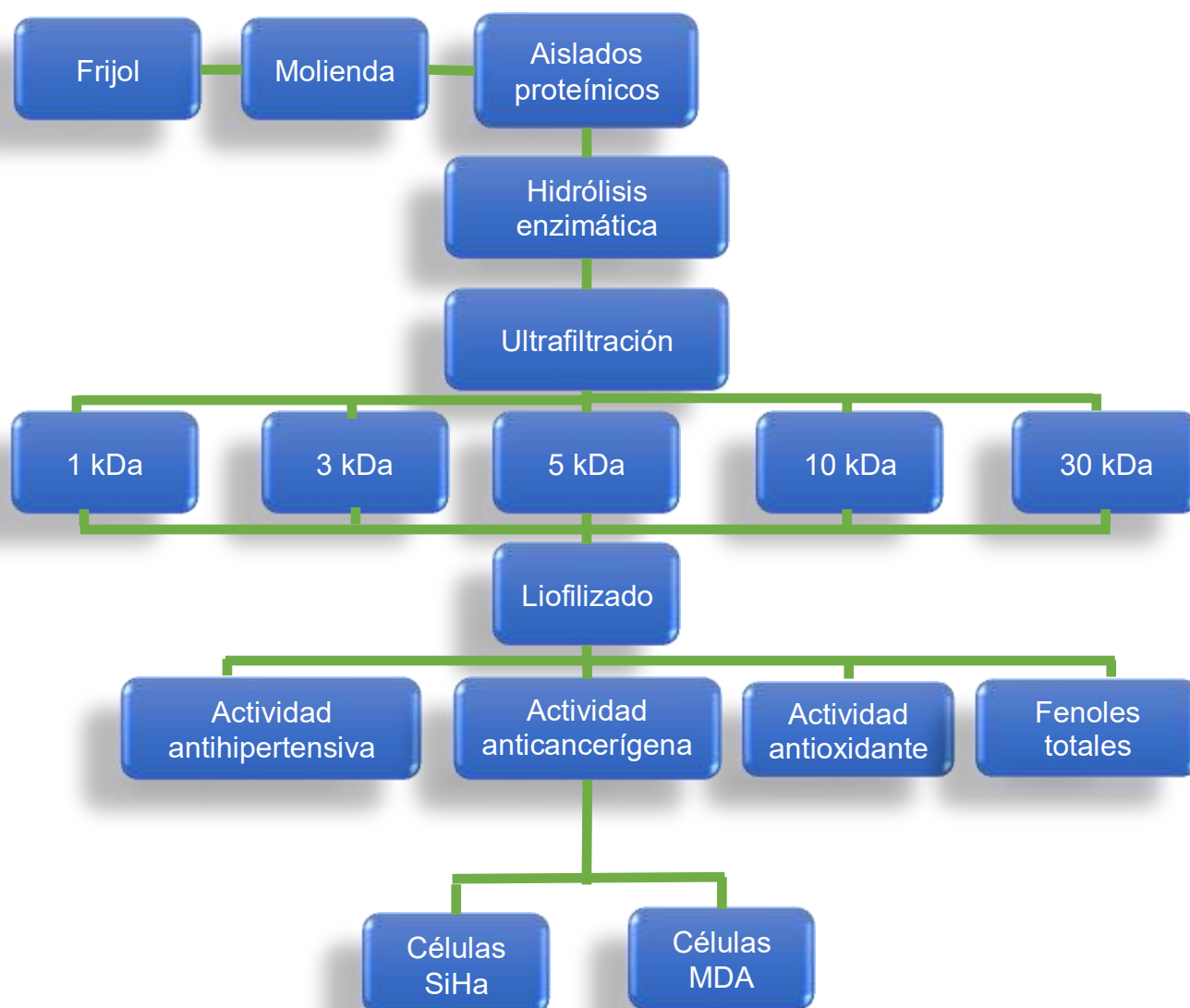
B- Absorbancia de la muestra

$$\% \text{Inhibición} = (\% \text{Viabilidad} - 100) \quad (\text{Fórmula 7})$$

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



2.10 Desarrollo Experimental





Capítulo 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Material vegetal.

Se utilizaron dos variedades de frijol ayocote: morado y negro (**Figura 15**), de un tamaño promedio de 1.93 ± 0.18 cm de largo, 1.23 ± 0.15 cm de ancho y 0.81 ± 0.20 cm de grosor para el frijol morado y para el frijol negro 1.71 ± 0.27 cm de largo, 1.18 ± 0.09 cm de ancho y 0.75 ± 0.18 cm de grosor.

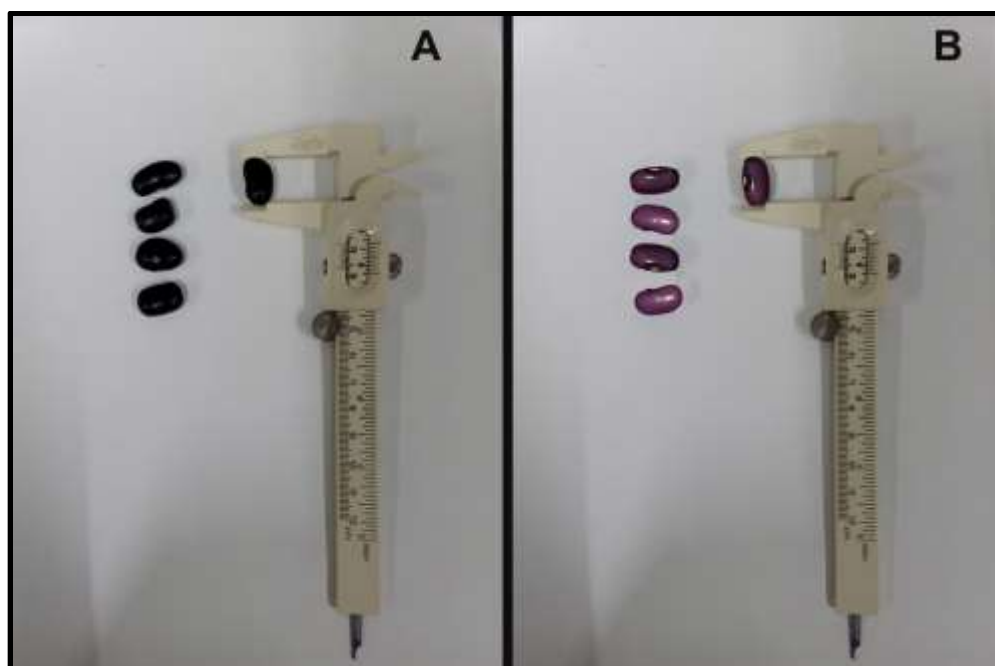


Figura 15. Frijol ayocote: A) variedad morada y B) variedad negro

3.2. Obtención de los aislados proteínicos del frijol

Los aislados obtenidos contienen un 83.72% y 90.8% de proteína para el frijol morado y negro respectivamente, la diferencia en el contenido proteínico del aislado se debe principalmente a la variedad, la cual se encuentra relacionada con la estructura de las proteínas que conforman la semilla (Tovar-Jiménez *et al.*, 2012).



Los datos obtenidos son menores que los reportados por Boye *et al.*, 2010 donde reporta un 95.70% de proteína en el aislado para el frijol lima (*P. lunatus*), sin embargo son altos comparados por lo obtenido por Conde-Martínez y Ortega-Delgado, 1990 y Medina-Godoy *et al.*, 2009 quienes reportan 66.73% de proteína en el aislado de frijol azufrado regional 87 (*P. vulgaris*).

3.3. Hidrólisis enzimática y Porcentaje de Hidrolisis (%H).

Los extractos proteínicos de ambas variedades de frijol ayocote se hidrolizaron por un tratamiento secuencial con pepsina y pancreatina, con la finalidad de simular la digestión gastrointestinal humana, por lo que los resultados obtenidos podrán proporcionar información sobre la generación de péptidos bioactivos durante la digestión fisiológica de estos extractos.

Los resultados indican que la hidrólisis generada en ambas variedades es muy semejante (**Tabla 5**), lo cual es un indicio de que los aislados proteínicos presentan la misma susceptibilidad a la digestión con estas enzimas, lo que estaría generando la misma cantidad de grupo de péptidos con posible actividad biológica (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012).

Los resultados obtenidos, sugieren que el porcentaje de hidrólisis depende en gran medida de las enzimas utilizadas, siendo la pepsina, pancreatina o bien pepsina y tripsina, la combinación que genera mayor grado de hidrólisis (**Tabla 5**)



Tabla 5. Comparación del Grado de hidrólisis del frijol ayocote con respecto a otras leguminosas

Material utilizado	Enzimas usadas para la hidrólisis	% de Hidrolisis	Autor
Extracto proteínico de frijol morado (<i>P. coccineus</i> , L)	Pepsina, Pancreatina y Peptidasa	73	Experimental
Extracto proteínico de frijol negro (<i>P. coccineus</i> , L)	Pepsina, Pancreatina y Peptidasa	72.9	Experimental
Extracto de soya	Pepsina y Pancreatina	42	Lo <i>et al.</i> , 2005
Extracto de soya	Alcalasa® y Flavourzima®	65	Pedroche <i>et al.</i> , 2002
Extracto proteínico de frijol mungo (<i>P. radiatus</i> L.)	Alcalasa® y Neutrasa®	22 y 12	Hong <i>et al.</i> , 2005
Harina de soya sin germinar y germinada	Pepsina y Tripsina	70.95, 71.02 y 73.53	Dikshit y Ghadle, 2003

3.4. Separación de péptidos mediante ultrafiltración

El grupo de péptidos separados por ultrafiltración mostraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de proteína (**Tabla 6**), lo cual podría corroborar la idea de que la estructura y el porcentaje de algunas proteínas es diferente en cada variedad, por lo tanto, aunque la hidrólisis se presentó en un nivel



semejante, generó distintos grupos de péptidos en cada variedad (Raya-Pérez *et al.*, 2014).

Tabla 6. Porcentaje de proteína de las fracciones peptídicas de los hidrolizados de frijol Ayocote.

Frijol	Tamaño de péptido	Proteína (%)
Negro	R30	8.2±0.144 ^a
	R10	2.6±0.057 ^e
	R5	7.8±0.005 ^b
	R3	6.5±0.070 ^c
	R1	5.4±0.005 ^d
	P1	1±0.005 ^f
Morado	R30	11.4±0.015 ^a
	R10	8.9±0.005 ^c
	R5	9.4±0.005 ^b
	R3	5.3±0.289 ^d
	R1	5.3±0.011 ^d
	P1	0.9±0.005 ^e

Letras iguales entre columnas indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$

3.5. Actividad inhibitoria de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración sobre la ECA.

Todos los grupos de péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis del frijol negro mostraron actividad antihipertensiva (**Tabla 7**), sin embargo, la mayor actividad fue obtenida al usar 20 mg de los péptidos R5. Mientras que los grupos de péptidos R30 y R10 del frijol morado fueron los únicos que presentaron actividad inhibitoria de la enzima ECA.

Estos resultados podrían indicar que los grupos de péptidos generados a partir del frijol negro presentan mayor proporción de aminoácidos aromáticos, en comparación con los obtenidos del frijol morado, ya que se ha demostrado que estos aminoácidos favorecen la unión de los péptidos a los sitios activos de la ECA provocando su inhibición (Cheung *et al.*, 1980).



Es importante mencionar que se utilizaron diferentes concentraciones de los grupos de péptidos debido a que, después de un barrido con diferentes concentraciones, sólo las que se reportan en cada caso son las que mostraron actividad, logrando en algunos casos superar el 50% (IC₅₀).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de los grupos de péptidos de ambas variedades.

Grupos de Péptidos (KDa)	Concentración de muestra (mg/mL)	% de Inhibición de ECA	
		Negro	Morado
R30	20	45.2±0.020 ^{c_b}	83.7±0.055 ^{a_a}
R10	5	15.7±0.050 ^{d_b}	55.5±0.017 ^{b_a}
R5	20	95.4±0.015 ^{a_a}	-
R3	5	86.2±0.060 ^{b_a}	-

Letras en superíndice iguales entre columnas indican que no hay diferencia estadística. P≤0.05

Letras en subíndice iguales entre filas indican que no hay diferencia estadística. P≤0.05

3.6. Determinación de la Actividad antioxidante

La IC₅₀ representa la concentración de muestra que se requiere para inhibir el 50% del agente oxidante (DPPH), por lo que el uso de una menor concentración es indicio de que la muestra posee mayor capacidad antioxidante, de esta forma, los péptidos R30 del frijol morado resultaron ser los que mostraron el mayor potencial antioxidante, ya que con tan solo 2.6 mg/mL se alcanzó el IC₅₀, mientras que los péptidos P1 del frijol negro fueron los que requieren mayor concentración. De manera general, los péptidos obtenidos del frijol morado presentan mayor capacidad antioxidante que los obtenidos del frijol negro (**Tabla 8**), ya que se requiere menor concentración de los péptidos para alcanzar la IC₅₀, ésta diferencia podría ser un indicio de que los péptidos obtenidos del frijol morado presentan mayor concentración de aminoácidos hidrofóbicos (valina, leucina, triptófano, histidina, prolina, tirosina, metionina y cisteína) (Ajibola *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2009), los cuales son los principales responsables de la actividad antioxidante (Gallegos *et al.*, 2013), ya que éstos aminoácidos tiene la capacidad de inhibir la



oxidación mediante la participación en reacciones en la que se involucran diferentes especies oxidantes. Sin embargo, en la actualidad aún no se ha podido describir un mecanismo de acción concreto para este fin, esto debido a la variabilidad y a la relación que existe en la composición de la secuencia de aminoácidos, la estructura y la hidrofobicidad de cada péptido (Saito *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha encontrado que los aminoácidos en su forma libre no son efectivos como antioxidantes, de hecho existe evidencia de que una hidrólisis extensiva de las proteínas da como resultado disminución en la actividad antioxidante (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016).

Tabla 8. Concentraciones del IC₅₀ de ambas variedades de frijol ayocote, para la actividad antioxidante.

Péptidos (kDa)	IC ₅₀ (mg/mL)	
	Negro	Morado
P1	96.2±0.094 ^a _a	82±0.061 ^a _b
R1	45.6±0.047 ^b _a	21.6±0.041 ^b _b
R3	34.4±0.040 ^c _a	16.3±0.057 ^{cb}
R5	18.6±0.081 ^d _a	10.5±0.065 ^d _b
R10	5.8±0.020 ^e _a	4.0±0.061 ^e _b
R30	4.4±0.023 ^f _a	2.6±0.032 ^f _b

Letras en superíndice iguales entre columnas indican que no hay diferencia estadística. P≤0.05

Letras en subíndice iguales entre filas indican que no hay diferencia estadística. P≤0.05

3.7. Determinación del Contenido de Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

Es importante mencionar que, la determinación de CFT se realizó debido a que si bien se está trabajando con péptidos purificados, los cuales no contienen compuestos fenólicos, sin embargo, existen algunos aminoácidos, específicamente los aromáticos (Triptófano, Tirosina y Fenilalanina), cuya estructura es semejante a los compuestos fenólicos, (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016), y se ha demostrado que el reactivo de Folin Ciocalteu tiene la capacidad de reaccionar con compuestos cuya



estructura es semejante (azúcares reductores, aminoácidos y ácido ascórbico) (Muñoz-Bernal *et al.*, 2017). La interacción de los aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano) con el reactivo de Folin Ciocalteu ya se conocía en décadas pasadas, ya que este método era utilizado en laboratorios clínicos para conocer la presencia de proteínas o aminoácidos, y con el paso del tiempo fue modificada para la determinación de compuestos fenólicos (Singleton and Rossi, 1965; Muñoz-Bernal *et al.*, 2017). Hoy en día se conoce que también algunos otros aminoácidos pueden reaccionar con el reactivo, tal es el caso de los aminoácidos azufrados (Metionina y Cisteína), y la histidina por su grupo imidazol (Elias *et al.*, 2008; Loganayaki *et al.*, 2011; Muñoz-Bernal *et al.*, 2017)

El contenido de compuestos que reaccionaron con el reactivo de Folin Ciocalteu y pudieron ser cuantificados presentan un comportamiento semejante a la actividad antioxidante, siendo los péptidos del frijol morado los que presentaron mayor concentración, de los cuales nuevamente los péptidos R30 fueron donde se detectó la mayor concentración (**Tabla 9**), lo cual es un indicio de que podría existir una correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos o aminoácidos capaces de reaccionar con el reactivo de Folin.

Tabla 9. Determinación de fenoles totales en dos variedades de frijol ayocote, negro y morado.

Péptidos (kDa)	mg de AG/g de extracto seco	
	Negro	Morado
P1	33.0±0.060 ^f _b	39.4±0.015 ^f _a
R1	36.3±0.011 ^c _b	38.8±0.020 ^e _b
R3	34.4±0.005 ^e _b	40.7±0.005 ^d _a
R5	35.6±0.010 ^d _b	50.6±0.006 ^c _a
R10	53.9±0.005 ^b _b	74.5±0.005 ^b _a
P30	65.6±0.012 ^a _b	98.7±0.010 ^a _a

Letras en superíndices iguales entre columnas indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$
Letras en subíndices iguales entre filas indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$



3.8. Evaluación de viabilidad y citotoxicidad de las células expuestas a los grupos de péptidos de frijol morado y frijol negro.

Con la finalidad de determinar el posible efecto de los péptidos tanto del frijol morado como negro, sobre las células tumorales MDA y SiHa, se realizaron ensayos con la técnica de MTT. Primero se evaluó el efecto de tres diferentes concentraciones (10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada grupo de péptidos de ambas variedades de frijol ayocote en ambas líneas celulares (**Figura 16**). El efecto de los péptidos sobre las células SiHa fue nulo, encontrando que el porcentaje más bajo fue del 70 al 65% para los péptidos de frijol negro y morado respectivamente, indicando que no existe actividad citotóxica considerable hacia las células cancerígenas.

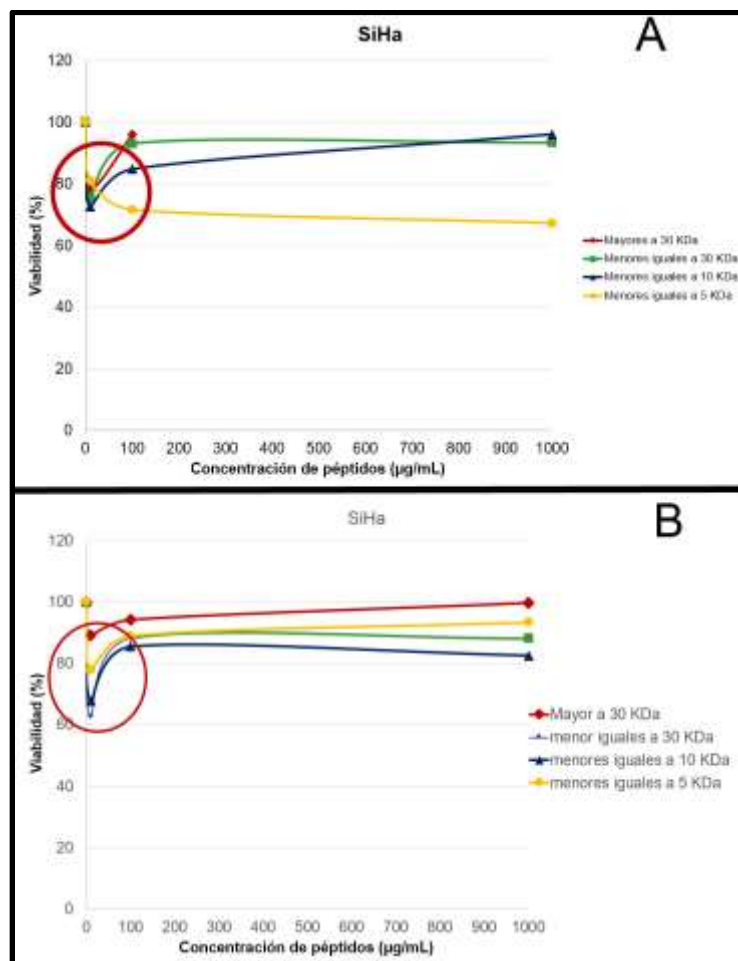


Figura 16. Viabilidad de las células SiHa a 24 h: A) Expuestas a péptidos de frijol Negra; B) Expuestas a los péptidos de frijol morado



Para la línea celular MDA se encontró que las concentraciones de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de los grupos de péptidos de ambas variedades de frijol, tampoco tuvieron efecto citotóxico, ya que la viabilidad celular fue del 60 al 90% para ambas variedades de frijol ayocote.

Sin embargo, los resultados indicaron que en concentraciones de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$, podría haber una disminución de la viabilidad celular debido a que se observó (**Figura 17**) un porcentajes de 40 a 60 % de viabilidad celular para el frijol negro y morado respectivamente, lo que es un indicio de su posible actividad citotóxica, por lo que se realizó un análisis utilizando concentraciones de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 18**).

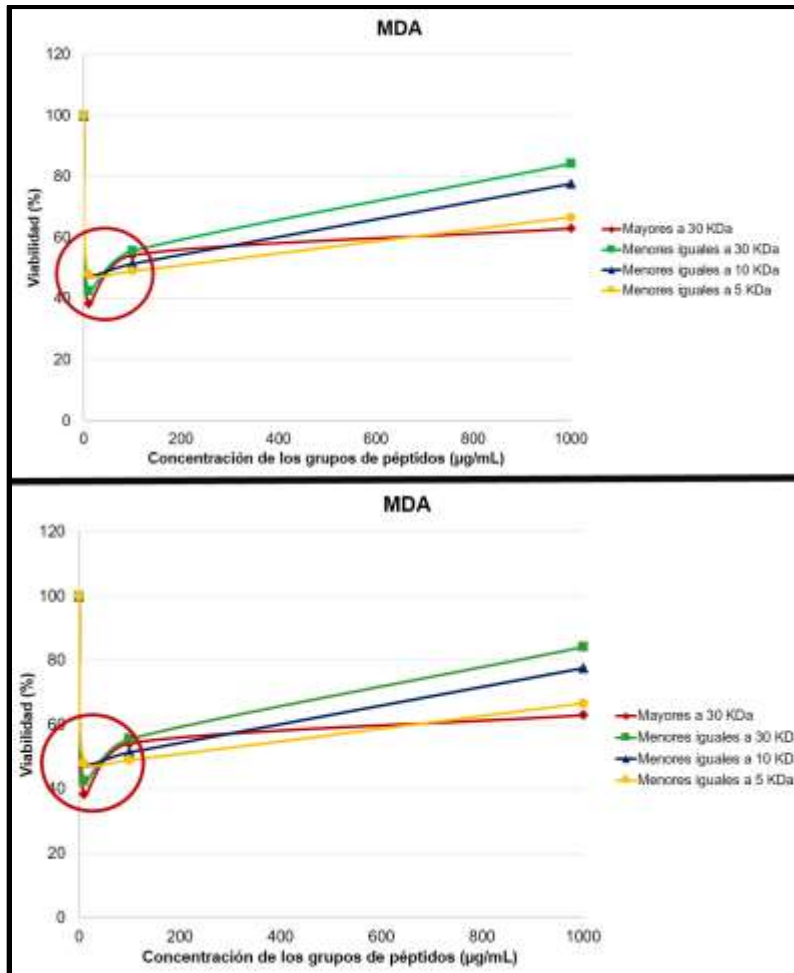


Figura 17. Viabilidad de las células MDA a 24 h: A) Expuestas a péptidos de frijol Negra; B) Expuestas a los péptidos de frijol morado.



Los resultados mostraron que no existía efecto citotóxico sobre la viabilidad de la células SiHa, al no haber efecto en esta línea se tomó la decisión de no probar las células MDA a estas concentraciones a 24 h de exposición, ya que los porcentajes observados de viabilidad del 90 a los 99 %, eran semejantes a los obtenidos para las células sin tratamiento (100%), por lo que se propuso utilizar concentraciones mayores a 1000 $\mu\text{g/mL}$ en diferentes tiempos de exposición de ambos grupos de péptidos con ambas líneas celulares.

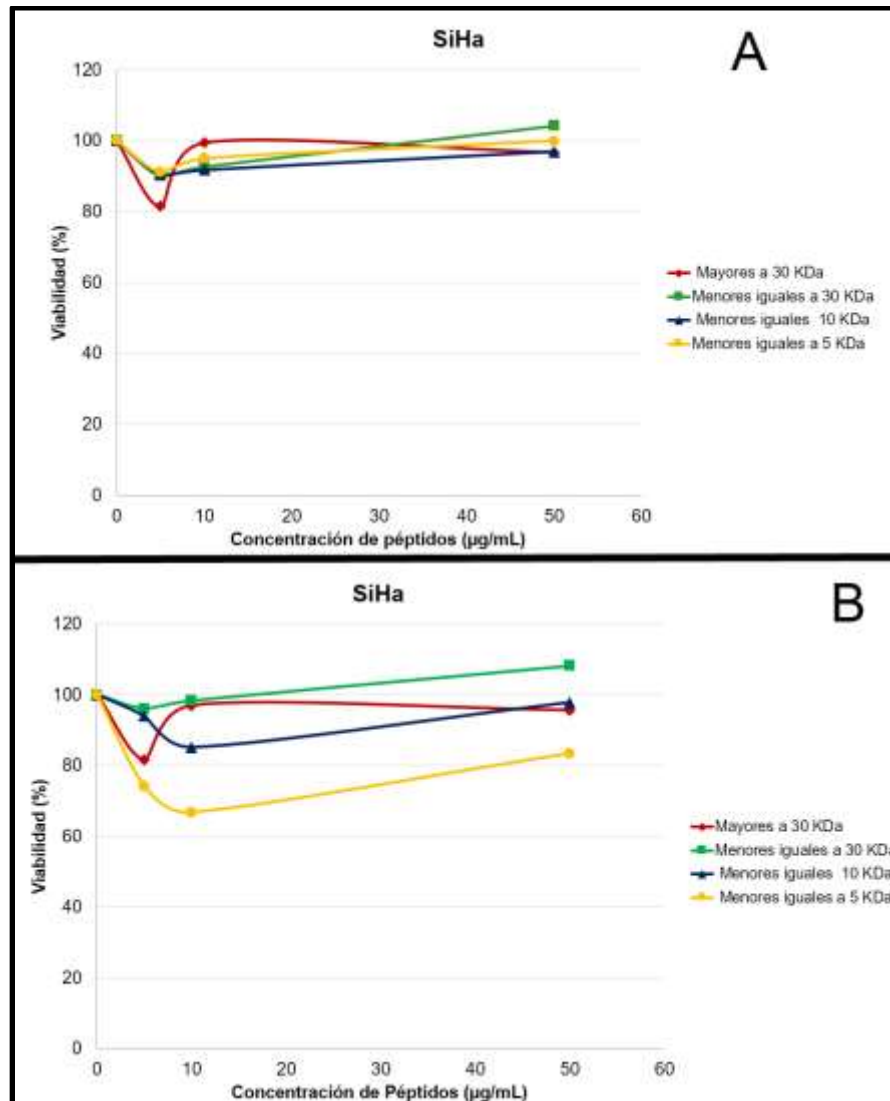


Figura 18. Viabilidad de las células cancerígenas a 24 h: A) Expuestas a péptidos de frijol Negra; B) Expuestas a los péptidos de frijol morado



3.8.1 Efecto citotóxico de péptido con respecto al tiempo.

3.8.1.1. Efecto sobre células SiHa

Las concentraciones utilizadas para cada grupo de péptidos, con base a su contenido de proteína variaron de 1000 a 5000 $\mu\text{g/mL}$ para la línea celular SiHa, además de utilizar diferentes tiempos de incubación (3, 6, 12, 24, 48, 72h). Los resultados de la inhibición de la proliferación de células SiHa provocada por la presencia de los grupos de péptidos de frijol ayocote negro (**Figura 19**), muestran que los grupos R5, R3, R1 y P1 generan menor inhibición de la proliferación de las células SiHa que el grupo de péptidos R30 kDa y R10 a dosis de 5000 $\mu\text{g/mL}$ y 72h de exposición.

Se observaron resultados similares con los grupos de péptidos frijol ayocote morado (**Figura 20**), logrando obtener la mayor inhibición de la proliferación de células SiHa a la mayor concentración probada (5000 $\mu\text{g/mL}$) en un tiempo de exposición de 72 h.

Los grupos de péptidos de morado y negro R30 kDa y R10 no muestran efectos sobre la proliferación de las células SiHa con ninguna concentración a 24h de exposición. Solo los grupos de péptidos de frijol morado mostraron acción contra la proliferación de las células SiHa en todos los períodos de tiempo en dosis de 1000 y 3000 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados concuerdan con los reportados por González-Montoya *et al.*, 2016, al utilizar fracciones proteínicas de soya germinada contra líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y cervical (HeLa, SiHa y CasKi).

Por otro lado, se ha reportado, que la actividad antiproliferativa de las fracciones de proteína de leche de burra con masa molecular >10 kDa es mayor que las fracciones de masa molecular inferior a 10 kDa al ser provadas contra células de cáncer de pulmón humano A549 (Mao *et al.*, 2009).

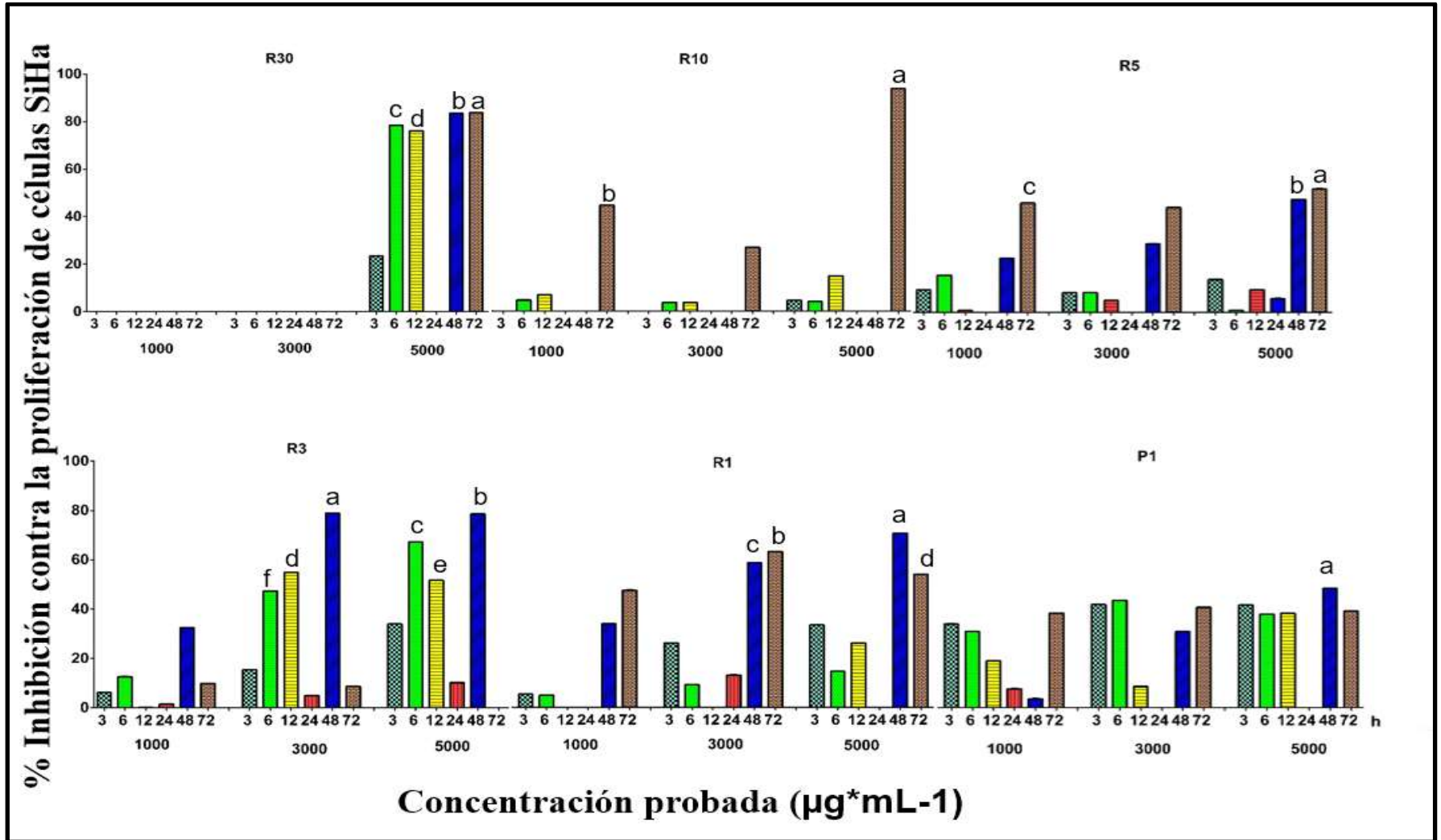


Figura 19. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol negro contra las células SiHa.
Letras iguales entre barras indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$

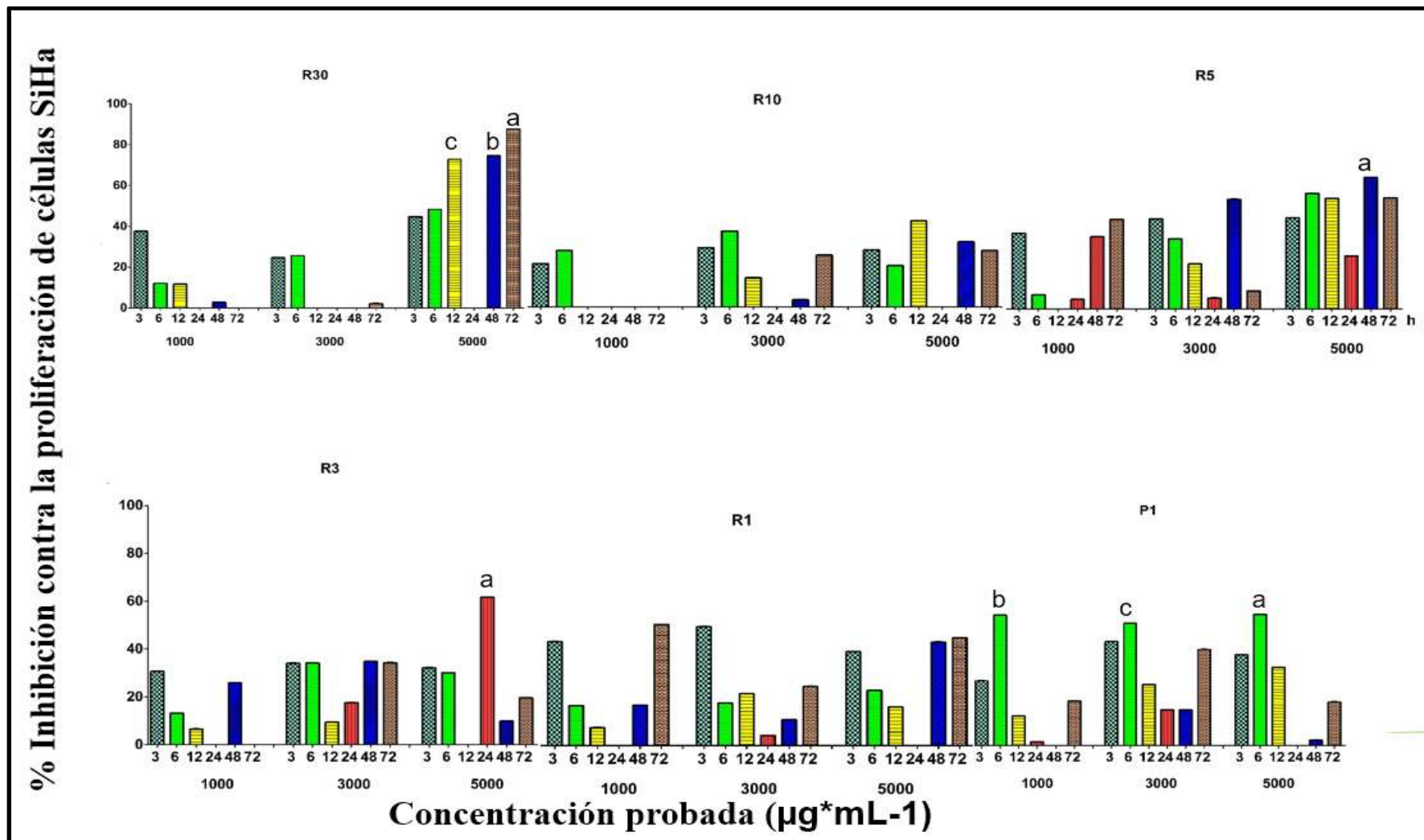


Figura 20. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol morado contra las células SiHa. Letras iguales entre barras indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$



Algunos reportes indican que la efectividad de los péptidos del frijol contra las células cancerosas varía según el cultivar (Luna-Vital *et al.*, 2015) por esta razón, los resultados obtenidos mostraron que las fracciones de proteína de frijol ayocote morado y negro tienen diferentes capacidades de inhibición en la proliferación de células SiHa.

Cinco grupos de péptidos de frijol ayocote negro (**Tabla 10**), alcanzaron la IC_{50} en diferentes tiempos de exposición al utilizar la misma concentración (5000 $\mu\text{g/mL}$), lo que muestra que la inhibición de estos grupos (R30, R5, R3, R1 y P1) depende del tiempo de exposición cuando son expuestos a las células SiHa, mientras que los grupos de péptido R10 alcanzó la IC_{50} con una concentración más baja a las 72h de exposición. Por lo tanto el IC_{50} para el grupo de péptidos R10 requiere menor concentración pero también se requiere un mayor tiempo de exposición (72 horas), por lo que se consideran más adecuados el grupo de péptidos R30 y R3 que requieren la misma concentración (5000 mg/mL) durante un tiempo de exposición de 6 horas para alcanzar el IC_{50} .

Tabla 10. Valores del IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los grupos de péptidos del frijol ayocote de ambas variedades con la prueba MTT en la línea celular SiHa.

Grupo de péptidos (kDa)	Frijol ayocote Negro		Frijol ayocote Morado	
	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de exposición (h)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de exposición (h)
≤ 1	5000	48	1000	6
≤ 3	5000	72	3000	3
≤ 5	5000	6	4400	3
≤ 10	5000	48	3000	48
≤ 30	3600	72	-	-
> 30	5000	6	5000	6



El tiempo de exposición y la concentración requeridos para alcanzar el IC₅₀ de los grupos de péptidos de frijol ayocote morado fueron más bajos que el tiempo de exposición y la concentración requerida para los grupos de péptidos de frijol negro. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron en dosis inferiores (1000, 3000, 4400 µg/mL) a 5000 µg/mL en las cuatro fracciones de proteínas (R5, R3, R1 y P1), observando que la inhibición de las células SiHa, no depende del tiempo de exposición, pero el peso molecular es el determinante de la inhibición de las células SiHa.

Por otro lado, los grupos de péptidos de frijol ayocote mostraron un alto potencial como componentes funcionales contra las células SiHa, considerando que los grupos de péptidos R1 de frijol ayocote morado mostraron una IC₅₀ de 1000 µg/mL contra las células SiHa, concentración más bajas que la reportada por otros autores para fracciones de proteína de soya donde el IC₅₀ se alcanzó a 1830 µg/mL contra las células HeLa (Robles-Ramírez *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que las diferencias que se presentan podrían ser atribuidas principalmente a que además de que se trata de leguminosas diferentes, que generan grupos de péptidos con diferentes propiedades, se trabajó con diferentes líneas celulares y se ha demostrado que esto es un factor relevante, ya que cada línea celular presenta características específicas (Robles-Ramírez *et al.*, 2012; Luna-Vital *et al.*, 2015; González-Montoya *et al.*, 2016; Sánchez-Mendoza *et al.*, 2016).

3.8.1.2. Efecto sobre células MDA

Los resultados de la inhibición de la proliferación de células MDA por efecto de los grupos de péptidos del frijol ayocote negro (**Figura 21**), muestran que los péptidos R30, R10 y P1 provocaron mayor inhibición de la proliferación de células MDA en dos concentraciones (3000 y 5000 µg/mL) en un tiempo de exposición de 72 h, comparada con los grupos de péptidos de R5, R3 y P1 los cuales presentaron una inhibición mas baja al mismo tiempo de exposición.



Los grupos de péptidos frijol ayocote morado (**Figura 22**) que generaron la mayor inhibición de la proliferación de la células MDA fueron los R30, utilizando una concentración de 5000 $\mu\text{g/mL}$ y un tiempo de exposición de 48 h.

Los grupos de péptidos de frijol morado y negro R30 y R10 no presentaron efectos sobre la proliferación de células MDA en ninguna concentración a las 24h de tiempo de exposición. Solo los grupos de péptidos de frijol negro mostraron acción contra la proliferación de las células MDA en los períodos de tiempo de 3, 6, 12, 48 y 72 h en dosis de 3000 y 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos, son similares a los reportados por López-Sánchez *et al.*, 2010, quien provó el efecto inhibitorio de la proliferación de péptidos ≥ 30 kDa, obtenidos de *Phaseolus acutifolius* sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Por otro lado, se ha demostrado la actividad antiproliferativa de las fracciones de proteína de leche de humana de masa molecular >30 kDa y ≥ 10 kDa en células de MCF-7 (Nekipelaya *et al.*, 2008).

Dos de los grupos de péptidos de frijol ayocote negro alcanzaron la IC_{50} en el mismo tiempo de exposición a la misma concentración (2000 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabla 11**), mientras que solo un grupo de péptidos del frijol morado (R30) alcanzó el IC_{50} con la concentración más alta a las 12 y 72h de exposición. Sin embargo, considerando que la IC_{50} de los péptidos R30 del frijol morado es alcanzada en 12 h (menor tiempo de exposición que los péptidos de frijol negro), se considera que éste es el grupo de péptidos que se consideran más adecuados.

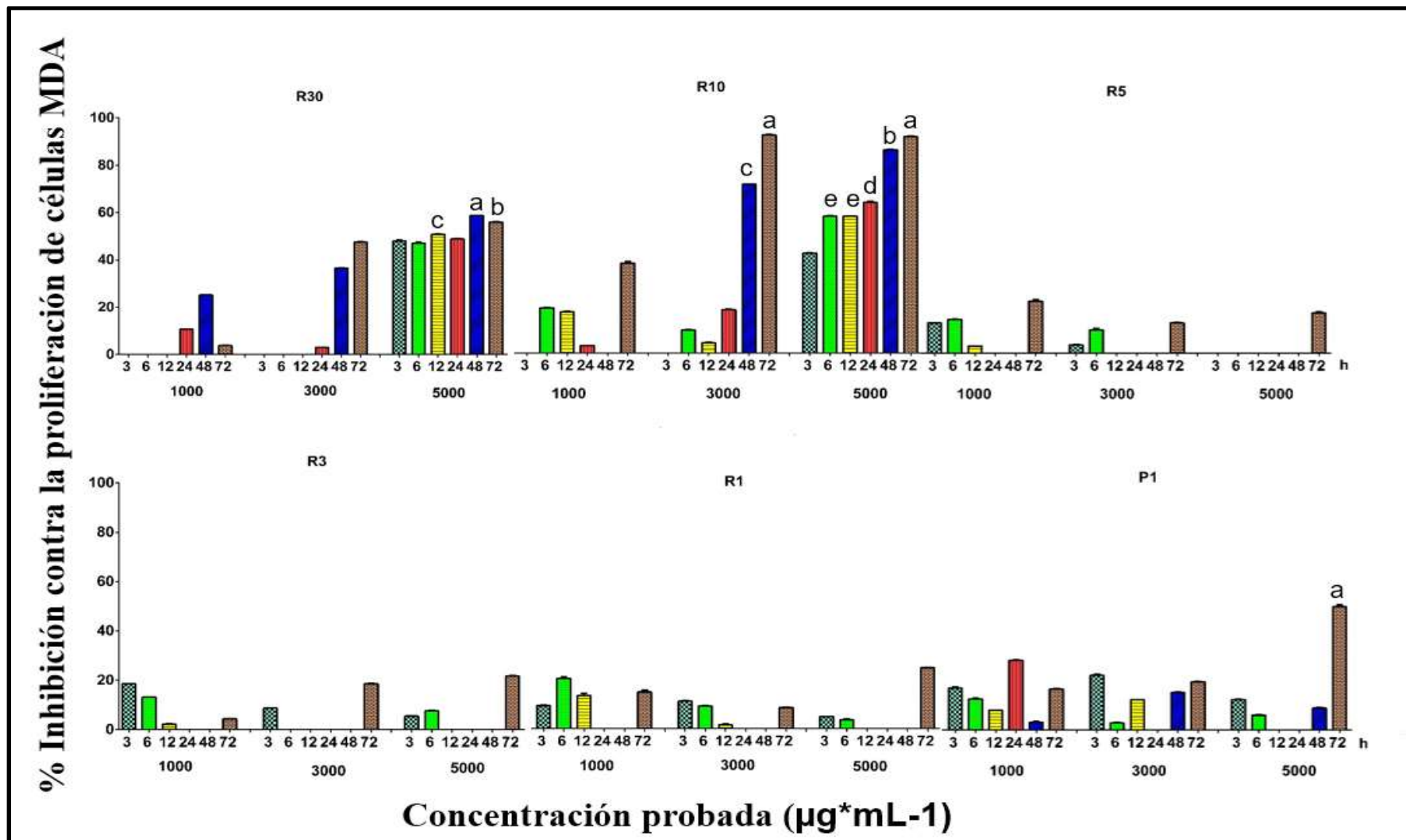


Figura 21. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol negro contra las células MDA.

Letras iguales entre barras indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$

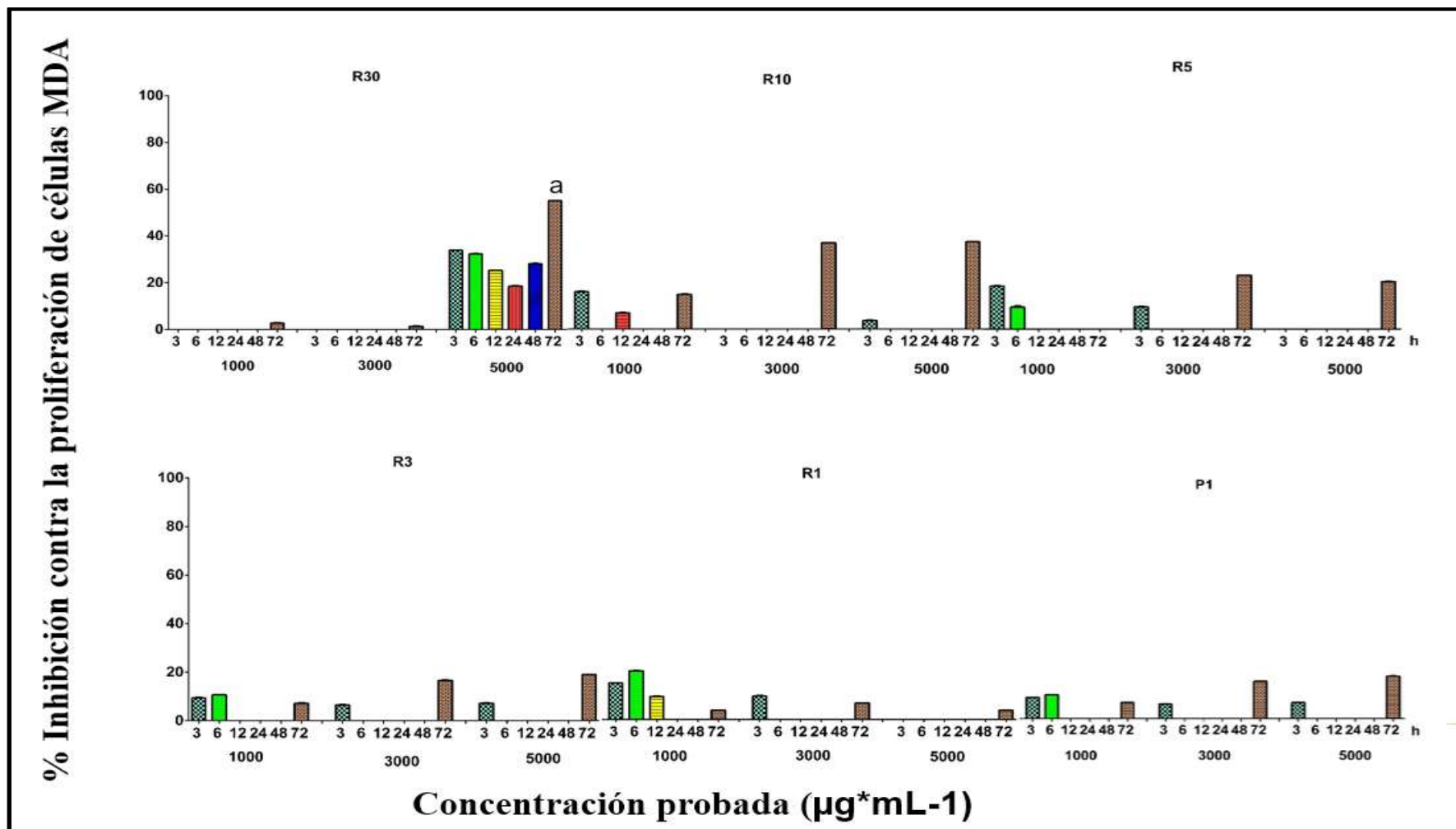


Figura 22. Porcentaje de inhibición de los péptidos de frijol morado contra las células MDA.
Letras iguales entre barras indican que no hay diferencia estadística. $P \leq 0.05$



Tabla 11. Valores del IC₅₀ (µg/mL) de los grupos de péptidos del frijol ayocote de ambas variedades con la prueba MTT en la línea celular MDA.

Grupo de péptidos (kDa)	Frijol ayocote Negro		Frijol ayocote Morado	
	Concentración (µg/mL)	Tiempo de exposición (h)	Concentración (µg/mL)	Tiempo de exposición (h)
P1	NPI	NPI	NPI	NPI
R1	NPI	NPI	NPI	NPI
R3	NPI	NPI	NPI	NPI
R5	NPI	NPI	NPI	NPI
R10	2000	72	NPI	NPI
R30	2000	72	5000	12, 72

NPI- No Presento Inhibición

Con los grupos de péptidos de R5, R3, R1, y P1, de ambas variedades de frijol no se logró alcanzar la IC₅₀ con ninguna concentración y tiempo probado. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Gonzales-Montoya *et al.*, 2016, quien al utilizar péptido de soya geminada contra células MDA-MB-231 y MCF-7, encontró la mayor actividad con los grupos >10 kDa, con un IC₅₀ de 1519 µg/mL y 2000 µg/mL, valores semejantes a los encontrados para los grupos de péptidos de frijol negro.

3.9 Correlación entre la actividad antioxidante–actividad anticancerígena

De acuerdo a los resultados obtenidos en las distintas actividades biológicas que se probaron con los péptidos de ambas variedades se puede observar que los grupos de péptidos que presentaron actividad antioxidante también presentaron inhibición



contras las dos líneas celulares de cáncer lo que indica que existe correlación entre ambas propiedades biológicas (**Tabla 12 y 13**).

Tabla 12. Comparación de la concentración con mayor actividad anticancerígena (SiHa) con las actividad antihipertensiva y antioxidante

Grupos de Péptidos	Concentración (µg/mL)	% Actividad anti proliferativa		% Actividad anti hipertensiva		% actividad antioxidante	
		Negro	Morado	Negro	Morado	Negro	Morado
R30	3000	-	25.1	44.2	81.8	51.09	59.5
	5000	83.83	87.7	61.8	-	66.92	76.1
R10	3000	25.8	30.7	-	-	33.23	52.3
	5000	90.13	23.2	15.7	55.5	46.63	59
R5	3000	42.55	45.3	-	-	12.5	20.9
	5000	50.1	54.4	-	-	25	27.7
R3	3000	54.9	34.3	-	-	7.51	14.1
	5000	51.75	61.7	86.2	-	16.04	20.2
R1	3000	58.55	45.2	-	-	4.85	10.1
	5000	70.41	39.3	70.5	70.5	8.66	15.4
P1	3000	33.6	53.3	-	-	3.27	6.8
	5000	52.05	57.3	23.1	23.1	9.16	12.3

Esta correlación es debida a que se ha demostrado que los compuestos fenólicos también pueden contribuir a la inducción de la muerte de las células cancerígenas a través de un efecto pro-oxidante (Herrera-Calderón, 2014).

En este sentido, se ha descrito que la genisteína actúa de manera sinérgica con el 5-fluorouracilo potenciando la muerte de las células de cáncer de colon inducida



mediante el incremento de la generación de las especies reactivas de oxígeno intracelulares (Aydin *et al.*, 2006). Otro estudio donde se utilizó resveratrol, otro polifenol presente en el vino tinto, mostró la inhibición del crecimiento del cáncer de próstata, mediante la alteración de la mitogénesis (Díaz *et al.*, 2012). De hecho, el empleo de los compuestos fenólicos parece incrementar la eficacia de los fármacos anticancerígenos, lo que permite reducir su dosis, por ejemplo, se ha demostrado que la quercetina disminuye el contenido de glutatión intracelular y potencia la acción apoptótica del trióxido de arsénico (As_2O_3), fármaco que se utiliza frente a la leucemia (Agbor *et al.*, 2006).

Por otra parte, se ha reportado que diversos compuestos fenólicos (genisteína, resveratrol y quercetina) a bajas concentraciones (de 1 a 10 $\mu M/mL$) tienen un efecto antioxidante y antiapoptótico y promueven la proliferación celular. Sin embargo, se sabe que a concentraciones altas (mayores a 100 $\mu M/mL$) actúan como agentes pro-oxidantes y parecen inducir apoptosis de manera selectiva en las células cancerígenas (Herrera-Calderón, 2014).

Finalmente, no se observó una correlación estrecha entre el efecto anticancerígeno y el antihipertensivo de los grupos de péptidos de frijol ayocote negro y morado, no así con el efecto antioxidante y antihipertensivo, ya que en relación a esta, en algunas concentraciones (3000 y 500 $\mu g/mL$) presentaron actividades inhibitorias superiores al 50%, tanto para antioxidantes y como para antihipertensivos, esto podría ser debido a que en algunas investigaciones *in vivo* en pacientes hipertensos confirman que los péptidos antioxidantes podrían modular la presión sanguínea, sabiendo que durante la hipertensión la producción de O_2^- y el H_2O_2 , reducen la síntesis de monóxido de nitrógeno (NO) en el endotelio vascular y la biodisponibilidad de los antioxidantes endógenos (Touyz, 2004). Por tanto, los péptidos antioxidantes podrían ser una buena opción contra la hipertensión.



Tabla 13. Comparación de la concentración con mayor actividad anticancerígena (MDA) con las actividad antihipertensiva y antioxidante

Grupos de Péptidos	Concentración (µg/mL)	% Actividad anti proliferativa		% Actividad anti hipertensiva		% actividad antioxidante	
		Negro	Morado	Negro	Morado	Negro	Morado
R30	3000	38	1.9	44.2	81.8	51.09	59.5
	5000	58	58.5	61.8	-	66.92	76.1
R10	3000	81.7	36.7	-	-	33.23	52.3
	5000	82.2	36	15.7	55.5	46.63	59
R5	3000	16.2	22	-	-	12.5	20.9
	5000	9.4	18.7	-	-	25	27.7
R3	3000	13.7	17.8	-	-	7.51	14.1
	5000	10.7	19.1	86.2	-	16.04	20.2
R1	3000	11.2	9.6	-	-	4.85	10.1
	5000	7.1	6.3	70.5	70.5	8.66	15.4
P1	3000	19.6	12	-	-	3.27	6.8
	5000	36.6	27.5	23.1	23.1	9.16	12.3



CONCLUSIONES

- Los grupos de péptidos de frijol negro presentaron la mayor actividad antihipertensiva fue obtenida con los péptidos R5, mientras que el frijol morado solo mostró actividad con los grupos de péptidos de R30 y R10.
- Los grupos de péptidos del frijol morado presentaron la mayor actividad antioxidante, alcanzando el IC₅₀ con la concentración de menor comparada con los péptidos obtenidos del frijol negro.
- El mayor efecto contra las células SiHa fue producido por los grupos de péptidos R30 del frijol morado.
- El mayor efecto contra las células MDA fue producido por los grupos de péptidos R10 de frijol Negro a la concentración (5000 mg/mL).
- El tiempo y la concentración requeridos para los efectos contra las células SiHa y MDA se ven influidos por la variedad y el peso molecular de las fracciones proteínicas.
- Existe correlación entre la actividad antioxidante, contenido de compuestos fenólicos y actividad anticancerígena de los grupos de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de la proteína de frijol ayocote negro y morado.



BIBLIOGRAFÍA

1. **ACS, 2017.** Tipos de cáncer de seno. Equipo de redactores y equipo de editores médicos de la Sociedad Americana Contra El Cáncer. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/compreension-de-un-diagnostico-de-cancer-de-seno/tipos-de-cancer-de-seno/carcinoma-ductal-in-situ.html>. Consultado febrero 2019.
2. **Agbor, G.; Vinson, J.; Oben, J.; Ngogang, J. 2006.** Comparative analysis of the in vitro antioxidant activity of white and black pepper. *Nutr. Res.* 26, 659-663.
3. **Armstrong, W.B., Kennedy A.R., Wan X.S., Atiba J., McLaren C.E. and Meyskens F.L., 2000.** Single-Dose Administration of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in Patients with Oral Leukoplakia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 43-47,
4. **Armstrong, W.B., Kennedy, A.R., Wan, X.S., Taylor, T.H., Nguyen, Q.A., Jensen, J., Thompson, W., Lagerberg, W. and Meyskens, F.L. 2000.** Clinical Modulation of Oral Leukoplakia and Protease Activity by Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in a Phase IIa Chemoprevention Trial. *Clin. Cancer Res.*, 6, 4684 – 4691.
5. **Austin LaT.T., Ahmad F., McNally M.J., Stewart D. E. 2002.** Breast and Cervical Cancer Screening in Hispanic Women: A Literature Review using the Health Belief Model. *Breast and cervical cancer screening women's health issues.* 12 (3):122-128.
6. **Aydin, A., Arsova-Sarafinowska, Z., Sayal, A., Eken, A., Erdem, O., Erten, K., et al., 2006.** Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem.* 39: 176-179.
7. **Banday, A. A. and Lokhandwala, M. F. 2008.** Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 295, F698-706.
8. **Barac, M.B., S.P. and Stanojevic, M.B., 2005.** Biologically active components of soybeans and soy protein products-A review. *APTEFF.* 36:155-168.
9. **Benavides, M. A., Hernández, V. R. E. M., Ramírez, R. H. y Sandoval, R.A. 2010.** Tratado De Botánica Económica Moderna. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
10. **Bernardino-Nicanor A, Ortíz-Moreno A, Martínez-Ayala A L and Dávila-Ortíz G., 2000.** Guava Seed Protein Isolate: Functional and Nutritional Characterization. *Journal of Food Biochemistry.* 25 :(2001) 77-90.
11. **Billings, P.C., St. Clair, W., Maki, P.A. and Kennedy, A.R. 1992.** Distribution of the Bowman- Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer lett.* 62:191-197.
12. **Bodenheimer T., Wagner E. and Grumbach K., 2002.** Improving primary care for patients with chronic illness. *JAMA.* 288:1775-1779.



13. **Bonafine, O., Cañizares, A. y Laverde, D. 2006.** Importancia de los fitoquímicos en la alimentación. INIA Divulga7. Nutrición humana.
14. **Bosch F., Lorincz A., Meijer C. and Shah K., 2002.** The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*. **55**: 244-265.
15. **Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R. L., Torre L. A. and Jemal A., 2018.** Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J CLIN*. **68**:394–424
16. **Campero L., Atienzo E.E., Marín E., de la Vara-Salazar E. Pelcastre-Villafuerte B., González G., 2014.** Detección temprana de cáncer de mama y cervicouterino en localidades con concentración de población indígena en Morelos. *Salud pública de México*. **56**(5): 511-518.
17. **Campón-Sánchez A., 2010.** Péptidos bioactivos. ¿Moda o realidad? Blog Biotechnology, Chocolate and Milk. Wordpress.
18. **Carey, R. M. and Padia, S. H. 2008.** Angiotensin AT2 receptors: Control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **19**, 84-87.
19. **Castillo-Mendoza M., Ramírez-Vallejo P., Castillo-González F. y Miranda-Colín S., 2015.** Caracterización morfológica y fenológica d especies silvestres de frijol (*Phaseolus*). *Rev. Fitotec. Mex.* **38**(1):17-28.
20. **Castillo-Mendoza M., Ramírez-Vallejo P., Castillo-González F. y Miranda-Colín S., 2006.** Diversidad morfológica de poblaciones nativas de frijol común y Frijol ayocote del oriente del estado de México. *Rev. Fitotec. Mex.* **29** (2): 111 – 119.
21. **Castillo-Yam E., Betancur-Ancona D.A. y Segura-Campos M.R., 2015.** Proteínas de *Mucuna pruriens* con potencial de inhibir el sistema Renina-Angiotensina. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. **10**(1): 123-131.
22. **Chen X., Carystinos G.D. and Batist G., 1998.** Potential for selective modulation of glutathion in cancer chemotherapy. *Chem Biol Interact*. **111-112**: 263-75.
23. **Chen, Y., Huang S., Lin-Shiau S. and Lin J., 2005.** Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **26**(7):1296-1306.
24. **Córdova-Villalobos J.A., Barriguete-Meléndez J.A., Lara-Esqueda A., Barquera S., Rosas-Peralta M., Hernández-Ávila M., de León-May M.E. y Aguilar-Salinas C.A., 2008.** Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud pública de México*. **50**(5).
25. **Crackower, M. A., Sarao, R., Oudit, G. Y., Yagil, C., Kozieradzki, I., Scanga, S. E., Oliveira-Dos-Santos, A. J., Da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C. M., Manoukian, A. S., Chappell, M. C., Backx, P. H., Yagil, Y. and Penninger, J. M. 2002.** Angiotensin-converting enzyme II is an essential regulator of heart function. *Nature*, **417**, 822-828.
26. **Crowley, S. D. and Coffman, T. M. 2012.** Recent advances involving the reninangiotensin system. *Experimental Cell Research*, **318**, 1049-1056.



27. **Cuny M.A.C., Shlichta G.J. and Benrey B., 2017.** The Large Seed Size of Domesticated Lima Beans Mitigates Intraspecific Competition among Seed Beetle Larvae. *Front. Ecol. Evol.* 5:145.
28. **Debouck, D. G., Hidalgo, R., Ospina, O. H. F. y Flor, M. C. A. 1984.** Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*). 2ª edición. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
29. **Del Rio D., Valtuena S., Pellegrini N., Bianchi M.A., Ardigo D., Franzini L., et al., 2009.** Intervention study with a high or low antioxidant capacity diet: effects on circulating b-carotene. *European Journal of Clinical Nutrition.* 5: 63–1220.
30. **Diaz L E, Muñoz D R, Prieto R E, Cuervo S A, Gonzalez D L. Guzman J D, et al., 2012.** Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic Activities of Piper imperiale. *Molecules.* 17, 4142-4157;
31. **Dickson, R. and Lippman, M., 2001** Molecular Biology of Breast Cancer, in Cancer, Principles & Practice of Oncology, H.S. DeVita VT, Rosenberg SA., Editor. Lippincott Williams & Wilkins. 1633-1651.
32. **Durak, A., Baraniak, B., Jakubczyk, A., y Świeca, M. 2013.** Biologically active peptides obtained by enzymatic hydrolysis of Adzuki bean seeds. *Food Chemistry.* 141: 2177–2183.
33. **Escandón, R. C., Benítez, M. M. G., Navarrete, E. J., Vázquez, M. J. L., Martínez, M. O. G. y Escobedo de la Peña, J. 1992.** Epidemiología del Cáncer cervicouterino En El Instituto Mexicano Del Seguro Social. *Salud Pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública.* 34(6): 607-614
34. **Farnaud S. and Evans R.W., 2003.** Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol.* 40:395–405.
35. **Figuroa, G. J. J., Guzmán, M. S. H., Herrera, H. M. G., Rumayor, R. A. F., Alvarado, N. M. D. y Sánchez, T. B. I. 2010.** Botana a base de frijol con alto valor nutricional y nutracéutico. Folleto Técnico. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. (28): 27
36. **Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., et al., 1999.** Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J Biol Chem.* 274:7011–7017.
37. **Flores Y., Bishai D., Lazcano E., Shah K., Lorinez A., Hernández M. and Salmerón J., 2003.** Improving cervical cancer screening in Mexico: Results from the Morelos HPV study. *Salud Pública de México.* 45:388-398.
38. **Fuentes-Pananá, E.; Camorlinga-Ponce, M. y Maldonado-Bernal, C. 2009.** Infección, inflamación y cáncer gástrico. *Salud pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública.* 51(5): 427-433
39. **García-Mora P., 2016.** Producción de hidrolizados proteicos con propiedades antihipertensivas mediante proteólisis y altas presiones hidrostáticas a partir de leguminosas. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.
40. **Giraldo M.L., Ibero G.P, y García H. I., 2013.** Comparación de la toma seriada de presión arterial y la monitorización ambulatoria para el



- diagnóstico de hipertensión esencial en una población colombiana. *Revista colombiana de cardiología*, 20(6), 342-351.
41. **Gómez R., Monteiro H., Cossio-Bolaños M.A., Fama-Cortez D., y Zanesco A., 2010.** El ejercicio físico y su prescripción en pacientes con enfermedades crónicas degenerativas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 27(3): 379-86.
 42. **González-Montoya M., Ramón-Gallegos E., Robles-Ramírez M. del C., and Mora-Escobedo R., 2016.** Evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of three peptide fractions of germinated soybeans on breast and cervical cancer cell lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 368–374.
 43. **González-González R., Dávila-Hernández A. y Santana Portillo J.A., 2015.** Visión panorámica de las enfermedades crónico-degenerativas. *REV INT ACUPUNTURA*. 9(2):57-69
 44. **González-Pier E., Gutiérrez-Delgado C., Stevens G., Barraza-Lloréns M., Porrás-Condey R., Carvalho N., et al. 2007.** Definición de prioridades para las intervenciones de salud en el Sistema de Protección Social en Salud de México. *Salud Publica Mex*;49(supl I):S37-S52.
 45. **Gospodarowicz, M., K.; Cazap, E. and Jadad, A., R. 2009.** Cancer in the world-a call for international collaboration. *Salud pública de México, Instituto Nacional de Salud Pública*. 51(2) 305-308.
 46. **Guevara-Valderrama F.A., 2016.** Los péptidos bioactivos una alternativa natural para disminuir riesgos causados por hipertensión arterial en humanos. Tesis de licenciatura en Alimentos y nutrición. Facultad de ingeniería, Corporación Universitaria Lasallista.
 47. **Gurley, S. B. and Coffman, T. M. 2008.** Angiotensin-converting enzyme 2 gene targeting studies in mice: Mixed messages. *Experimental Physiology*, 93, 538-542.
 48. **Guzmán-Maldonado, S. H. and Paredes- López, O., 1998.** Functional products of plant indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans and botanicals. En *Functional Foods Biochemical & Processing Aspects*. Mazza, G. (ed.). Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA. p. 293-328.
 49. **Hall, J. E., Granger, J. P., Do Carmo, J. M., Da Silva, A. A., Dubinion, J., George, E., Hamza, S., Speed, J. and Hall, M. E. 2012.** Hypertension: physiology and pathophysiology. *Comprehensive Physiology*, 2, 2393- 2442.
 50. **Hanahan D. and Weinberg R.A., 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646–74.
 51. **Handelman G., 2000.** Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif*. 18: 343-9.
 52. **Hangen L. and Bennink, M. R. 2002.** Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane–induced colon cancer in rats. *Nutr. Cáncer* 44:60–65.
 53. **Hankinson, S. and Hunter, D., 2002.** Breast cancer. *Textbook of cancer epidemiology*. 301-39.



54. **Hay R.J., Park J.G. and Gazdar A., 1994.** Atlas of human tumor cell lines. Academic Press, Inc.,
55. **He, R., Aluko, R. E. and Ju, X. R. 2014.** Evaluating molecular mechanism of hypotensive peptides interactions with renin and angiotensin converting enzyme. *PLoS One*, 9, e91051.
56. **Herrera-Calderón O. 2014.** Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Waltheria ovata* Cav. "lucraco" en celular de cáncer de próstata DU-145. Tesis de Maestría en farmacología con mención en farmacología experimental. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
57. **Herrera-Hernández, M., G. y Guzmán-Maldonado, S., H. 2010.** Variedades de frijol contra el cáncer y diabetes. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo del frijol. Fundación Produce Sinaloa, A.C. 27-37
58. **Herrera-Hernández, M., G. y Guzmán-Maldonado, S., H. 2010.** Variedades de frijol contra el cáncer y diabetes. Jornada de transferencia de tecnología del cultivo del frijol. Fundación Produce Sinaloa, A.C. 27-37
59. **Hirshaut, Y. and Pressman, P.I., 1996.** Breast Cancer: The Complete Guide, New York: Bantam Books,
60. **Hondermarck H., 2003.** Review: Breast Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2(5): 281-291.
61. **INC, 2015.** Riesgo de muerte por cáncer de seno es bajo después de diagnóstico de carcinoma ductal in situ. Equipo de redactores Instituto Nacional del Cáncer. https://www.cancer.gov/PublishedContent/Images/images/cancer-types/breast/ductal-carcinoma-in-situ-enlarge-sp_v30048531.jpg. Consultado Febrero 2019.
62. **Kennedy A.R., 1998.** The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr.*, 68(suppl), 1406S-1412S.
63. **López-Martínez L. X., Arrollo-Collantes A. A., Alvarado-López A.N. y Márquez-Pacheco H., 2017.** Propiedades bioactivas de hidrolizados de ayocote (*Phaseolus coccineus* L.). *Avances de la ciencia en México*, Centro de investigaciones en óptica. BCA S1-S5.
64. **Lorke, D., 1983** A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54:275-287.
65. **Luna-Vital D.A., Mojica L., de Mejía E.G., Mendoza S. and Loarca-Piña G., 2015.** Biological potential of protein hydrolysates and peptides from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A review. *Food research international*. 76: 39-50
66. **Manoharan S. and Pugalendhi P. 2010.** Breast cancer: an overview *Journal of Cell and Tissue Research*. 10(3): 2423-2432.
67. **Martínez-Augustin, O. y Martínez de Victoria, M., E. 2006.** Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutrición Hospitalaria*. 21(2):
68. **Martínez-Carpio P.A. y Navarro-Moreno M.Á., 2003.** El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol*. 5(4):184-91
69. **Martínez-Sarrasague Ma., Barrado D. A., Zubillaga M., Hager A., De Paoli T. y Boccio J., 2006.** Conceptos actuales del metabolismo del glutatión



- Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 40(1): 45-54
70. **Mendoza-Jiménez Y. L., Eusebio-Moreno J. C., Álvarez-García R., Abreu-Corona A., Vargas-Hernández G., Téllez-Jurado A., Tovar-Jiménez X., 2018.** Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cv negro primavera-28 y flor de durazno Biotecnia. 20(2): 25-30.
71. **Messina, M. J., 1999.** Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 439S-50S.
72. **Meza-Vázquez K.E., Lépiz-Ildefonso R., López-Alcocer J. de J. y Morales-Rivera M. M., 2015.** Caracterización morfológica y fenológica de especies silvestres De frijol (*Phaseolus*). *Rev. Fitotec. Mex.* 38(1): 17 – 28
73. **Moiseeva E.P., Almeida G.M., Jones G.D. and Manson M., 2007.** Extended treatment with physiologic concentrations of dietary phytochemicals results in altered gene expression, reduced growth, and apoptosis of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* 6 (11):3071–3079.
74. **Monge-Castro C., Duran-Bolanos G., Gamboa-Montero M. y Herrera-Mora G., 2013.** Cáncer de mama inflamatorio: un reto diagnóstico y terapéutico. *Med. leg. Costa Rica* [online]. 30(1): 99-109.
75. **Mora-Escobedo, R., Robles-Ramírez, M. C., Ramón-Gallegos, E., y Reza-Alemán, R. 2009.** Effect of Protein Hydrolysates from Germinated Soybean on Cancerous Cell of the Human Cervix: An *In Vitro* Study. *Plant Foods Hum Nutr.* 64:271–278
76. **Muñoz-Islas L.J., 2010.** Frecuencia De Los Polimorfismos De Los Genes Cyp1a1 Y Cyp1b1 En Mujeres Con Cáncer De Mama, En Jalisco. Tesis de Maestría en Ciencias Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Colima.
77. **Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, Perez P, et al., 1999.** Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Rad Biol Med.* 26 (3-4): 410-8.
78. **Navarro J., Obrador E., Pellicer J.A., Aseni M., Vina J. and Estrela J.M. 1997.** Blood glutathione as an index of radiation- induced oxidative stress in mice and humans. *Free Rad Biol Med.* 22: 1203-9.
79. **Ngai P.H.K. and Ng T.B., 2004.** *Coccinin*, an antifungal peptide with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from large scarlet runner beans. *Peptides* 25: 2063–2068
80. **Oparil, S., Zaman, M. A. and Calhoun, D. A. 2003.** Pathogenesis of hypertension. *Annals of Internal Medicine,* 139, 761-776.
81. **Ortega R., Gómez de Travededo I. y Rubí M.J., 2003.** Adenocarcinoma mucinoso de la mama. *Clínica e Investigación En Ginecología y Obstetricia.* 30(4): 133–136.



82. **Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B. and Ndebele, K. 2014.** The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *International Journal of Inflammation*. Doi:10.1155/2014/689360.
83. **Paredes, L., O.; Guevara, L., F.; Bello, P., L., A. 2006.** Los Alimentos Mágicos De Las Culturas Indígenas Mesoamericanas. FCE, SEP, CONACYT, CAB.
84. **Paredes, O. y Valverde, M., E. 2006.** Los recursos nutraceuticos y medicinales que Mesoamérica le ha dado al mundo. *CINVESTAV*. 25(3): 65-73.
85. **Patrick H.K. Ngai and Ng T.B., 2005.** *Phaseococcin*, an antifungal protein with antiproliferative and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from small scarlet runner beans. *Biochem. Cell Biol.* 83:
86. **Payró de la Cruz, E. 2005.** Diversidad Y Relaciones Genéticas De Poblaciones Silvestres, Arvenses Y Domesticadas De Frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.), En El Área Mesoamericana De Domesticación. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Colima.
87. **Peters, J. 1995.** Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 9, 657-678.
88. **Ramos, H., O., J. 2009.** Detección De Péptidos De Lupino Similares A Lunasina De Soya. Tesis. Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Centro De Desarrollo De Productos Bióticos.
89. **Raya-Pérez J.C., Gutiérrez-Benicio G.M., Ramírez-Pimentel J.G., Covarrubias-Prieto J. y Aguirre-Mancilla C.L., 2014.** Caracterización de proteínas y contenido mineral de dos variedades nativas de frijol de México. **AGRONOMÍA MESOAMERICANA**. 25(1):01-11
90. **Reynoso-Camacho, R., Ramos-Gómez, M. and Loarca-Pina, G. 2006.** Bioactive components in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Adv Agr Food Biotech.* 217- 236.
91. **Reynoso-Noverón N y Torres-Domínguez J.A., 2018.** Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020. *Revista latinoamericana de medicina conductual*. 8(1): 9-15
92. **Riordan, J. F. 2003.** Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biology*, 4, 225-225.
93. **Rivera J.A., Barquera S., Gonzalez-Cossio T., Olaiz G. y Sepulveda J., 2004.** Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries. *Nutr Rev*;62(7 Pt2):S149-S157.
94. **Robles-Ramírez M.C., 2010.** Efecto De La Germinación Sobre Las Propiedades Anticancerosas De La Proteína De Soya. Tesis de Doctorado en ciencias en alimentos. Escuela Nacional De Ciencias Biológicas, Sección De Graduados E Investigación En Alimentos. Instituto Politécnico Nacional.
95. **Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, et al., 2009.** Lactoferrin and cancer disease prevention. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 49:203–217.
96. **Rosabal-Ayan, L., Martínez-González, L., Reyes-Guerrero, Y., Amico-Rodríguez, J. y Núñez-Vázquez, M., 2014.** Aspectos fisiológicos, bioquímicos y expresión de genes en condiciones de déficit hídrico. *Influencia*



- en el proceso de germinación. *Cultivos Tropicales*. 35 (3): 24-35. ISSN 1819-4087
97. **Rosivall, L. 2009.** Intrarenal renin-angiotensin system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302, 185-192.
 98. **Ruíz-Salazar, R. 2009.** Análisis de la Diversidad Genética de *Phaseolus coccineus* L. de la Subprovincia Carso Huasteco de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional.
 99. **Secretaría de Economía, 2012.** Análisis de la Cadena de Valor del Frijol. Dirección General de Industrias Básicas.1-8
 100. **Serrano, J., y Goni, I. 2004.** Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54(1):36-44
 101. **Sherr, C.J. 1996.** Cancer cell cycles. *Science*. 274: 1672-7.
 102. **Sielecki, A. R., Hayakawa, K., Fujinaga, M., Murphy, M. E., Fraser, M., Muir, A.K., Carilli, C. T., Lewicki, J. A., Baxter, J. D. and James, M. N. 1989.** Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science*, 243, 1346-1351.
 103. **Sims A.H., Howell A., Howell S.J. and Clarke R.B., 2007.** *Nat.Clin. Pract.Oncol.*, 4: 516-525
 104. **Smith HS, Wolman SR, Dairkee SH, et al., 1987.** Immortalization in culture: occurrence at late stage in the progression at breast cancer. *J Natl Cancer Inst*;78:611-5.
 105. **Sweitzer, N. K. 2003.** Cardiology patient page. What is an angiotensin converting enzyme inhibitor? *Circulation*, 108, e16-18.
 106. **Tanaka T., Kawabata K., Kohno H., et al., 2000.** Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Jpn J Cancer Res*. 91:25–33.
 107. **Torruco J., 2009.** Efecto antihipertensivo de fracciones peptídicas bioactivas obtenidas a partir de frijol lima (*Phaseolus Lunatus*) y frijol jamapa (*Phaseolus Vulgaris*). Tesis de doctorado Escuela nacional de ciencias biológicas.
 108. **Torruco-Uco, J., G.; Domínguez-Magaña, M., A.; Dávila-Ortíz, G.; Martínez-Ayala, A.; Chel-Guerrero, L., A.; Betancur-Ancona, D., A. 2008.** Péptidos Antihipertensivos, Una Alternativa De Tratamiento De Origen Natural: Una Revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos*. 6(2):158-168.
 109. **Tousoulis, D., Androulakis, E., Papageorgiou, N. and Stefanadis, C. 2012.** Novel therapeutic strategies in the management of arterial hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 135, 168-175.
 110. **Trossero, C., Caffarena, G., Hure, E. y Rizzotto, M. 2006.** Detección de Mutagenicidad en Compuestos N-Nitroso con el Test de Ames. *Acta Farm. Bonaerense*. 25 (1): 139-44
 111. **Touyz, R. M. 2004.** Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension*, 44, 248-252



112. **Vallejo-Zamudio E., Rojas-Velázquez A. y Torres-Bugarín O., 2017.** Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. *El Residente*. 12(3): 104-111.
113. **Vargas, V., P.; Alvarado, M., S.; Muruaga, M., J., S.; Guillén, A., H.; Ortega, A., J.; Montero, T., V.; Acosta, G., J. y Azpíroz, R., H., S. 1998.** Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Centro. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. G027.
114. **Vargas-Vázquez, P.; Muruaga-Martínez, J., S.; Martínez-Villarreal, S., E.; Ruiz-Salazar, R.; Hernández-Delgado, S. y Mayek-Pérez, N. 2011.** Diversidad morfológica del frijol ayocote del Carso Huasteco de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 767-775.
115. **Yang N., Lejon T. and Rekdal O., 2003.** Antitumour activity and specificity as a function of substitutions in the lipophilic sector of helical lactoferrin-derived peptide. *J Pept Sci*. 9:300–311.
116. **Zhang Y., Lima C.F., and Rodrigues L.R., 2014.** Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutrition Reviews*. 72(12):763–773



Cytotoxic and genotoxic activity of protein isolate of ayocote beans and anticancer activity of their protein fractions

Gerardo Teniente-Martínez^{1,2} · Aurea Bernardino-Nicanor² · Raquel Carriño-Cortés² · María del Carmen Valadez-Vega³ · José Luis Montañez-Soto⁴ · Gerardo Acosta-García² · Leopoldo González-Cruz²

Received: 4 July 2018 / Accepted: 20 December 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

We evaluated the cytotoxic and genotoxic effects of protein isolates of ayocote beans on adult male CD1⁺ mice and the anticancer activity of their protein fractions using SiHa Cells. The mice that received protein isolate showed a Polychromatic Erythrocytes (PCE) increase at 48 h; a significant PCE decrease was observed in mice administered the protein isolate-Daunorubicin (isolate-DAU) mix. A micronucleated erythrocytes (MNE) increase was observed in mice that received the mix in all times tested. All protein fractions of ayocote beans (black and purple) showed inhibition against SiHa cells proliferation at doses of 3000 or 5000 µg/mL. The maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of each protein fraction was reached at a concentration of 5000 µg/mL. A synergistic effect of isolate-DAU was observed in the in vivo test; the effect of the protein fractions on SiHa cells proliferation depended of the ayocote bean variety used.

Keywords Ayocote bean · Cytotoxic · Genotoxic · Protein fractions · SiHa cells

Introduction

A low incidence of cancer is associated with the consumption of compounds from vegetables and fruits [1], principally associated with the consumption of nutraceutical foods. In recent years, an increasing interest in the use of dietary botanical supplements for the prevention and adjuvant therapy on cancer treatment has been observed. Generally, these botanical supplements (fruits and vegetables) are rich

in phenolic compounds, carotenoids, chlorophyll, vitamins, fiber and proteins, which have antimutagenic and/or anticarcinogenic properties. Several studies have demonstrated the potential of proteins for cancer prevention [2, 3] being the leguminous, an important source of vegetable protein due to their high protein content (20 to 30%) [4]. Other studies have demonstrated that the protein hydrolysates and peptides of the leguminous have a high biological potential [3, 5, 6]. The *Phaseolus* genus is the most important food legume consumed in the countries of Central America, South America, Central Africa and East Africa [7] because they contain a high concentration of starch and protein. In particular, the ayocote bean (*Phaseolus coccineus*), is a cultivated specie of the genus *Phaseolus*, with exceptional characteristics for several reasons. First, it is a perennial species and can live up to 30 years; however, in Mexico and Central America, it usually cultivated as an annual crop in areas that experience harsh winters. Second, it readily produces seeds for future crops due that their flowers are easily fertilized by hummingbirds [8]. In particular, evidence has shown that the *Phaseolus* genus is a promissory source of nutraceutical proteins and peptides to inhibit several types of cancer [9, 10]. Ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) is a legume with a high nutraceutical potential due to its high content of protein (> 30%) [11]; however, few studies have researched

✉ Leopoldo González-Cruz
leopoldo.gonzalez@hidalgo.uaf.mx

¹ Doctorado en Ciencias en Ingeniería Biotécnica, Tecnológico Nacional de México-Celaya, Antonio García Calles Pta #610 esq. Av. Tecnológico, A. P. 57, C. P. 38010 Celaya, Guanajuato, México

² Tecnológico Nacional de México-Celaya, Antonio García Calles Pta #600 esq. Av. Tecnológico, A. P. 57, C. P. 38010 Celaya, Guanajuato, México

³ Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ex-Hacienda de la Concepción, Tixtlaucilla, 42080 Pachuca de Soto, Hidalgo, Mexico

⁴ Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Michoacán, Justo Sierra N° 28, C. P. 59510 Iquique, Michoacán, México



Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL FRJOL AYOCOTE (*Phaseolus coccineus* L.).

Teniente-Martínez G.^a, González Cruz L.^a, Carillo-Cortés R.^b, Bernardino-Nicanor A.^a

a) Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N A.P 57. C.P 38010. Celaya, Gto, México.

b) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Ex-hacienda la Concepción, Tlilcuautla Código Postal: 42160, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. * aureabernardino@yahoo.com

Resumen

Actualmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, por lo que se ha buscado el uso de componentes nutraceuticos de origen vegetal para su tratamiento, tal es el caso de los péptidos bioactivos obtenidos principalmente de las leguminosas, siendo el género *Phaseolus*, una de las fuentes más importantes, sin embargo existen algunas variedades de este género que aún no han sido estudiadas y que podrían ser fuente promisoría de compuestos bioactivos, entre las cuales se encuentra el Frjol ayocote (*Phaseolus coccineus*), por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la colecta sobre la composición química del frjol así como la capacidad citotóxica de los péptidos generados de la hidrólisis enzimática del aislado proteínico. El análisis químico proximal mostró que la colecta de frjol negro (23.8 % b.s) contiene mayor cantidad de proteína que el frjol morado (21.9% b.s), mientras que el contenido de cenizas, grasa y carbohidratos son superiores en el frjol morado que en el negro, el punto isoelectrico de la proteína de ambas colectas se encuentra en un pH de 4.0. Finalmente, los aislados no mostraron toxicidad hasta 5000 mg/kg en ratón CD1⁺ por vía oral.

Abstract

Currently, cancer is a leading cause of death in the world, so we have sought the use of nutraceutical compounds of plant origin for treatment, as in the case of bioactive peptides derived mainly from legumes, being the genus *Phaseolus*, one of the most important sources, but there are some varieties of this genus that have not been studied and could be a promising source of bioactive compounds, including the ayocote bean (*Phaseolus coccineus*) is found, for this reason, the objective of this research was to evaluate the influence of the variant on the chemical composition of the bean and the cytotoxic capacity of the peptides generated from enzymatic hydrolysis of protein isolate. The proximate analysis showed that the black variant (23.8 % db) contains more protein than the purple variant (21.9 % db), while the ash content, fat and carbohydrates are higher in the purple variant than in the black variant, the isoelectric focusing of the protein in both variants was pH 4.0. Finally, the isolates did not have toxicity to 5000 mg/kg in mice orally CD1⁺.

Palabras clave: Péptidos bioactivos, Antimutagénica, *Phaseolus coccineus*.

Área: Cereales, Leguminosas y Oleaginosas

Teniente-Martínez et al. / Vol. 1, No. 1 (2016) 1-6

1



El Tecnológico Nacional de México
En Celaya a través del Departamento de
Ingeniería Bioquímica

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A

Teniente Martínez, G., González Cruz, L., Juárez Golz, JMS., Bernardino Nicanor, A.

Por la presentación del trabajo científico:

"Caracterización nutracéutica de péptidos bioactivos de dos variedades de frijol ayocote"

Que se llevó a cabo dentro de las actividades del **III Congreso Nacional de Posgrado de Ingeniería Bioquímica**, celebrado del 5 al 7 de diciembre

Celaya, Gto., a 7 de diciembre de 2018


DR. HUGO JIMÉNEZ ISLAS
COORDINADOR DEL
CONGRESO


DR. LEOPOLDO GONZÁLEZ
CRUZ
COORDINADOR DE POSGRADO


IBQ TERESÁ SÁNCHEZ
PÉREZ
JEFA DEL DEPARTAMENTO





LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN Y LA
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Otorga a

Teniente-Martínez G., Valadez-Vega Ma. C., González-Cruz L., Cariño-Cortés R., Juárez-Goiz J.M.S., Bernardino-Nicanor A.

la presente

Constancia

por su participación en el trabajo en MODALIDAD CARTEL, con título:

"Actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos de péptidos de dos variedades de frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*)"

presentado en

XX CONGRESO NACIONAL de Ciencia y Tecnología de Alimentos
V CONGRESO INTERNACIONAL sobre Innovación y Tendencias en Procesamiento de Alimentos

Realizado el día 23 al 25 de Mayo del 2018 en el Auditorio Dr. Reyes Tamez Guerra de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

M. C. . Karla Guadalupe
García Alanís
Jefa de la L.C.A.
Coord. del Congreso F.C.B.

Dr. Juan Gabriel Báez
González
Jefe del Depto. Alimentos
Coord. del Congreso F.C.B.

Dra. Ma. del Rosario
Abraham Juárez
Directora del Depto. Alimentos
Coord. del Congreso U de Gto.



El Tecnológico Nacional de México
en Celaya a través del departamento de ingeniería bioquímica

Extiende la presente

Constancia

A

Teniente-Martínez G., Medina-Galvan M.I., González-Cruz L., Juárez-Goiz J.M.S., Bernardino-Nicanor A. y Cariño-Cortés R.B.

Autores del trabajo libre

Caracterización de las proteínas del frijol ayocote (Phaseolus coccineus L.).

Por su valiosa participación en la exposición del trabajo libre en la modalidad cartel durante la XXV Jornada de Ingeniería Bioquímica.

Celaya, Gto., 25 de octubre de 2017

I.B.Q. Teresa Sánchez Pérez
Jefe del Departamento de
Ingeniería Bioquímica



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE CELAYA
INGENIERÍA
BIOQUÍMICA

Dr. Micael Gerardo Bravo Sánchez
Coordinador General



REGISTRO NACIONAL DE INSTITUCIONES DE EDUCACIÓN SUPERIOR