



**EFFECTO DE BIOPÉPTIDOS ANTIOXIDANTES DERIVADOS DE LA
ALBÚMINA 1 DEL GRANO DE AMARANTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO *EX*
VIVO PARA PIEL HUMANA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

P R E S E N T A:

E. en B. ADRIANA ORTIZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE SORIANO SANTOS

MEXICO D.F.

MARZO 2013

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

Esta tesis forma parte del proyecto “Planta piloto para la producción de hidrolizados proteicos del grano de amaranto a fin de elaborar alimentos funcionales” financiado por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) con clave: PIV11-13

El presente proyecto de investigación se realizó en colaboración con la Secretaría de Salud y Centro Nacional de Transfusión Sanguínea (CNTS).

México D.F. a 15 de Marzo del 2013

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

EFFECTO DE BIOPÉPTIDOS ANTIOXIDANTES DERIVADOS DE LA ALBÚMINA 1 DEL
GRANO DE AMARANTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO *EX VIVO* PARA PIEL HUMANA

que presentó

Adriana Ortiz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Asesor: Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Jurado:

Presidente: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino

México D.F. a 15 de Marzo del 2013

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

EFEECTO DE BIOPÉPTIDOS ANTIOXIDANTES DERIVADOS DE LA ALBÚMINA 1 DEL
GRANO DE AMARANTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO *EX VIVO* PARA PIEL HUMANA

que presentó

Adriana Ortiz Hernández

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Asesor: Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Jurado:

Presidente: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Secretario: Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana

Vocal: Dr. Francisco José Fernández Perrino

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre Miguel Ángel Ortiz Gallegos quien me enseñó a seguir adelante sin importar que tan mal estén las cosas, a luchar por lo que se quiere hasta el último momento. Muchas gracias papá, siempre estarás en mi corazón.

A mi madre Beatriz Hernández Ortiz que siempre estuvo a su lado sin importar cual difícil fuera. Quien siempre me ha apoyado estando a mi lado en las buenas y en las malas, enseñándome que siempre hay alternativas para lograr lo que se busca.

AGRADECIMIENTO

A mi esposo Erik que a su manera siempre me ha apoyado, me ha dado consejos y ha estado conmigo en los momentos más difíciles siendo mi apoyo y compañía cuando creía que ya no me era posible continuar. Muchas gracias por tu amor y por la familia que hemos formado. Te amo.

A mis hijos Elizabeth y Cedric, por haber llegado a mi vida y ser el motivo que siempre me impulsa a seguir adelante y superarme cada día a pesar de las adversidades.

A mis hermanos Beatriz y Miguel Ángel, con los que siempre he contado brindándome su apoyo y cariño. Peor ya no nos puede ir, poco a poco nos irá mejor.

A mi abuela Teresa y a mi tía Rosario, que siempre me brinda su apoyo, estando a mi lado a cada paso que doy.

A mi abuelo Arturo, mis tíos y primos: pero especialmente a Javier, Rocina, Arturo, Eugenio, Héctor, Guadalupe, Marisol y Alejandra por brindarme su amor y cariño a lo largo de mi vida.

A Patricia, que llegó a mi vida justo cuando más lo necesitaba mostrándome su apoyo desde el primer momento. Así como Angélica y Raúl por su apoyo y amistad.

Pero sobre todo agradezco a la vida por darme tantas enseñanzas, por poner en mi camino a tantas personas buenas y malas, porque gracias a ello he aprendido mucho. Pero sobre todo porque gracias a ello cada tristeza o alegría me ha vuelto más fuerte.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Al Dr. Jorge Soriano Santos por permitirme ser parte se du equipo de investigación.

A la Dra. Luz Alcántara Quintana por el apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo, por todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo por su confianza y dedicación.

A la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela, Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía y Dr. José Ramón Verde Calvo por toda la ayuda que me han brindado.

Al coordinador de posgrado, Dr. José Francisco Fernández Perrino a quien agradezco todo el apoyo que me ha brindado, muchas gracias.

Al Dr. Ignacio Lugo Beltrán del Servicio de Cirugía Plástica de la Unidad 20 de Noviembre ISSSTE, así como a la Dra. María del Pilar Rivera quienes nos proporcionaron las biopsias de piel humana para la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Dra. Elvia Coballase investigadora del Instituto Nacional de Pediatría, quien colaboro con el desarrollo la investigación con sus conocimientos y permitiéndonos utilizar sus instalaciones.

RESUMEN

La piel es uno de los órganos más grandes de la anatomía humana, llega a medir y pesar 170-200 cm² y 15-17 kg, respectivamente. Tiene como función principal proteger los órganos internos del cuerpo contra los efectos nocivos provocados por agentes oxidantes exógenos. Cada capa que la compone (epidermis, dermis e hipodermis) tiene funciones específicas, que regulan los efectos adversos causados por los radicales libres. A estos efectos se les conoce como envejecimiento cutáneo, definido como “acumulación de moléculas dañinas a través del tiempo”. Durante este proceso se produce un deterioro de funciones biológicas propias de la piel, lo que se traduce en una menor capacidad de adaptación al estrés metabólico, tornándose más fina, pálida, redundante y con arrugas.

Se sabe que la exposición excesiva de la piel a la radiación UV solar acelera el proceso de envejecimiento, causando inflamación, estrés oxidativo y daños en ADN y ARN, entre muchas otras deficiencias que inician trastornos en la piel, como arrugas prematuras, descamación, sequedad, hipopigmentación, hiperpigmentación e incluso diferentes tipos de cáncer de piel. Aunado a lo anterior, se da la oxidación de lípidos, por la que los ácidos grasos no saturados presentes en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales libres, formando hidroperóxidos. Las reacciones de lipoperoxidación se favorecen por la presencia de agentes promotores, como los iones metálicos Cu y Fe (reacción de Fenton) y luz UV, entre otros. Para contrarrestar los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno se utilizan antioxidantes, que pueden ser clasificados en exógenos (suministrados por la dieta) y endógenos (presentes en el organismo).

La industria se ha dado a la tarea de desarrollar productos que ayuden a prevenir la acción de los radicales libres en la piel humana, por lo que en los últimos años se ha observado un aumento en el desarrollo de productos nutricosméticos, cuya característica principal es ser productos de consumo oral que, además de proporcionar beneficios a la salud de la piel, complementan la nutrición de la persona que los consume.

Debido a lo anterior, en la presente tesis se propuso evaluar los efectos protectores de la albúmina 1 y sus hidrolizados contra el estrés oxidativo de la piel humana inducido por la exposición prolongada a rayos UV. Partiendo de harina desengrasada del grano de amaranto, la extracción de proteínas se realizó con Na₂SO₄ (5%) y precipitación con

(NH₄)₂SO₄. La albúmina 1 fue obtenida por diálisis en agua, y posteriormente hidrolizada con alcalasa (2.4 mUA/mL) en tiempos de 24, 36 y 48 h, en solución de búfer de fosfatos (0.5 M, pH 7.4, 50°C). Los hidrolizados se caracterizaron de acuerdo a su peso molecular relativo y al contenido de especies peptídicas, utilizando SDS-PAGE y Tris-tricina-SDS-PAGE, así como cromatografía de filtración en gel (Sephadex G-15, G-50 y G-200).

La evaluación de efectos protectores contra el estrés oxidativo en piel se realizó en biopsias de piel (n=6, mujeres saludables, 25-35 años) que fueron distribuidas en cuatro grupos de tratamiento para cada muestra a probar (albúmina nativa e hidrolizados de 24, 26, y 48 h) en presencia de medio DMEM, con una concentración de muestras de albúmina 1 y sus respectivos hidrolizados de 100 µg/mL. Los grupos fueron: piel no expuesta a radiación UV (control negativo, C), piel no expuesta a radiación UV más la muestra de tratamiento (G₁), piel expuesta a radiación UV (control positivo, G₂) y piel expuesta a radiación UV más la muestra de tratamiento (G₃). Los diferentes grupos de tratamiento fueron incubados durante 72 h (humedad controlada, 5% CO₂, 37°C). Al término de este tiempo, las muestras de piel fueron colocadas en solución Tripsina-EDTA (0.025% de tripsina bovina y 0.01% de EDTA) para ser homogenizadas (37°C, 4 días) y se determinó la actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, así como la concentración de malondialdehído.

En los resultados obtenidos se observó que la distribución de especies hidrológicas de la albúmina 1 (clasificadas de acuerdo a su peso molecular relativo) presentes en los hidrolizados de 24, 36 y 48 h es variada, destacando la presencia de un mayor porcentaje de especies peptídicas <5 kDa. Al medir los efectos protectores de la albúmina 1 y sus hidrolizados se observó que la actividad enzimática antioxidante de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa se mantiene de forma significativa en presencia de cada muestra ensayada, sin mostrar diferencias significativas (p<0.05) en los efectos protectores entre cada una de ellas. Al medir la concentración de malondialdehído (indicador de lipoperoxidación) presente en los cultivos de piel para cada grupo de tratamiento, se observó una disminución muy clara de la misma, lo que indica que tanto la albúmina 1 como sus hidrolizados inhiben de forma significativa (p<0.05) el proceso de lipoperoxidación que se lleva a cabo en la piel tras la exposición prolongada a la radiación UV.

De acuerdo con todo lo anterior, se propone a la albúmina 1 del grano de amaranto y sus hidrolizados con actividad antioxidante como principio activo, pudiendo ser utilizados en

la formulación de nutricosméticos con efectos protectores en la actividad de enzimas antioxidantes e inhibición de lipoperoxidación (además de constituir una buena fuente de aminoácidos esenciales). Estos resultados podrían servir, además, para incentivar el cultivo de este grano, que ha disminuido en los últimos años.

ABSTRACT

The skin is the largest organs of the human anatomy; it can measure and weigh up to 170-200 cm² and 15-17 kg, respectively. Its main function is to protect the internal organs against noxious stimuli caused by exogenous oxidant agents. Each layer of the skin (epidermis, dermis, and hypodermis) has specific functions that regulate the adverse effects caused by free radicals. These effects are known as cutaneous aging, defined as: "accumulation of damaging molecules along time." During this process, there is a deterioration of the skin's biological functions that is reflected by a lower adaptation capacity to metabolic stress, becoming thinner, pale, redundant and wrinkled.

It is known that excessive exposure of the skin to UV radiation accelerates the aging process causing inflammation, oxidative stress, DNA and RNA damage, among many other deficiencies that start as alterations of the skin, such as: premature wrinkles, desquamation, dryness, hypopigmentation, hyperpigmentation, and even diverse types of skin cancer.

Besides the aforementioned, there is oxidation of lipids, where the non-saturated fatty acids present in phospholipids of cell membranes are attacked by free radicals forming hydroperoxides. Lipoperoxidation reactions are favored by the presence of promoting agents such as metal Cu and Fe ions (Fenton reaction), UV radiations, among others. To counteract the noxious effects of reactive oxygen species (ROS), antioxidants are used, that can be classified as exogenous (provided by the diet) and endogenous (present in the organism).

Industries have dedicated great effort to the development of products to help prevent the actions of free radicals on human skin, which has led in the last years to an increase in nutricosmetic products characterized by being orally consumed that, besides providing benefits to skin's health, complement the nutrition of the person ingesting them.

Based on the aforementioned, the present thesis was aimed at evaluating the protective effects of albumin 1 and its hydrolyzates against the oxidative stress produced on the human skin by prolonged exposure to UV radiation.

Proteins were extracted from defatted flour of the amaranth grain with Na₂SO₄ (5%) and precipitated (NH₄)₂SO₄. Albumin 1 was obtained by water dialysis, and was hydrolyzed

with alcalasa (2.4 mUA/mL) at 24, 36, and 48 h in phosphate buffered solution (0.5 M, pH 7.4, 50°C). Hydrolyzates were characterized according to their relative molecular weight and contents of peptide species, using SDS-PAGE and Tris-tricine-SDS-PAGE, as well as gel filtration chromatography (Sephadex G-15, G-50 and G-200).

Evaluation of the protecting effects against oxidative stress in the skin was performed by means of skin biopsies (n=6, healthy women, 25-35-year-old) that were distributed in four treating groups for each sample to be tested (native albumin 1 and its hydrolyzates of 24, 26, and 48 h) in the presence of DMEM medium, with a concentration of 100 µg/mL of albumin 1 samples and their respective hydrolyzates. Groups were: skin not exposed to UV radiation (negative control, C), skin not exposed to UV radiation plus the treatment sample (G₁), skin exposed to UV radiation (positive control, G₂), and skin exposed to UV radiation plus the treatment sample (G₃). The treatment groups were incubated during 72 h (controlled humidity, 5% CO₂, 37 °C). At the end of this time, skin samples were placed in Trypsin-EDTA solution (0.025% bobine trypsin and 0.01% EDTA) to be homogenized (37°C, 4 days) and the enzymatic activities of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase were determined, as well as the concentration of malondialdehyde (MDA).

Results revealed that the distribution of the hydrological species, classified according to their relative molecular weight, present in the 24-, 36, 48-h-hydrolyzates is very varied, pointing out the presence of a higher percentage of <5 kDa species. Measurement of the protective effects of albumin 1 and its hydrolyzates revealed that the antioxidant enzymatic activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase is kept significantly for each of the assayed samples, without showing significant differences (p<0.05) among them. Measurement of the concentration of malondialdehyde (indicator of lipoperoxidation) present in the skin cultures for each treatment group revealed a very clear effect in the diminution of MDA, indicating that both albumin 1 and its hydrolyzates inhibited significantly (p<0.05) the lipoperoxidation process that occurs in the skin due to prolonged exposure to UV radiation.

Based on the aforementioned results we propose albumin 1 from the amaranth grain and its hydrolyzates with antioxidant activity as an active component that can be used in the formulations of nutricosmetics with protecting effects on the activity of antioxidant enzymes and inhibition of lipoperoxidation, as well as a good source of essential amino acids. At the

same time, we propose to stimulate the cultivation of this grain, which has decreased in the last years.

 ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIAS.....	IV
AGRADECIMIENTO	V
AGRADECIMIENTO ESPECIAL.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	X
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
1. La piel.....	1
1.1 Envejecimiento, fotoenvejecimiento y enfermedades de la piel	2
1.2 La radiación solar ultravioleta y la piel	4
1.3 Estrés oxidativo en la piel.....	7
1.4 Lipoperoxidación	8
1.5 Naturaleza de las especies reactivas de oxígeno (ERO).....	10
1.6 Mecanismos antioxidantes en la piel	13
1.6.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1).....	14
1.6.2 Catalasa (EC 1.11.1.6).....	15
1.6.3 Glutación peroxidasa (CE 1.11.1.19).....	16
1.6.4 Efectos de radicales libres sobre las enzimas antioxidantes	17
2. Cosmecéticos, nutracéuticos y nutricosméticos	18
2.1 Cosmecéticos.....	18
2.2 Nutracéuticos	18
2.3 Nutricosméticos.....	19
3. Industria nutricosmética	19
3.1 Características del mercado mundial de nutricosméticos	20
3.2 Compuestos más utilizados por la industria nutricosmética.....	24
3.2.1 Vitaminas.....	24
3.2.2 Péptidos en nutricosméticos	26
3.2.3 Antioxidantes de origen natural.....	26
3.3 Pruebas para la evaluación de los nutricosméticos y cosmecéticos	27
4. Amaranto	28

4.1 Composición química del amaranto.....	28
4.2 Producción nacional de amaranto	30
4.3 Usos del amaranto y necesidades de investigación	31
5. Investigaciones relacionadas	32
5.1 Péptidos bioactivos de fuentes naturales y su uso potencial como nutricosméticos	32
5.2 Péptidos bioactivos del grano de amaranto	33
5.3 Estrés oxidativo en piel humana.....	35
6. Justificación	37
7. Hipótesis.....	38
8. Objetivo general.....	39
8.1 Objetivos particulares	39
9. Materiales y métodos.....	40
9.1 Molienda del grano de amaranto	41
9.2 Desengrasado de harina de amaranto	41
9.3 Extracción de albúmina 1 del grano de amaranto.....	41
9.4 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa	42
9.5 Determinación del grado de hidrólisis.....	43
9.6 Electroforesis SDS-PAGE	44
9.7 Electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE.....	46
9.8 Cromatografía por filtración en gel.....	48
9.9 Cultivos organotípicos de piel humana	48
9.10 Aplicación de tratamientos en cultivos organotípicos de piel humana.....	49
9.11 Sistemas antioxidantes en cultivos organotípicos de piel humana.....	50
9.11.1 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa.....	51
9.11.2 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante catalasa	52
9.11.3 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa.....	53
9.11.4 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	55
9.12 Modelo y análisis estadístico	56
10. Resultados y discusión	57
10.1 Extracción de albúmina 1 del grano de amaranto.....	57
10.2 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa	58
10.3 Perfiles electroforético de la albúmina 1 del grano de amaranto y sus hidrolizados...	59
10.4 Cromatografía por filtración en gel.....	61

10.5 Sistemas antioxidantes en cultivos organotípicos de piel humana.....	64
10.5.1 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa	64
10.5.2 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante catalasa	67
10.5.3 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa.....	69
10.5.4 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	71
10.5.5 Comparación de efecto protector	73
11. Conclusiones	76
12. Recomendaciones	78
13. Anexos.....	79
Anexo 1. Curva patrón de albúmina sérica bovina	79
Anexo 2. Curva patrón de L-leucina	80
Anexo 3. Curvas patrón de marcadores para filtración en gel	81
Anexo 4. Composición del DMEM.....	84
Anexo 5. Solución de Tripsina / EDTA.....	85
Anexo 6. Curvas patrón de ensayos enzimáticos	85
Anexo 7. Composición de aminoácidos en la secuencia de albúmina del grano de amaranto.....	88
Anexo 8. Análisis estadístico.....	88
14. Bibliografía.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la piel humana (Pappinen y col., 2012).	1
Figura 2. Niveles de penetración de los rayos UV en la estructura de la piel (Nichols y Katiyar, 2010).	5
Figura 3. Reacciones que se llevan a cabo durante en el proceso de lipoperoxidación (Morales J. A. C. y col., 2009).	9
Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Morales J. A. G. y col., 2009).	10
Figura 5. Principales especies reactivas de oxígeno que se forman en el organismo humano (Bartosz, 2009).	11
Figura 6. Diversos factores que intervienen en la formación de radicales libres causando daños estructurales en biomoléculas coadyuvado en padecimientos de enfermedades crónico degenerativas (Morales J. A. G. y col., 2009).	12
Figura 7. Sistema antioxidante endógeno formado por enzimas reductoras de radicales libres: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Tabor y Blair, 2009).	14
Figura 8. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa que reduce al superóxido a peróxido de hidrógeno (Tabor y Blair, 2009).	14
Figura 9. Reacción catalizada por la enzima antioxidante catalasa (Morales J. A. G. y col., 2009).	15
Figura 10. Reacción catalizada por la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (Tabor y Blair, 2009).	16
Figura 11. Relación de cosmeceúticos, nutracéuticos y nutricosméticos (Tabor y Blair, 2009).	19

Figura 12. Producción Nacional del grano de amaranto (Morales G. J. C. y col., 2009; SAGARPA, 2010)	30
Figura 13. Predicción de posibles bioactividades presentes en la secuencia de la proteína del grano de amaranto y la frecuencia con la que se presentaría cada una de ellas (Silva y col., 2008).	34
Figura 14. Desarrollo experimental para de evaluación de antioxidante <i>ex vivo</i> de la albúmina 1 nativa y sus hidrolizados.	40
Figura 15. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa (Adler-Nissen, 1979).	43
Figura 16. Arreglo de tratamientos para cada biopsia utilizada en cultivos de piel humana. .	50
Figura 17. Reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (Wada y col., 2011).	55
Figura 18. Perfiles electroforéticos de albúmina 1 nativa y sus hidrolizados enzimáticos de 24, 36 y 48 h. a) SDS-PAGE y b) Tris-Tricina-SDS-PAGE.....	60
Figura 19. Perfiles cromatográficos de la composición de especies hidrolíticas en hidrolizados de albúmina 1 obtenidos utilizando una columna de Sephadex G-50.	62
Figura 20. Perfiles cromatográficos de la composición de especies peptídicas de los hidrolizados de albúmina 1 (Sephadex G-15 y G-200).....	63
Figura 21. Efecto protector de la albúmina nativa y sus hidrolizados (24, 36 y 48 h) en la actividad enzimática antioxidante de superóxido dismutasa.	66
Figura 22. Actividad enzimática de la enzima antioxidante catalasa en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados en cultivos de piel humana.....	68
Figura 23. Actividad enzimática de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados en cultivos de piel humana.....	70
Figura 24. Concentración de malondialdehído medido en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados probados en cultivos de piel humana.	72

Figura 25. Comparación de los efectos de tratamientos en la actividad de enzimas
antioxidantes ensayadas. 74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos nutricosméticos que se comercializan en diferentes países (Tabor y Blair, 2009).	22
Tabla 2 (continuación). Productos nutricosméticos que se comercializan en diferentes países (Tabor y Blair, 2009).	23
Tabla 3. Péptidos sintéticos utilizados en cosmeceúticos (Zhang y Talla., 2009).....	26
Tabla 4. Composición química del grano de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L. (Konishi y col., 1985; Bressani y col., 1987).....	29
Tabla 5. Orden de adición de reactivos para la hidrólisis de albúmina 1 del grano de amaranto con alcalasa.....	42
Tabla 6. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE.....	44
Tabla 7. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE	45
Tabla 8. Composición de búfer muestra para electroforesis SDS-PAGE	45
Tabla 9. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE	46
Tabla 10. Composición de los geles para electroforesis Tris-SDS-PAGE	47
Tabla 11. Composición del búfer de muestra para electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE	47
Tabla 12. Grupos de tratamientos a los que fueron sometidos cada uno de los explantes de piel humana.	49
Tabla 13. Grado de hidrólisis de AN obtenidos con alcalasa.....	58
Tabla 14. Clasificación de especies hidrológicas de las fracciones obtenidas por cromatografía por filtración en gel Sephadex G-50 de los hidrolizados de albúmina 1 del grano de amaranto.	61

1. La piel

La piel es el órgano más grande de la anatomía humana; en un adulto, puede tener una superficie y un peso aproximado de 170-200 cm² y de 15-17 kg, respectivamente, dependiendo de la edad y dimensiones del sujeto. La piel tiene como función principal proteger los órganos internos del cuerpo, actuando como barrera eficaz contra los efectos perjudiciales tanto del medio ambiente como de agentes xenobióticos (Nichols y Katiyar, 2010). Está estructurada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (figura 1).

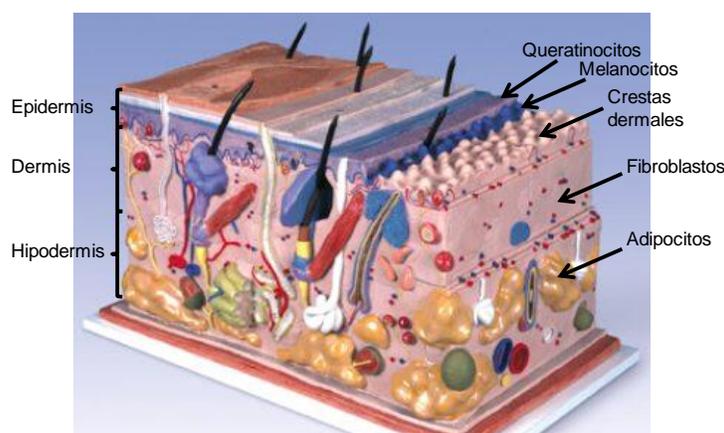


Figura 1. Estructura de la piel humana (Pappinen y col., 2012).

La epidermis es la capa externa de la piel que está en contacto con el medio ambiente. Su función es proteger a los órganos internos de las condiciones ambientales a las que es sometido el cuerpo humano, cuenta con células especializadas que se encargan de esta función, conocidas como queratinocitos (Zhang y Falla, 2009; Zahouani y col., 2011; Pappinen y col., 2012).

Los queratinocitos son células de división rápida y las más abundantes en la epidermis. En ellos se forma la queratina y son los encargados de realizar el proceso de renovación de la epidermis. Otras células especializadas localizadas en la epidermis son los

melanocitos, células que poseen dendritas que se infiltran entre los queratinocitos (Tabor y Blair, 2009; Zhang y Falla, 2009; Jair y col., 2011; Pappinen y col., 2012).

La dermis es la capa central de la piel, cuya función es actuar como soporte. Su espesor varía dependiendo del área en que se localiza: un ejemplo de ello es la zona de los ojos, la cual es más delgada, y la espalda, donde es más gruesa. Esta capa de piel se hace más delgada con el paso de los años. A diferencia de la epidermis, en la dermis se pueden observar nervios y vascularizaciones. La célula más abundante en esta capa es el fibroblasto, que sintetiza fibras de colágeno, constituido por prolina, hidroxiprolina y glicina, así como elastina, cuya función es dar a la piel soporte interno y elasticidad (Giacomoni, 2008; Robert y col., 2008; Zhang y Falla, 2009).

La hipodermis es una capa compuesta por lóbulos adiposos (adipocitos) separados por tejido conectivo. Contiene arterias y venas infiltradas, los cuales son responsables de la nutrición de las capas de piel (Zhang y Falla, 2009). La hipodermis cumple con una función similar a la de un amortiguador, ya que se encuentra entre las dos primeras capas de la piel (dermis-epidermis) y los órganos internos del cuerpo humano (Tabor y Blair, 2009).

La unión entre la epidermis-dermis está formada por algunas inflexiones de la dermis (papilas dermales) y extroversiones de la epidermis (crestas epidérmicas) cuya interface se conoce como membrana basal. Dicha interconexión es la barrera encargada del intercambio y semipermeabilidad entre estas dos capas de la piel (y como consecuencia también entre el medio ambiente y los órganos internos), aunque presenta variaciones de acuerdo a la zona en que se encuentre: por ejemplo, es más acentuada en la planta de los pies y plana en el área de la frente (Tabor y Blair, 2009).

1.1 Envejecimiento, fotoenvejecimiento y enfermedades de la piel

La piel, como se mencionó anteriormente, no sólo asume funciones fisiológicas importantes, sino que también representa una interfaz social entre las personas. Por esta razón, los individuos muestran mayor interés en cuanto a modificaciones que la piel sufre por la edad, así como a las investigaciones que surgen para contrarrestar los efectos del envejecimiento (Robert y col., 2008).

Por otro lado, el proceso de envejecimiento natural sufrido por la piel se ha definido como la acumulación de moléculas dañinas a través del tiempo (Giacomoni y Rein, 2004; Muller y col., 2007; Giacomoni, 2008), que está estrechamente relacionada con las condiciones de vida de cada individuo. Durante el proceso de envejecimiento cutáneo se produce un deterioro de las funciones biológicas propias de la piel, lo que determina una menor capacidad para adaptarse al estrés metabólico como resultado del daño ambiental, generación de radicales libres (RL) y la exposición continua a radiaciones solares. Debido a los factores mencionados, la piel se torna más fina, pálida, redundante y aparecen arrugas (López y col., 2003; Benkhail y col., 2011; Robbins y Zhao, 2011).

Desde el punto de vista bioquímico, el envejecimiento cronológico de la piel se debe La piel, como se mencionó anteriormente, no sólo asume funciones fisiológicas importantes, sino que también representa una interfaz social entre las personas. Por esta razón, los individuos muestran mayor interés en cuanto a modificaciones que la piel sufre por la edad, así como a las investigaciones que surgen para contrarrestar los efectos del envejecimiento (Robert y col., 2008).

Por otro lado, el proceso de envejecimiento natural sufrido por la piel se ha definido como la acumulación de moléculas dañinas a través del tiempo (Giacomoni y Rein, 2004; Muller y col., 2007; Giacomoni, 2008), que está estrechamente relacionada con las condiciones de vida de cada individuo. Durante el proceso de envejecimiento cutáneo se produce un deterioro de las funciones biológicas propias de la piel, lo que determina una menor capacidad para adaptarse al estrés metabólico como resultado del daño ambiental, generación de radicales libres (RL) y la exposición continua a radiaciones solares. Debido a los factores mencionados, la piel se torna más fina, pálida, redundante y aparecen arrugas (López y col., 2003; Benkhail y col., 2011; Robbins y Zhao, 2011).

Desde el punto de vista bioquímico, el envejecimiento cronológico de la piel se debe fundamentalmente a una disminución en la producción de colagena por parte de los fibroblastos de la dermis. A la vez se incrementa su degradación como consecuencia de la sobreexpresión de las metaloproteinasas, enzimas con actividad proteolítica responsables de la degradación de esta proteína. Los fibroblastos envejecidos tienen una menor capacidad de proliferación y expresan una menor cantidad del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) responsable de la síntesis de colágeno tipo I, principal colágeno presente en la piel. La

exposición solar, aún en dosis mínimas, incrementa la actividad de las metaloproteinasas. La colagena es una proteína que desaparece lentamente, siendo sustituida por grandes cantidades de elastina, que se acumula como consecuencia del efecto de la inflamación crónica que subyace en la piel fotoexpuesta. La elastina contribuye a inhibir a dicha proteasa, que se une a las fibras elásticas en un intento de evitar su degradación por parte de elastasas procedentes de los neutrófilos presentes en la inflamación que ocurre tras la exposición solar (Ho y col., 2006; Tabor y Blair, 2009; Benkhai y col., 2011).

Cuando la piel ha sido expuesta de forma continua y reiterada a las radiaciones solares, los cambios fisiológicos normales se aceleran y se acentúan. Se producen alteraciones debidas al fotoenvejecimiento. En estos casos, las arrugas son más gruesas como acentuadas y se producen anomalías en la pigmentación, que determinan la aparición de léntigos seniles (hiperpigmentación) y melasma (hipermelanosis), aumento de orificios de salida de la unidad pilosebácea y cambios de elastosis que se traducen en una piel gruesa, sin brillo y de coloración cetrina o amarillenta (Ho y col., 2006).

1.2 La radiación solar ultravioleta y la piel

El primer conocimiento del efecto del sol sobre el envejecimiento de la piel se produjo cuando se compararon los cuellos de los marineros con los de las monjas, observándose diferencias en textura y pigmentación. Otra consecuencia de la exposición excesiva a la radiación solar es la elastosis nodular o enfermedad de Favre-Racouchot, que consiste en la aparición de quistes y erupciones en las partes expuestas de la piel (Giacomoni y col., 2004).

Para conocer los efectos de los rayos UV en la piel, en los últimos años se han utilizado diversos estudios epidemiológicos, clínicos y de laboratorio sobre las enfermedades de la piel, envejecimiento prematuro y cáncer de piel del tipo melanoma y no melanoma. Gracias a ellas, se sabe que la exposición excesiva de la piel a la radiación UV causa inflamación, estrés oxidativo, daño en el ADN y ARN, entre muchas otras deficiencias (Katiyar y col., 2001; Rodríguez y col., 2001), deficiencias que inician trastornos en la piel tales como arrugas prematuras, descamación, sequedad, hipopigmentación,

hiperpigmentación y diferentes tipos de cáncer de piel (Nichols y Katiyar, 2010; Jair y col., 2011).

Aunque muchos factores ambientales y genéticos contribuyen al desarrollo de enfermedades de la piel (El Mesallamy y col., 2011), el factor más importante es la exposición crónica a la radiación solar (UV). El desarrollo de estas patologías es debido a que durante el proceso de exposición solar se forma mayoritariamente oxígeno singlete (1O_2), especie reactiva de oxígeno (ERO). Dichas moléculas son capaces de absorber radiación UV A y B y son de rápida reacción, teniendo como blanco a sus moléculas vecinas y causando desequilibrios en las estructuras celulares (Giacomoni, 2008). Otros RL formados durante la exposición a los rayos UV son el radical hidroxilo (OH^\cdot) e hidropéroxido (HO_2^\cdot) (Muller y col., 2007). La radiación solar puede ser dividida en tres grupos, con base en su longitud de onda, que van a afectar a las capas de la piel de formas diferentes (figura 2) (Rijnkels y col., 2003; Kim y col., 2010):

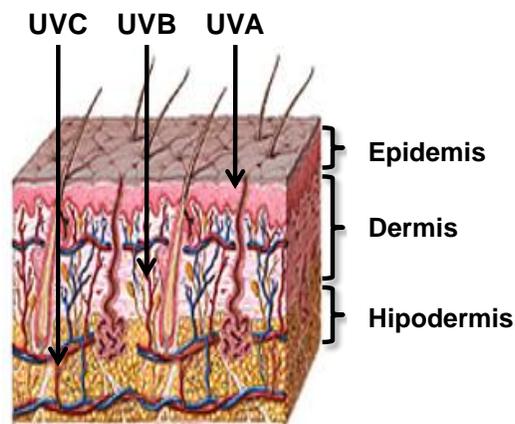


Figura 2. Niveles de penetración de los rayos UV en la estructura de la piel (Nichols y Katiyar, 2010).

Onda corta (UVC, 200-290 nm). En gran parte es absorbida por la capa de ozono en la atmósfera, por lo que normalmente no llega a la superficie de la Tierra. Puede penetrar la piel a una profundidad aproximada de 60 a 80 μm y es causante de daño y mutaciones en las moléculas de ADN (Katiyar y col., 2001).

Onda media (UVB, 290-320 nm). Constituye aproximadamente el 5% del total de la radiación solar UV y es la principal responsable de una gran variedad de enfermedades. Puede penetrar la piel a una profundidad aproximada de 160 a 180 μm , cruza toda la capa de la epidermis y parte de la dermis de la piel humana. Estimula tanto efectos biológicos adversos, directos e indirectos, como la inducción de estrés oxidativo, daño al ADN, envejecimiento prematuro, cáncer de piel, múltiples efectos en el sistema inmune y puede funcionar como iniciador, promotor y co-cancerígeno en la formación de tumores (Giacomoni y Rein, 2004).

Onda larga (UVA 320-400 nm). Comprende la mayor parte del espectro de radiación solar (90-95%), penetra las tres capas llegando hasta la hipodermis, con una profundidad de aproximadamente 1000 μm . Se ha demostrado que la amplia exposición a estos rayos puede conducir a la formación de tumores tanto benignos como malignos. De igual forma, inducen la generación de oxígeno singlete y radicales hidroxilo, causantes de daños a macromoléculas tales como proteínas, lípidos y ADN. Su acción mutagénica y carcinogénica está mediada por ERO, por lo que se puede considerar una fuente significativa de estrés oxidativo en la piel humana, provocando con ello el fotoenvejecimiento caracterizado por flacidez de la piel, arrugas prematuras y supresión de algunas funciones inmunes (Nichols y Katiyar, 2010).

Actualmente se conocen tres formas de actuar contra el fotoenvejecimiento:

1. Prevención Primaria. Consiste en la utilización de fotoprotectores tópicos.
2. Prevención Secundaria. Se utilizan el ácido retinoico y antioxidantes en cremas, geles o en forma de suplementos orales.
3. Prevención Terciaria. Se utilizan diferentes métodos en clínicas, aplicados por un profesional: *peelings*, microdermoabrasión, láser, toxina botulínica y rellenos (GEDCyT, 2007).

Los complementos nutricionales refuerzan los sistemas naturales de la piel para hacer frente al envejecimiento. Los nutrientes pueden actuar a nivel de la piel como fotoprotectores, moduladores de la respuesta inmune, o pueden efectuar una acción terapéutica en algunas patologías cutáneas. Los principales nutrientes con efectos sobre la

piel son las vitaminas, carotenoides, compuestos fenólicos, probióticos y ácidos grasos poliinsaturados u omega 3 (ω -3; Robbins y Zhao, 2011).

1.3 Estrés oxidativo en la piel

En la última década se ha observado un incremento en los padecimientos de enfermedades crónicas degenerativas, que en el pasado eran escasas y casi nulas. El aumento en el número de personas que las padecen se debe a diversos factores, como las condiciones de vida, alimentación, uso de productos químicos, consumo de cigarro, entre muchas otras. Estas enfermedades se han convertido en un problema tan grave que se ha llegado al punto en que ya se consideran un problema de salud pública, siendo la causa de un alto índice de mortalidad. En 2008 se reportaron 66,500 muertes causadas por neoplasias (Rodríguez y col., 2001; Sistema Nacional de Información en Salud, 2008).

Las enfermedades crónicas degenerativas son aquéllas que degradan física y/o mentalmente a las personas que las padecen, provocando que los órganos o tejidos pierdan sus características propias. La causa de muchas ellas es el estrés oxidativo, definido por la mayoría de los autores como el “desequilibrio entre la producción de RL y la capacidad del sistema biológico de detoxificar o reparar el daño resultante” (Jae y col., 2007; Muller y col., 2007; Benkhail y col., 2011; Jair y col., 2011). Los primeros efectos dependerán de la magnitud de los cambios que se llevan a cabo y de si la célula es capaz de superar las perturbaciones, recuperando su estado original. Una vez que el daño está muy avanzado se presenta la muerte celular (apoptosis) y/o el proceso de necrosis (Chandra y col., 2003; Dammak y col., 2007; Dooley y col., 2012).

La piel también se ve afectada por el estrés oxidativo, ya que de acuerdo con la “teoría del envejecimiento” (Chandra y col., 2003; López y col., 2003; Robbins y Zhao, 2011), la reacción de los RL generados por el metabolismo aeróbico normal del organismo inician los cambios observados en el proceso de envejecimiento. Estos efectos son inicialmente contrarrestados por los sistemas antioxidantes endógenos: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), junto con los antioxidantes exógenos: vitamina E (α -tocoferol), precursores de la vitamina A (β -carotenos), vitamina C (ácido ascórbico),

coenzima Q₁₀ (ubiquinona) y glutatión reducido (GSH), entre muchos otros (Matés, 2000; Robbins y Zhao, 2011).

1.4 Lipoperoxidación

La oxidación de los lípidos es un proceso mediante el cual los ácidos grasos no saturados presentes en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por RL, formándose hidroperóxidos. Asimismo, es uno de los procesos perjudiciales que ocurren en la mayoría de organismos vivos, provocando daños en moléculas fundamentales para el funcionamiento de los mismos. La oxidación ocurre cuando un átomo cede un electrón a otro átomo distinto mediante el proceso de reducción (Badui, 2006; Wada y col., 2011).

Las reacciones de lipoperoxidación se favorecen por la presencia de agentes promotores, como los iones metálicos Cu y Fe (reacción de Fenton) y luz UV, entre otros. Los RL y otras especies reactivas son capaces de extraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso saturado generando un radical lipídico (R[•]), el cual puede reaccionar con O₂ dando lugar a un radical peroxilo (ROO[•]). Los radicales peroxilo contribuyen a la propagación de las reacciones en cadena de peroxidación lipídica, sustrayendo átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos insaturados cercanos y generando así nuevos radicales lipídicos (R[•]) e hidroperóxidos lipídicos (ROOH). Estos últimos se descomponen en radicales alcoxilo (RO[•]) y peroxilo (ROO[•]), contribuyendo a la propagación del daño oxidativo (figura 3) (Matés, 2000; Badui, 2006; Morales J. A. G. y col., 2009).

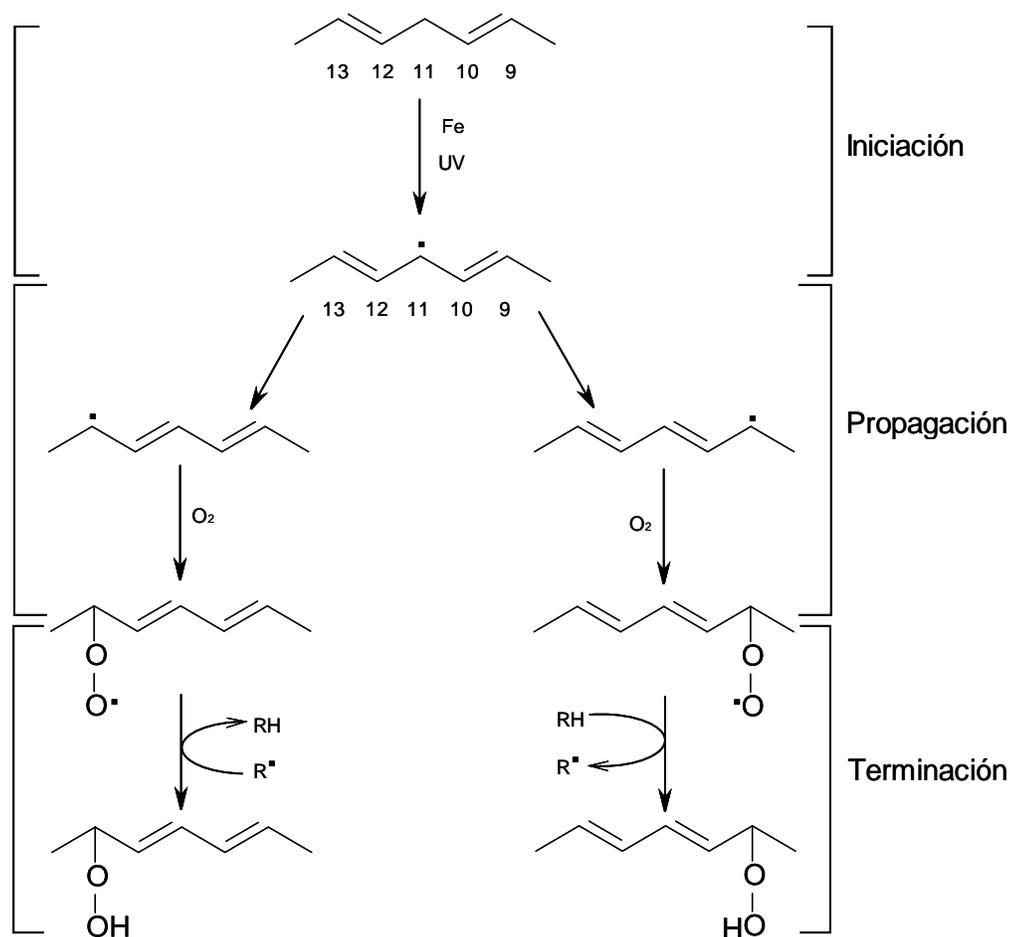


Figura 3. Reacciones que se llevan a cabo durante en el proceso de lipoperoxidación (Morales J. A. C. y col., 2009).

Existen varias formas de medir la lipoperoxidación, una de ellas es la medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, técnica que se basa en la reacción del tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA). Este método es utilizado por ser práctico y sencillo. Otra alternativa es la medición de otros aldehídos procedentes de la lipoperoxidación, como es el caso del 4 hidroxinonenal, susceptible de ser medido por HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) acoplado a un detector ultravioleta. Una posibilidad adicional es la cuantificación de hidrocarburos volátiles en el aire expirado (principalmente etano y pentano), derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series ω -3 y ω -6. Por último, también puede utilizarse la medición de

compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación, como la lipofuscina, producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos (Pérez y Pérez, 2000; Obregón y col., 2007; Wada y col., 2011).

1.5 Naturaleza de las especies reactivas de oxígeno (ERO)

El oxígeno molecular es relativamente no reactivo, pero las especies químicas derivadas de él son propensas a participar en reacciones derivadas del metabolismo aeróbico, que se lleva a cabo principalmente en las mitocondrias (figura 4) (Morales J. A. G. y col., 2009; Tabor y Blair, 2009; Benkhail y col., 2011).

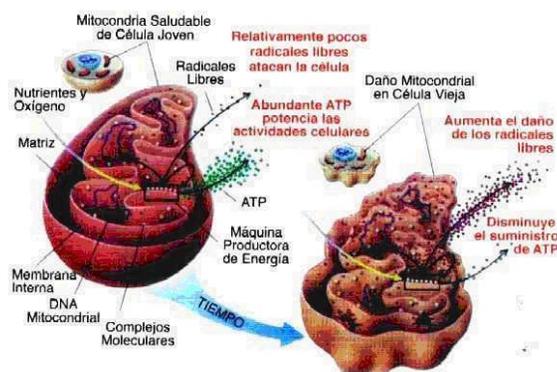


Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Morales J. A. G. y col., 2009).

Entre estas especies se incluye al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que reacciona principalmente con metales y grupos azufre. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), otra ERO, es un oxidante débil que ataca principalmente tioles. Por otro lado, la reacción del radical superóxido con óxido nítrico (NO) produce peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), un oxidante fuerte. La reacción de H_2O_2 con iones metálicos produce radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Estas son, por mencionar algunas, las especies más reactivas que se producen *in vivo* (figura 5). Las ERO

reaccionan de manera indiscriminada con biomoléculas de todas las clases, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono; reacciones que pueden infligir daño oxidativo, causante de mutaciones en el ADN, inactivación de proteínas y muerte celular (Pérez y col. 2000; Chandra y col., 2003; Bartosz, 2009; Benkhail y col., 2011; Dooley y col., 2012).

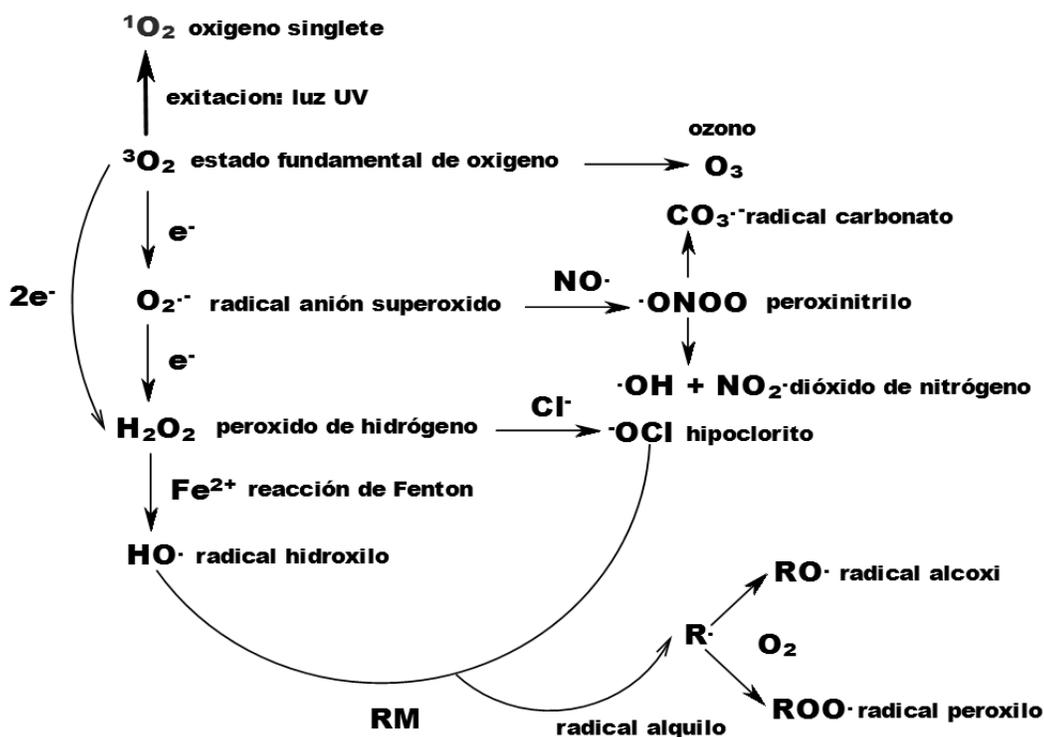


Figura 5. Principales especies reactivas de oxígeno que se forman en el organismo humano (Bartosz, 2009).

Se define a un RL como una molécula muy reactiva (oxidada) que intenta robar un electrón de moléculas estables, convirtiéndolas a su vez en RL. Estos RL no sólo dañan a las células, ya que nuestro cuerpo los fabrica en cantidades moderadas para contrarrestar los ataques de bacterias y virus (Morales J. A. G. y col., 2009). Los RL que no son utilizados

con este fin son neutralizados por nuestro sistema, el cual produce sus propios mecanismos de defensa (figura 6), aunque que en algunos casos son proporcionados por la dieta (Dooley y col., 2012).

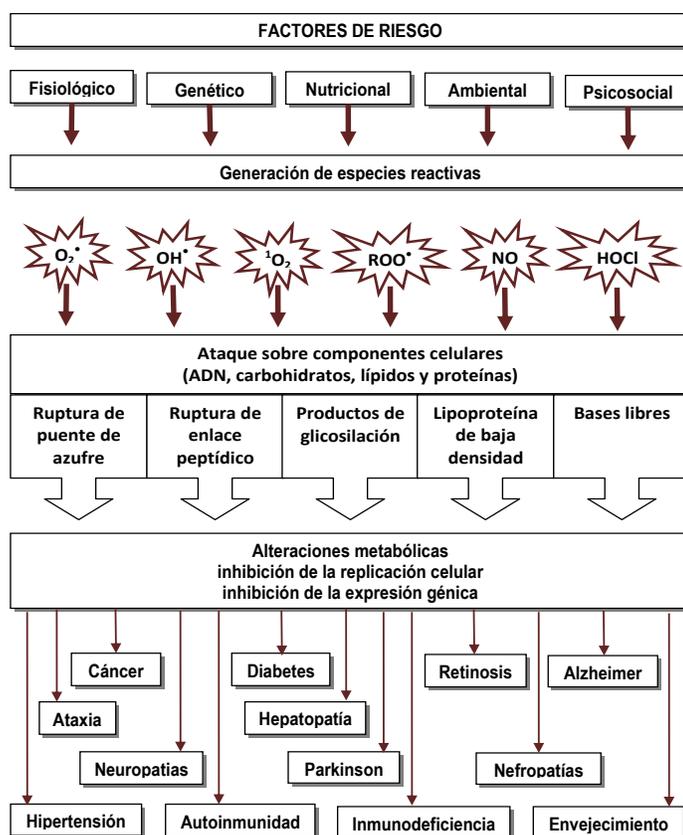


Figura 6. Diversos factores que intervienen en la formación de radicales libres causando daños estructurales en biomoléculas coadyuvado en padecimientos de enfermedades crónico degenerativas (Morales J. A. G. y col., 2009).

Los complementos nutricionales refuerzan los sistemas de la piel para hacer frente al envejecimiento, aunque también actúan como moduladores de la respuesta inmune o efectúan una acción terapéutica en algunas patologías cutáneas.

1.6 Mecanismos antioxidantes en la piel

Como se mencionó con anterioridad, la piel posee un sistema de defensa antioxidante encargado de hacer frente a la radiación UV solar que induce el estrés oxidativo. Sin embargo, la exposición excesiva a los rayos UV puede mermar la capacidad antioxidante cutánea (antioxidantes endógenos), por lo que el consumo regular de antioxidantes en la dieta o el tratamiento de la piel con cremas y lociones (antioxidantes exógenos) ha sido sugerido como una estrategia útil de prevención contra los efectos mutagénicos y carcinogénicos de la radiación UV (Katiyar y col., 2001; Rijnkels y col., 2003; Benkhai y col., 2011; Pileggi y col., 2011).

La ERO que más se produce en el estrés oxidativo de la piel es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), subproducto de diversas enzimas, siendo la más importante la xantina oxidasa (que lo forma a partir de xantina después de la exposición del tejido a la hipoxia). La aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, así como la óxido nítrico sintasa, lo pueden producir en su estado desacoplado, ocasionado por el déficit de cofactores (Bartosz, 2009; Robbins y Zhao, 2011).

Los antioxidantes enzimáticos presentan ciertas ventajas frente a los compuestos antioxidantes, ya que su actividad se regula de acuerdo con los requerimientos celulares y su función dependerá de efectores endógenos (Morales J. A. G. y col., 2009).

Por su parte, las células humanas están equipadas con enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD para manejar peróxidos y superóxidos, respectivamente, pero no hay defensa enzimática endógena contra el oxígeno singlete (Sun, 1990; Giacomoni, 2008; Benkhai y col., 2011; Pileggi y col., 2011). Estos sistemas endógenos de origen enzimático tienen la función de reducir a las ERO del organismo humano, evitando los efectos adversos sobre las macromoléculas. Las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) forman un sistema acoplado de reducción de radicales (figura 7).

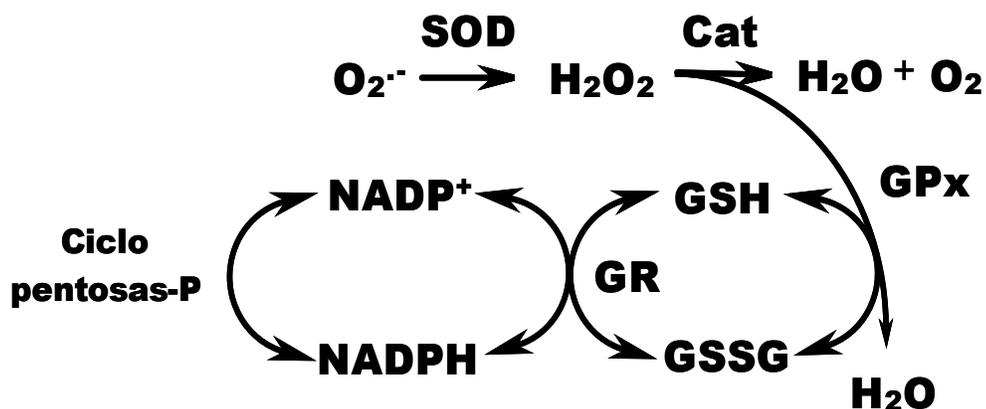


Figura 7. Sistema antioxidante endógeno formado por enzimas reductoras de radicales libres: superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Tabor y Blair, 2009).

1.6.1 Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)

Las SOD son un conjunto de metaloproteínas presentes en células aerobias y fluidos extracelulares, cuya función es la dismutación del superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como se muestra en la figura 8. La SOD presenta tres isoformas, dependiendo del metal que contenga su sitio activo: SOD-Cu, SOD-Zn y SOD-Mn. Las dos primeras se localizan en el citosol y la tercera en la matriz mitocondrial. La biosíntesis de la enzima SOD se encuentra regulada por su sustrato ($O_2^{\cdot-}$).



Figura 8. Reacción catalizada por la superóxido dismutasa que reduce al superóxido a peróxido de hidrógeno (Tabor y Blair, 2009).

El $O_2^{\cdot -}$ es generado de forma constante por la respiración aerobia, específicamente por la cadena de transporte de electrones que se lleva a cabo en la mitocondria. El superóxido reduce el Fe^{+3} a Fe^{+2} , lo que libera el hierro de los lugares de almacenamiento, de modo que pueda reaccionar con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para producir el radical hidroxilo (OH^{\cdot} ; Matés y col., 1999; Barroso y col., 2003).

1.6.2 Catalasa (EC 1.11.1.6)

Las CAT son una de las más eficientes enzimas conocidas, al grado que no pueden ser saturadas por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en cualquier concentración. Se encuentran presentes en todos los órganos principales del cuerpo, pero especialmente en el hígado y los eritrocitos. Tienen como función principal proteger a las células del H_2O_2 que se genera dentro de ellas. A pesar de no ser una enzima esencial para una célula en condiciones normales juega un papel importante en la adquisición de la tolerancia en la adaptación de las células al estrés oxidativo (Sun, 1990; Matés, 2000).

Una CAT es una hemoproteína tetramérica formada por cuatro subunidades idénticas, y por lo tanto cuatro grupos hemo; se encuentra principalmente en los peroxisomas y mitocondrias. Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que proviene de la dismutación del superóxido para formar agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2) (figura 9), función que comparte con la enzima GPx. De forma general, se sabe que la presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 estimula la actividad de las peroxidasas, así como que altas concentraciones estimulan la actividad de la CAT, activándola para que lleve a cabo la degradación del H_2O_2 (Sun, 1990; Matés, 2000; Morales J. A. G. y col., 2009).



Figura 9. Reacción catalizada por la enzima antioxidante catalasa (Morales J. A. G. y col., 2009).

1.6.3 Glutatión peroxidasa (CE 1.11.1.19)

Es una selenoproteína localizada en el citosol y la matriz mitocondrial. Requiere la presencia de glutatión (GSH) como agente reductor para catalizar la reducción de H_2O_2 y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol (figura 10), protegiendo así a las células contra el daño oxidativo. Su sitio activo tiene selenio (Se), en forma de selenocisteína incorporada a una cadena polipeptídica. Se conocen cuatro isoformas de GPx: la primera de ellas GPx celular que se localiza en casi todas las células. La segunda isoforma, la GPx plasmática o extracelular, es una glicoproteína que se sintetiza en las células tubulares proximales del riñón. La tercera isoforma es la GPx fosfolípido hidroperóxido, que tiene como función biológica proteger contra la peroxidación lipídica, reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad; es la única isoforma que contiene un solo residuo de selenocisteína. Finalmente, el cuarto tipo es conocido como GPx gastrointestinal, enzima con mayor dependencia del GSH, y es muy importante en la reducción de hidroperóxidos de colesterol, ayudando a prevenir la intoxicación por consumo de hidroperóxidos lipídicos (Matés, 2000; Tabor y Blair, 2009).

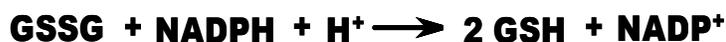


Figura 10. Reacción catalizada por la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (Tabor y Blair, 2009).

Una cuestión clave en los estudios que utilizan la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes es saber que si al aumentar la presencia de estas proteínas aumentará también la actividad de las mismas, reduciendo el estrés oxidativo endógeno; en algunos casos incluso se ha observado que puede aumentar el daño oxidativo (Muller y col., 2007).

De todas formas, es importante destacar que en el organismo también se encuentran antioxidantes no enzimáticos, como es el caso de la retención del H_2O_2 en los peroxisomas y la quelación de iones Fe y Cu que evita la reacción de Fenton, reacción que inicia el proceso de lipoperoxidación (Morales J. A. G. y col., 2009).

El ciclo redox del glutatión es una fuente importante de protección contra los bajos niveles de estrés oxidativo, mientras que la catalasa es más importante en la protección contra el estrés oxidativo severo (Matés, 2000).

1.6.4 Efectos de radicales libres sobre las enzimas antioxidantes

Las ERO están involucradas en la diferenciación celular, la progresión y la muerte. Bajas concentraciones de ERO pueden ser beneficiosas o incluso indispensables en procesos tales como la señalización intracelular y la defensa contra los microorganismos (Robbins y Zhao, 2011). Sin embargo, cantidades más altas desempeñan un papel importante en el proceso de envejecimiento, así como en una serie de estados patológicos humanos, incluyendo el cáncer, isquemia y deficiencias en el sistema inmune y las funciones endocrinas. Por lo tanto, cuando el estrés oxidativo se produce como consecuencia de un evento patológico, un sistema de defensa promueve la regulación y expresión de las enzimas responsables de compensarlo, aunque no siempre es suficiente (Matés y col., 1999).

Los RL se encuentran involucrados en múltiples etapas en la iniciación y la promoción de la carcinogénesis. Estos compuestos altamente reactivos pueden actuar como iniciadores y/o promotores, causando daño al ADN, favoreciendo la presencia de carcinógenos, alterando el sistema antioxidante celular y modificando la estructura y función de las proteínas, por lo cual se requiere de antioxidantes, compuestos reductores de RL que actúan como los inhibidores de la iniciación y transformación de las células cancerígenas protegiendo contra el daño oxidativo (Sun, 1990).

Las enzimas antioxidantes sufren mutaciones y desactivaciones causadas por la acción de los RL producidos por el estrés oxidativo ocasionado por la exposición prolongada

de luz solar. Debido a ello, la industria se ha dado a la tarea de desarrollar una serie de productos que ayuden a prevenir la acción de los RL sobre la piel humana.

2. Cosmecéuticos, nutracéuticos y nutricosméticos

Los cosméticos se definen como: 1) artículos destinados a ser frotados, vertidos, rociados o aplicados, que se utilizan en cualquier parte del cuerpo humano con la finalidad de limpiar, embellecer, promover la atracción o alterar apariencia y 2) compuestos destinados para su uso como un componente en la formulación de tales artículos (Zhang y Falla, 2009). Con ellos se busca contrarrestar o prevenir los efectos adversos sufridos en la piel debido a la exposición prolongada a los rayos solares, lo que desencadena diversas patologías, que van desde las superficiales hasta las más complejas (Bissett, 2009).

2.1 Cosmecéuticos

Los cosméticos se definen como: 1) artículos destinados a ser frotados, vertidos, rociados o aplicados, que se utilizan en cualquier parte del cuerpo humano con la finalidad de limpiar, embellecer, promover la atracción o alterar apariencia y 2) compuestos destinados para su uso como un componente en la formulación de tales artículos (Zhang y Falla, 2009). Con ellos se busca contrarrestar o prevenir los efectos adversos sufridos en la piel debido a la exposición prolongada a los rayos solares, lo que desencadena diversas patologías, que van desde las superficiales hasta las más complejas (Bissett, 2009).

2.2 Nutracéuticos

Son componentes de los alimentos que no sólo cumplen con la función de proporcionar nutrientes, sino también regulan alguna actividad biológica en el organismo humano proporcionando beneficios médicos o de salud (incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades, de una manera similar a los agentes farmacéuticos). Son sustancias encontradas de forma natural en ciertos alimentos y pueden ser utilizados para la

formulación de otros alimentos. Algunas de las presentaciones en las que se han incluido los nutraceuticos son: yogurts, bebidas, barras energéticas, panes y dulces, entre muchos otros (Draelos, 2010).

2.3 Nutricosméticos

Son componentes de los alimentos que no sólo cumplen con la función de proporcionar nutrientes, sino también regulan alguna actividad biológica en el organismo humano proporcionando beneficios médicos o de salud (incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades, de una manera similar a los agentes farmacéuticos). Son sustancias encontradas de forma natural en ciertos alimentos y pueden ser utilizados para la formulación de otros alimentos. Algunas de las presentaciones en las que se han incluido los nutraceuticos son: yogurts, bebidas, barras energéticas, panes y dulces, entre muchos otros (Draelos, 2010).

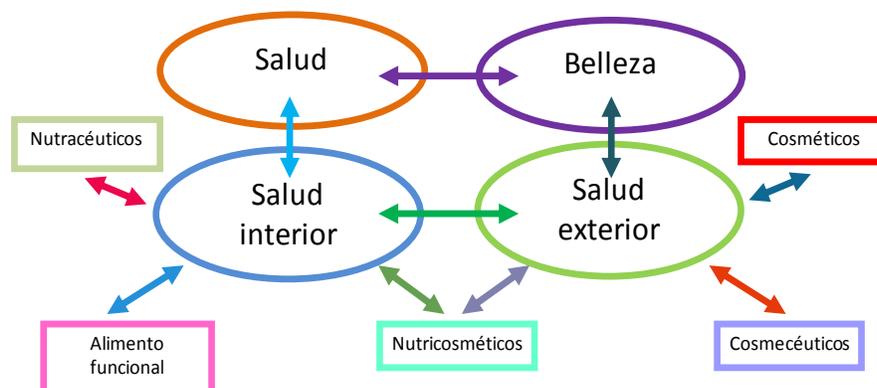


Figura 11. Relación de cosmecéuticos, nutraceuticos y nutricosméticos (Tabor y Blair, 2009).

3. Industria nutricosmética

Los especialistas en nutrición hacen mucho énfasis en que llevar una alimentación balanceada beneficia a la salud, pero no sólo eso, también ayuda a mejorar la apariencia física de las personas. Partiendo de esto, la industria cosmética, junto con la industria de alimentos, han puesto a la venta una nueva categoría de productos que tienen como finalidad principal mejorar la apariencia de la piel, cabello y uñas, conocidos actualmente como nutricosméticos (Wildman, 2001; Fogg-Johnson, 2007; Tabor y col., 2009; Draelos, 2010). Los cosméticos nutritivos, mejor conocidos en la industria como nutricosméticos, son suplementos nutricionales que pueden apoyar y/o mejorar la función y estructura de la piel. Estos productos tienen como característica principal no ser de aplicación tópica, a pesar de ser considerados cosméticos, ya que la presentación en la que se distribuyen debe ser de consumo oral, proporcionando de esta forma no sólo beneficios estéticos, sino también nutricionales (Morganti, 1991; Gruenwald, 2007; Tabor y Blair, 2009).

Diversos estudios relacionan el consumo de productos específicos con la mejora de la piel, ejemplo de ellos son el ácido o-silícico (atenuación de arrugas y aumenta la maleabilidad de las uñas), el colágeno hidrolizado (mejora la hidratación de la piel), la niacinamida (inhibe la inmunomodulación inducida por radiación solar en piel), la vitamina C (protege y restaura fibras de colágeno) (Morganti y col., 1986; Oesser y Seifert, 2003; Tabor y Blair, 2009).

En Europa, Estados Unidos y Japón el mercado de nutricosméticos no sólo distribuye productos en pastillas, sino además se ha dado a la tarea de lanzar a la venta alimentos con estas características (tabla 1), conociéndose actualmente una gran variedad de productos que cumplen con esta función (Wildman, 2001; Fogg-Johnson, 2007; Tabor y Blair, 2009).

3.1 Características del mercado mundial de nutricosméticos

El creciente interés por una dieta saludable, con el objetivo de lograr el bienestar personal, se basa en una mejor nutrición en cada etapa de la vida, sin importar género y edad, con la finalidad de reducir riesgo en el padecimiento de enfermedades y en prevenir la obesidad y fomentar la salud, tanto interior como exterior. Con base en lo anterior, los consumidores están dispuestos a pagar por esos productos (Morganti, 1991; Gruenwald, 2007; Tabor y

Blair, 2009). Las expectativas que deben cumplir los productos de acuerdo a los consumidores son, básicamente, que contenga sólo ingredientes naturales y sin aditivos químicos, aunque esto encarezca el producto (tablas 1 y 2). Japón fue el primer país en desarrollar los productos nutricosméticos y se ha encargado de actualizarlos de forma constante.

Actualmente, el mercado de nutricosméticos se encuentra acaparado por Europa, Japón y Estados Unidos, con un 51, 44 y 3%, respectivamente, del total. La venta total anual es de \$1.5 mil millones de euros (Cosmetics & Toiletries, 2009).

Tabla 1. Productos nutricosméticos que se comercializan en diferentes países (Tabor y Blair, 2009).

País	Empresa	Producto	Principio activo	Función	Imagen
Europa	Danone	Essensis (yogurt)	Polifenoles de té verde y vitamina E	Combatir el envejecimiento celular	
Italia	Parmalat	Jeunesse (yogurt)	Vitamina E y coenzima Q10	Combatir el envejecimiento celular	
Japón	Beauty Foods	Colágen EX (bebida)	Colágeno marino, ginseng, ceramidas y vitaminas B2, B6 y C	Estimulación de formación de colágeno	
Estados Unidos	Coca Cola y L'Oréal	Lumae (té ya preparado)	Hierbas	Auxiliar en el cuidado de la piel	
Estados Unidos	Coca Cola	Enviga (refresco)	Té verde	Quema de calorías	

Tabla 2 (continuación). Productos nutricosméticos que se comercializan en diferentes países (Tabor y Blair, 2009).

País	Empresa	Producto	Principio activo	Función	Imagen
Estados Unidos	Dr. Brandt Skincare	Antioxidant Water Booster (bebida)	Extracto de semilla de uva, té verde y blanco	Revertir daños causados por RL en la piel	
Estados Unidos	Ecco Bella	Chocolate Diet (dulce)	Cacao orgánico y extractos de tomate, zanahoria, algas y mirtilo	Salud para la piel	
Estados Unidos	Frutels	Frutels (dulces y chocolates)	Vitaminas y minerales	Chocolate anti acné	
Estados Unidos	Borba	Skin Balance Gummi Bear Boosters Borba (gomitas)	Extractos de acaí y té verde	Salud de la piel	

3.2 Compuestos más utilizados por la industria nutricosmética

En la industria cosmética se utilizan diversos principios activos en las formulaciones de sus productos, desde naturales hasta sintéticos, pudiéndose encontrar: vitaminas, minerales, carotenoides, polifenoles (Rijnkels y col., 2003; Giacomoni, 2008; Pileggi y col., 2011) e inclusive péptidos (Bissett, 2009). En este contexto, los compuestos antioxidantes utilizados potencialmente como protectores contra el estrés oxidativo deben tener buena estabilidad, con propiedades benéficas capaces de llegar hasta la región del organismo que se requiere y baja toxicidad (Rijnkels y col., 2003).

Los antioxidantes de fuentes naturales son una alternativa mejor aceptada por los consumidores en sustitución de los productos sintéticos, ya que reducen la posibilidad de sufrir efectos adversos al ser consumidos. Un gran número de estudios han demostrado que estos compuestos naturales son capaces de intervenir en las reacciones bioquímicas de la piel, retardando el envejecimiento y previniendo el estrés oxidativo (Matés, 2000; Draelos, 2010; Kim y col., 2010).

3.2.1 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos utilizados de forma recurrente para la elaboración de una gran gama de productos cosméticos, nutracéuticos y nutricosméticos. Esto se debe a que tienen bajo costo y se sabe que son seguras, lo que las hace muy aceptadas por los consumidores (Badui, 2006; Draelos, 2010):

Vitamina D: ayuda a mantener la estructura de la dermis, promoviendo la cicatrización de heridas. Por esta razón es utilizada tanto en preparaciones comerciales orales como tópicas. Por otro lado, la vitamina D puede funcionar como humectante, al aumentar la capacidad de retención de agua en la piel. En altas concentraciones, sin embargo, puede ser tóxica, debido a que se almacena en la grasa del cuerpo (Badui, 2006; Draelos, 2010).

Vitamina C: también conocida como ácido ascórbico, es otra vitamina tanto de vía oral como tópica. Se utiliza en cosmeceúticos para prevenir la hiperpigmentación, ya que

interrumpe la melanogénesis inhibiendo a la tirosinasa. En productos nutricosméticos es utilizada en forma de ácido L-ascórbico para actuar como un tioxidante. La vitamina C puede funcionar como un oxidante en presencia de hierro en suplementos vitamínicos así como en la proliferación de fibroblasto, lo que permite que la piel mantenga su apariencia joven (Pérez y Pérez, 2000; Rodríguez y col., 2004; Bissett, 2009; Draelos, 2010).

Vitamina E: es la vitamina de aplicación tópica más empleada, muy popular en la industria de cosmeceúticos y nutricosméticos. Tiene propiedades antioxidantes y está presente en una gran variedad de productos naturales. La forma de vitamina E biológicamente más utilizada es el α -tocoferol, que se encarga de terminar las reacciones de oxidación en la cadena de los lípidos (lipoperoxidación). La vitamina E también puede proteger a las proteínas de membrana que contienen selenio o azufre y sus reservas corporales se mantienen a través de la ingesta de verduras, aceites, semillas, maíz, soya, trigo, margarina, frutos secos, algunas carnes y productos lácteos (Pérez y Pérez., 2000; Chandra y col., 2003; Rodríguez y col., 2001; Badui, 2006; Bissett, 2009; Draelos, 2010).

Vitamina A: también conocida como retinol, vitamina del grupo de los carotenoides que presenta actividad antioxidante. Los carotenoides son compuestos muy utilizados en la formulación de nutricosméticos, con la finalidad de prevenir el envejecimiento prematuro. Se caracterizan por su color, naranja, rojo y amarillo. Los más populares en la industria son la astaxantina, luteína, licopeno y el mencionado retinol (Badui, 2006; Lizárraga, 2008; Bissett, 2009; Draelos, 2010).

Vitamina F: En realidad no es un compuesto, sino un conjunto de ácidos grasos esenciales, que no pueden ser sintetizados por el cuerpo y por lo tanto deben ser adquiridos por medio de la dieta. Son de cadena larga, poliinsaturados y se derivan de los ácidos linoleico (ω -6), linolénico (ω -3) y oleico. Los ácidos grasos ω -3 se relacionan con la formación de paredes celulares y su deficiencia ocasiona la disminución de la capacidad mental, mala visión, disminución de la función inmune, aumento de triglicéridos, aumento de colesterol, hipertensión, y eczema (enfermedad de la piel). La más alta concentración de ácidos grasos ω -3 se encuentran en el aceite de linaza (Lizárraga, 2008).

3.2.2 Péptidos en nutricosméticos

La aplicación en dermatología de péptidos bioactivos (capaces de regular o intervenir en alguna función biológica en el organismo) de cadena corta comenzó con los descubrimientos realizados en el campo de la cicatrización de las heridas por el Dr. Loren Pickart en la década de 1970. Este investigador estudió y caracterizó el tripéptido glicina-histidina-lisina aislado de plasma humano, relacionándolo con beneficios clínicos en heridas agudas y crónicas (Zhang y Falla, 2009).

En la formulación de productos cosméticos y nutricosméticos se han utilizado, desde hace 50 años, péptidos sintéticos (tabla 3) cuya secuencias fueron aisladas y purificadas a partir del organismo humano. Una vez identificada su secuencia y sus funciones, son sintetizados a gran escala para la formulación de alimentos funcionales. Dichos péptidos se caracterizan por ser de cadena corta (2 a 16 aminoácidos) y su función principal es la de intervenir en la síntesis y regeneración del colágeno en la piel (Bissett, 2009; Zhang y Falla, 2009).

Tabla 3. Péptidos sintéticos utilizados en cosmeceúticos (Zhang y Talla., 2009).

Compañía	Nombre	Actividad	Fuente
Atrium	Tripéptido	Estimulación de la matriz extracelular a través de la estimulación del factor de crecimiento.	Factor de crecimiento de hepatocitos.
Grant Indust	Hexapéptido palmitoil-6	Reparación de capa dérmica.	Hormona estimulante de melanocitos
Pentapharm	Tripéptido palmitoil-5	La síntesis de colágeno a través de factor de crecimiento β .	Trombospondina 1
Sederma	Palmitoil pentapéptido-3	Estimulación síntesis de colágeno a través de la señalización.	Procolágeno

3.2.3 Antioxidantes de origen natural

Un gran número de estudios han demostrado que estos compuestos antioxidantes de origen natural son capaces de intervenir en las reacciones bioquímicas de la piel, retardando el envejecimiento y previniendo el estrés oxidativo. Alguno de estos compuestos son: vitamina

C, vitamina E, té verde, granada, biotina,, ácidos grasos (ω -3 y ω -6), curcumina, resveratrol, luteína, carotenoides, genisteína enzimática del colágeno, apigenina, quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico y coenzima Q₁₀ (Lizárraga, 2008; Morales J. A. G. y col., 2009; Kim y col., 2010).

De igual forma, se han utilizado péptidos naturales obtenidos por la hidrólisis enzimática de colágeno (prolina-histidina y lisina-treonina-treonina-lisina-serina), los cuales al ser conocida su base se han producido de manera sintética, teniendo de esta forma las mismas características que los naturales.

3.3 Pruebas para la evaluación de los nutricosméticos y cosmecéticos

A los productos nutricosméticos, en todas sus posibles presentaciones, se les debe realizar una serie de pruebas, entre las que se encuentra la de biodisponibilidad (es decir, que se absorban y llegan las cantidades adecuadas al o a los tejidos que van dirigidos) En algunos casos, la biodisponibilidad aumenta al cocinar el alimento, como ocurre en el caso del ciclopenteno que se encuentra más disponible en la salsa de tomate que en el tomate crudo. Además de la biodisponibilidad, es necesario que existan estudios que avalen su eficacia frente a placebos, para valorar y cuantificar los cambios de hidratación y fotoprotección, entre otros (Lizárraga, 2008).

Para demostrar la eficacia de los nutricosméticos contra el fotoenvejecimiento, se realizan pruebas *ex vivo* e *in vivo*. Las primeras consisten en aplicar tratamientos a cultivos de células de piel (biopsias, ya sea de ratas, cerdos, piel humana e inclusive piel sintética), en los que se induce el estrés oxidativo por la presencia de H₂O₂ o radiación UV (Rijnkels y col., 2003; Flamand y col., 2006; García y col., 2007; Kim y col., 2010). Las pruebas *in vivo* consisten en aplicar el tratamiento directamente en el modelo experimental (ratas, cerdos y humanos); el producto a probar es consumido o aplicado de forma tópica, se induce el estrés oxidativo por radiación UV aplicada principalmente en el área de los glúteos, mismo lugar del que es tomada la biopsia para su análisis (García y col., 2007; Kim y col., 2010).

En los dos casos, pruebas tanto *in vivo* como *ex vivo*, se pueden realizar estudios histoquímicos, determinando por ejemplo el cambio de espesor de la epidermis antes y

después del tratamiento, así como: zimografías, inmunohistoquímica, grado de lipoperoxidación y actividad enzimática de enzimas antioxidantes, entre otras. En los estudios realizados en humanos se utilizan personas de ambos sexos y de un rango de edades muy amplio, sin que ello interfiera de forma significativa en los resultados obtenidos (Katiyar y col., 2001). También se utilizan diversos dispositivos y técnicas *in vivo* para medir las propiedades físicas de la piel, como la succión, torsión, propagación de ondas, elasticidad (extensómetro) y rigidez (durómetro) (Zahouani y col., 2011).

4. Amaranto

El amaranto es una planta considerada un pseudocereal, ya que tiene características tanto de cereales como de leguminosas (Ortega, 2009; Délano y col. 2011). Pertenece a la familia *Amaranthaceae* (o familia de las Amarantáceas), formada por más de 60 géneros y aproximadamente 800 especies de plantas herbáceas anuales o perennes. La planta llega a medir de 1 a 1.5 m de alto, con hojas alargadas, angostadas en ambas extremidades y de color rojo-morado. Produce grandes inflorescencias repletas de semillas comestibles. Existen tres especies del género *Amaranthus* (del griego “que no se marchita”), entre las que destacan *Amaranthus hypochondriacus* y *Amaranthus cruentus*, que son cultivadas principalmente en México y Guatemala. Es una planta de crecimiento rápido y puede reproducirse en climas calientes y templados, donde el suministro de agua es limitado; es tolerante a condiciones áridas y suelos pobres. Es una de las pocas especies vegetales de las cuales se pueden consumir las hojas y el grano.

4.1 Composición química del amaranto

Se ha reportado que el contenido de proteína del grano de amaranto oscila entre 13 y 19% (Konishi y col., 1985). Dicha proteína contiene 6.1% de lisina (Bressani y García, 1990; Paredes y col., 2006), aminoácido esencial para la nutrición humana y que generalmente está más limitada en otros cereales, cuyo contenido en proteína va de 8.5 a 14% y de lisina de 2.2 a 4.5%. La composición química de este grano incluye 7.7% de lípidos y 67 a 75.5% de carbohidratos (Bressani y col., 1987), como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Composición química del grano de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Konishi y col., 1985; Bressani y col., 1987)

Componente	g/100 g de harina
Proteína Cruda	13-19
Lípidos	7.7
Carbohidratos	57
Fibra	6.7
Cenizas o minerales	2.5
Humedad	13

Las principales fracciones de proteínas identificadas en el grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.), de acuerdo a la clasificación de Osborne (1924), son albúmina, globulina, glutelina y prolamina (Soriano y col., 1992). La albúmina se ha descrito por algunos autores como la proteína más abundante del grano y está compuesta por dos tipos: albúmina 1 y 2, de acuerdo al orden de extracción (Segura y col., 1994). Dichas fracciones proteicas presentan diversos patrones de distribución de aminoácidos: las albúminas contienen altas proporciones de ácido glutámico y aspártico, así como de lisina y valina.

Por todo lo anterior, el grano de amaranto es considerado de un alto valor nutricional, ya que la importancia de su proteína no radica en su cantidad, sino en la calidad de la misma, gracias a su excelente balance de aminoácidos (entre los que se incluyen los esenciales). De acuerdo a la FAO (*Food and Agricultural Organization / Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*) y la OMS (*Organización Mundial de la Salud*), quienes determinan el valor proteico ideal sobre la base de 100, el amaranto posee 75, la leche de vaca 72, la soya 68, el trigo 60 y el maíz 44 (Madeleine Porr, 2009; Délano y col. 2011). Además, la digestibilidad del grano es del 93% y no posee gluten, por lo que es un alimento apto para celíacos.

4.2 Producción nacional de amaranto

La incorporación y ampliación de las áreas destinadas a otros productos de menor calidad nutrimental y que presentan mayores problemas de adaptación con respecto a esta planta, pero que son de mayor consumo, ha provocado la disminución del cultivo en México de especies nativas de amaranto. Este abandono progresivo del cultivo de amaranto se ha realizado sin haber explotado en su totalidad el potencial productivo y alimenticio de dicho vegetal.

El amaranto se cultiva actualmente en África, Asia, Europa, Oceanía y América. La siembra de amaranto en México se realiza con variedades criollas; entre las más importantes de la especie *Amaranthus hypochondriacus* están: mercado, azteca, mixteco, nepal y picos. La variedad mejorada “revancha” pertenece al tipo “mercado”, cuyo rendimiento de grano es de mil kilogramos por hectárea (Morales y col., 2009; Délano y col. 2011).

En nuestro país las principales entidades productoras de amaranto son Puebla, Morelos, Estado de México, Tlaxcala y Distrito Federal con 51, 7, 6, 4 y 3% de la producción total nacional, respectivamente (Morales y col., 2009; SAGARPA, 2010). El 28% de la producción total se reparte entre otros Estados de la República (figura 12).

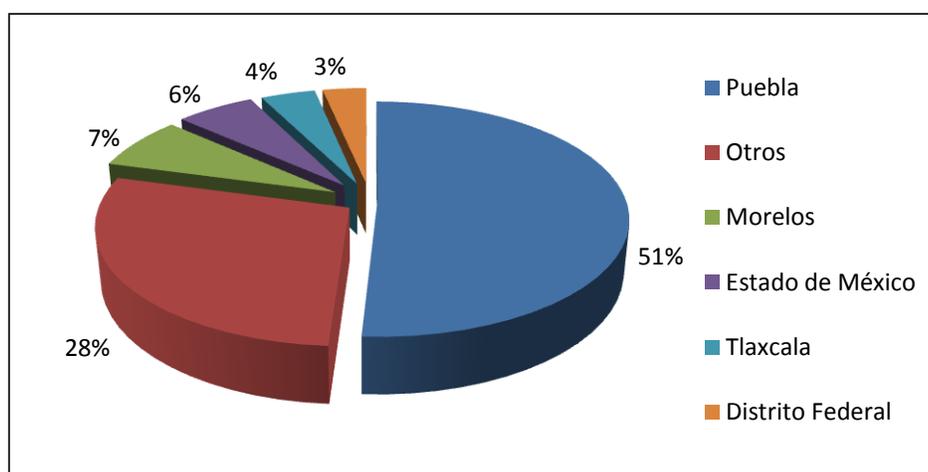


Figura 12. Producción Nacional del grano de amaranto (Morales G. J. C. y col., 2009; SAGARPA, 2010)

4.3 Usos del amaranto y necesidades de investigación

El cultivo de amaranto constituye una actividad productiva alternativa, viable y rentable. Sus cualidades y propiedades nutritivas, agronómicas, industriales y económicas garantizan el éxito de la cadena nutritiva. El amaranto es utilizado principalmente como grano, el cual se destina para siembra del cultivo y la obtención de grano reventado para la producción de artículos de consumo humano. Artesanalmente se elaboran productos de poco valor agregado, como alegrías de diferentes formas y colores, amaranto reventado, granolas y harinas.

Ante esta realidad, distintos organismos gubernamentales y no gubernamentales en México, han tratado de encontrar potenciales usos industriales del amaranto para su aplicación en múltiples actividades y sectores, tales como en la industria de alimentos y bebidas, química, farmacéutica, cosmetológica, en el sector agrícola, pecuario y en nichos específicos como el gourmet, naturista, repostería, etc. (Morales G. J. C. y col., 2009).

En México se está buscando el desarrollo de esquemas de agroasociaciones entre empresas y productores del grano ante la posible diversificación del mercado y aprovechamiento integral del cultivo de amaranto, por lo que se tiene la necesidad de integrar una cadena de productividad, transformación y mercado entre el sector productivo, centros de investigación y desarrollo científico-tecnológico con las autoridades federales y estatales. Por consiguiente, la diversidad de los productos en los que se utiliza el grano de amaranto ha ido en aumento en los últimos años. Empresas como Barcel, Sabritas, Kellogs, Maizoro, Bimbo, Tía Rosa y Wonder, entre otras, han incluido al grano de amaranto en la formulación de sus productos o incluso lo utilizan como ingrediente principal de alguno de ellos. Los productos en los que hoy en día puede encontrarse amaranto en el mercado van desde el tradicional dulce “alegría” hasta harinas, panes, pastas, barras energéticas, tortillas, tamales, leche de amaranto o inclusive en guisos, como pechugas empanizadas con amaranto, tortilla de amaranto y verdura, chiles rellenos de amaranto a la crema, por mencionar solo algunos (Morales G. J. C. y col., 2009).

Debido al alto valor nutricional de las proteínas del grano de amaranto, en los últimos años ha aumentado el interés en realizar investigaciones relacionadas con su valor biológico, propiedades bioquímicas y funcionales, con la finalidad de poder utilizarlas en la formulación de una gran variedad de productos, no solo alimenticios, sino también en cosmeceúticos, nutracéuticos y/o nutricosméticos.

5. Investigaciones relacionadas

En la naturaleza, algunas reacciones químicas, reacciones biológicas y procesos reguladores son modulados por determinadas secuencias de aminoácidos (Zhang y Falla, 2009). Numerosos trabajos científicos han revelado que algunos péptidos derivados de proteínas de fuentes alimenticias presentan actividades biológicas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, además de su valor nutricional. Los métodos utilizados para su evaluación van desde ensayos enzimáticos y cultivos celulares hasta pruebas con animales y humanos. Entre las bioactividades que se han reportado en péptidos destacan su función como opioides, hipotensores, estimulantes de absorción de minerales, inmunomoduladores y antioxidantes (Aito-Inoue y col., 2006).

5.1 Péptidos bioactivos de fuentes naturales y su uso potencial como nutricosméticos

En los últimos años se han reportado diversos trabajos de investigación en los que aíslan aminoácidos, péptidos y proteínas que poseen actividad antioxidante (AAOx) actuando contra la peroxidación de lípidos o ácidos grasos. Se cree que esta AAOx se debe a que los aminoácidos o grupos de azufre reaccionan con hidroperóxidos resultantes de la oxidación de lípidos (Ferrer y col., 1999). Por tal motivo, las industrias del cuidado de la piel y la dermatología han buscado utilizar péptidos antioxidantes en las áreas de tratamiento y prevención de la inflamación, proliferación y migración de la pigmentación celular, o la angiogénesis, entre muchas otras (Zhang y Falla, 2009).

Para este trabajo de investigación nos enfocaremos a los péptidos, que se definen como cadenas cortas de aminoácidos con capacidad de regular las funciones biológicas en

el organismo humano ya que, al ser consumidos, se absorben por los enterocitos del intestino, siendo liberados posteriormente dentro de los espacios inter-intestinales y transferidos a través de las paredes capilares hacia la sangre, donde liberan su actividad biológica benéfica. Al mismo tiempo, deben tener un valor nutricional (Roberts y col., 1999; Meisel, 2001).

Los péptidos antioxidantes que han sido aislados, tanto de fuentes animales como vegetales, fueron obtenidos por hidrólisis enzimática de sus proteínas. Estos péptidos se caracterizan por ser de cadena corta (2-16 aminoácidos) y presentar en la cadena péptidica aminoácidos que por sí solos presentan AAOx, pero que una vez que se encuentran dentro de la cadena aumentan su actividad, como la histidina, prolina y tirosina. Estos péptidos tienen un alto potencial de ser utilizados en la formulación de nutricosméticos, ya que se ha demostrado que son capaces de intervenir en las reacciones de oxidorreducción (causantes de estrés oxidativo), lo que les permitiría prevenir el estrés oxidativo y los daños ocasionados a macromoléculas presentes en la piel.

5.2 Péptidos bioactivos del grano de amaranto

Silva y col. (2008) publicaron una investigación donde comentan que la semilla del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) es rica en proteínas, pero que no se tiene información con respecto a sus compuestos bioactivos, que podrían proporcionar un beneficio a la salud. Por ello realizaron una predicción confrontando 36 secuencias de proteínas y 1573 péptidos ya conocidos que presentan alguna de las 39 actividades biológicas identificadas con la secuencia de la proteína del grano de amaranto (Dziuba y col., 2003).

Los autores encontraron que, teóricamente, en la proteína de este grano podrían estar presentes 11 diferentes actividades: antitrombótica, antiamnésica, opiáceas, inmunomoduladores, activadores de ubiquitina, ligandos, inmunoestimulantes, embriotóxico, inhibidores de proteasas, antihipertensivos y antioxidantes (figura 13).

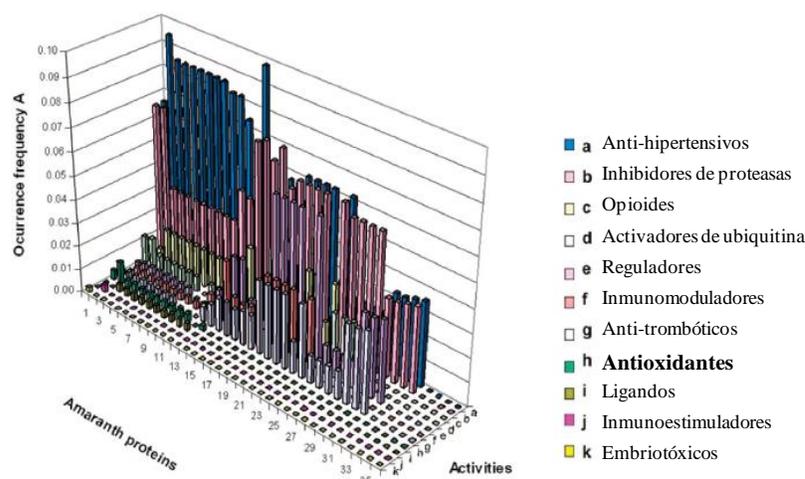


Figura 13. Predicción de posibles bioactividades presentes en la secuencia de la proteína del grano de amaranto y la frecuencia con la que se presentaría cada una de ellas (Silva y col., 2008).

En el 2009 Tovar y col. reportaron la presencia de péptidos antihipertensivos capaces de inhibir la actividad enzimática de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en las fracciones proteicas de albúmina 1 y globulina.

Ortiz y Soriano (2010), trabajo previo de la presente investigación midieron la actividad antioxidante la albúmina 1 nativa (AN) del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) y sus hidrolizados obtenidos por la hidrólisis con alcalasa a los tiempos de 1, 12, 24, 36, y 48 h. Encontraron que la hidrólisis con alcalasa libera péptidos que presentan capacidad de reducir radicales DPPH[•], ABTS⁺, pero sobre todo con capacidad de formar compuestos quelantes de los iones metálicos Fe y Cu, lo que permitiría evitar la reacción de Fenton (inicio del proceso de lipoperoxidación). Llegaron a la conclusión de que tanto la AN como sus hidrolizados de 24, 36 y 48 h presentan la mayor actividad antioxidante.

Délano y col. (2011) señalan que el *Amaranthus hypochondriacus* es una planta que crece fácilmente, sin problemas de cambios de clima o de climas extremos o de escasez de agua y nutrientes. Sometieron a la planta a diferentes tipos de estrés metabólico y

realizaron un análisis transcriptómico, encontrando numerosos genes relacionados con las respuestas de resistencia de la planta al estrés biótico. Reportaron, asimismo, que presenta genes relacionados con la síntesis de oxalato, lo que le permite resistir infecciones por patógenos e insectos, así como genes que ayudan a la planta a evitar la acumulación de ERO.

5.3 Estrés oxidativo en piel humana

Chandra y col. (2003) realizaron una evaluación del efecto del ácido ascórbico sobre los cambios producidos por la radiación fraccionada en piel de ratones, en donde midieron la lipoperoxidación, concentración de GSH, actividad enzimática de GPx y SOD. El tratamiento con ácido ascórbico detuvo la disminución de las actividades de GPx, SOD y contenido de GSH y disminuyó el proceso de lipoperoxidación.

Dammak y col. (2007) publicaron el efecto protector de aceites de semillas en contra del estrés oxidativo en piel humana inducido por H_2O_2 , en donde midieron la peroxidación de lípidos, disminución de la actividad enzimática de GPx, SOD y CAT. Encontraron que los aceites de semillas tuvieron un efecto protector significativo, por la inhibición del daño causado por el H_2O_2 .

Benkhail y col. (2011) reportaron la realización de un análisis de potencial antioxidante en orina, saliva y piel humana en relación con la concentración de β -caroteno presente. Concluyeron que la orina presenta un mayor potencial antioxidante en relación con la saliva, ya que en la orina los componentes antioxidantes se acumulan con el tiempo, al contrario que en la saliva donde sólo se presentan de forma instantánea, pero que este potencial antioxidante no está relacionado con el contenido de β -caroteno. Los estudios realizados en la piel concluyen que el potencial antioxidante está relacionado con la concentración de β -caroteno.

Pileggi y col. (2011) realizaron un estudio en el cual analizaron los niveles de vitaminas, marcadores de estrés oxidativo (glutatión reducido-GSH y sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico-TBARS) e inflamación (proteína C, α -1-glicoproteína ácida, ferritina) antes y después de cirugías de injerto de piel para corregir cicatrices de quemaduras.

Concluyeron que existen mínimos cambios metabólicos que se producen después de injertar piel en pequeñas áreas quemadas de pacientes bien nutridos, sin infección activa o inflamación.

Robbins y Zhao (2011) realizaron una recopilación de investigaciones en las que estudian el estrés oxidativo y su relación con el padecimiento de cáncer de piel. Describen la realización de pruebas en piel cancerígena de ratón, después de que el tratamiento fuera aplicado de forma tópica, reduciendo de forma eficaz el daño oxidativo y la proliferación sin interferir en la apoptosis celular. En otro estudio médico realizado con plantas administradas a las dietas de las personas con presencia de tumores, se observó una disminución significativa del tamaño del tumor. Esta recopilación se centró en cómo la regulación de la expresión y la actividad antioxidante puede modular las enfermedades en la piel y la posible aplicación de terapias a base de antioxidantes.

Wada y col. (2011) realizaron un estudio en el que midieron el efecto antioxidante de extractos de hojas de romero por el método de TBARS en plasma humano, encontrando que los extractos probados reducen la concentración de MDA de forma considerable (lo que a su vez es un indicativo de que los extractos probados redujeron el proceso de lipoperoxidación en plasma humano).

Con base a lo reportado en la literatura, la fotoprotección cutánea se encuentra estrechamente relacionada con la actividad antioxidante que presentan los compuestos, ya sean naturales o sintéticos, que son utilizados con este fin. Por ello es conveniente que las sustancias o compuestos que se deseen probar como fotoprotectores demuestren previamente su actividad antioxidante.

6. Justificación

Algunos factores afectan a la piel, como son la edad, exposición a radiaciones solares UV, condiciones climáticas, contaminación, alimentación, etc., llegando a causar estrés oxidativo y diversas patologías, como manchas anormales de pigmentación conocidas como melanomas y cáncer, entre muchas otras. De forma natural, el organismo presenta mecanismos antioxidantes que se encargan de reducir a los RL y de esta forma reducir los efectos adversos causados por éstos. Entre los sistemas antioxidantes endógenos presentes en el organismo humano se encuentran las enzimas antioxidantes: CAT, SOD y GPx.

La industria ha utilizado péptidos sintéticos como regeneradores de colágeno y protectores del estrés oxidativo provocado por la luz UV solar. Sin embargo, existe creciente interés en sustituir a los péptidos sintéticos por péptidos de fuentes naturales que tengan la misma eficacia en la protección de la piel. Actualmente ha aumentado el interés en el desarrollo de alimentos que no solo nutran, sino que además intervengan en las funciones biológicas del cuerpo, alimentos conocidos como alimentos funcionales. Por otro lado, ha surgido una gama de nuevos productos que permiten mantener la salud de la piel, llevando de forma conjunta las funciones de los nutracéuticos y los cosméticos, por lo que reciben el nombre de nutricosméticos, una industria que mantiene un crecimiento acelerado.

Por ello, se propone investigar posibles efectos protectores contra el estrés oxidativo en la piel utilizando hidrolizados de la albúmina 1 del grano de amaranto, lo que contribuiría al aumento del conocimiento científico de esta planta y a incentivar su cultivo para la producción de materias primas de alto valor agregado especialmente diseñadas para la industria nutricosmética.

7. Hipótesis

La albúmina 1 del grano de amaranto posee en su estructura primaria secuencias peptídicas con capacidad antioxidante que proporcionan efectos protectores contra la acción del estrés oxidativo causado por la exposición prolongada a radiación UV en cultivos de piel humana.

8. Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante de hidrolizados de albúmina 1 del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) sobre el estrés oxidativo en cultivos de piel humana.

8.1 Objetivos particulares

- 🌱 Extracción de albúmina 1 del grano de amaranto.
- 🌱 Hidrólisis controlada de la albúmina 1 del grano de amaranto a tiempos de 24, 36 y 48 h.
- 🌱 Caracterización de hidrolizados de albúmina 1 del grano de amaranto de acuerdo a su peso molecular relativo y especies peptídicas.
- 🌱 Evaluar el efecto protector de la albúmina 1 y sus hidrolizados sobre el estrés oxidativo inducido por exposición prolongada a radiación UV en cultivos de piel humana, midiendo la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx.
- 🌱 Evaluar la actividad antioxidante de la albúmina 1 y sus hidrolizados sobre el proceso de lipoperoxidación causado por estrés oxidativo inducido con radiación UV de la piel.

9. Materiales y métodos

La figura 15 muestra la estrategia experimental que se siguió para el desarrollo del presente proyecto de investigación, desde la obtención de albúmina 1 nativa del grano de amaranto con sus respectivos hidrolizados, hasta la evaluación del efecto protector por medio de la medición de actividad enzimática de SOD, CAT y GPx y lipoperoxidación (concentración de MDA) en cultivos organotípicos de piel humana sometida a estrés oxidativo provocado por radiación UV. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados reportados se expresan como un promedio de los valores \pm la desviación estándar. A continuación se detallan los pasos que se siguieron:

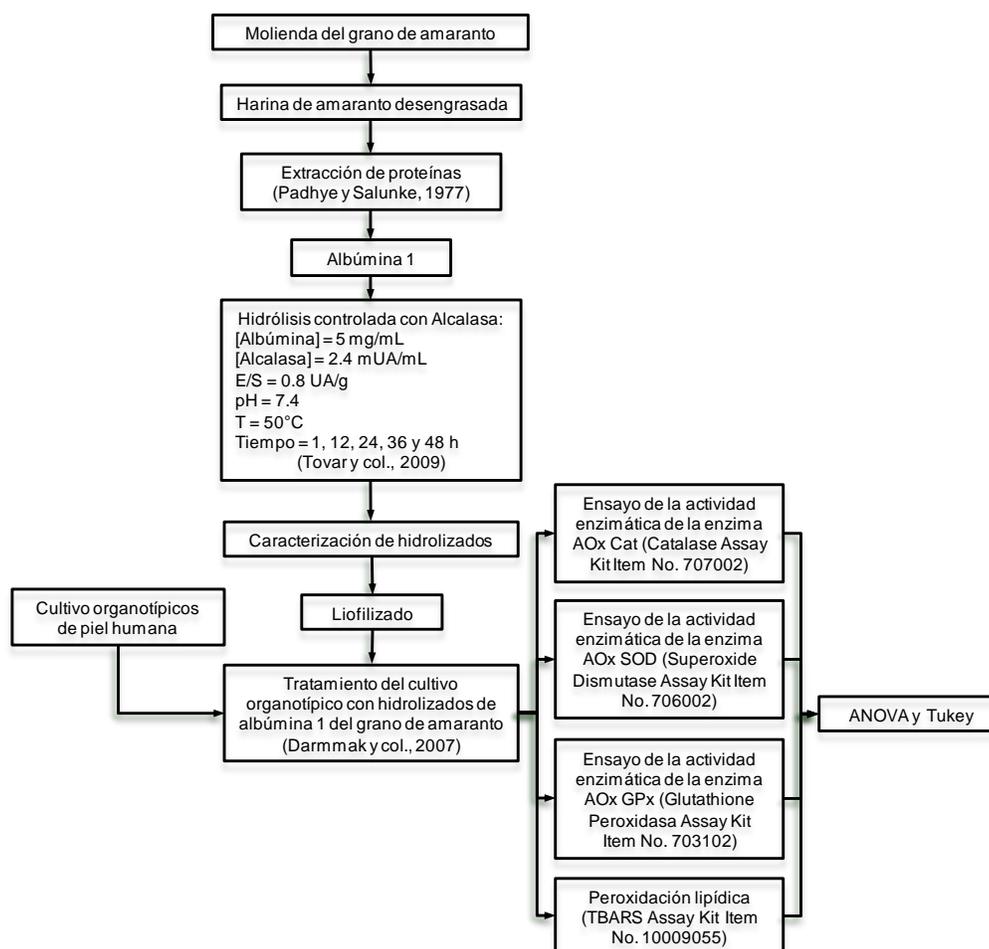


Figura 14. Desarrollo experimental para de evaluación de antioxidante ex vivo de la albúmina 1 nativa y sus hidrolizados.

El grano de amaranto (*Amarantus hypochondriacus* L) utilizados durante el desarrollo de la presente investigación fue adquirido en Tuyehualco, delegación Xochimilco, D.F. Se utilizaron reactivos grado analítico y las biopsias de piel humana fueron donadas al Centro Nacional de Transfusión Sanguínea de la Secretaria de Salud.

9.1 Molienda del grano de amaranto

Se realizó la molienda del grano de amaranto en un molino KRUPS GX4100 hasta obtener una harina con un tamaño de partícula de 0.250 mm (malla No. 60), la cual fue almacenada a 4°C.

9.2 Desengrasado de harina de amaranto

El desengrasado de la harina de amaranto se realizó con acetona (5 mL/g), la mezcla se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 h (3 repeticiones), al término de este tiempo se filtró al vacío y el filtrado se lavó con éter etílico (4 mL/g). La harina desengrasada fue colocada durante 24 h en una campana de extracción para permitir la completa evaporación de los solventes. La harina seca se hizo pasar nuevamente por una malla No. 60 y se almacenó a 4°C.

9.3 Extracción de albúmina 1 del grano de amaranto

Para la extracción de albúmina 1 del grano de amaranto se siguió la metodología de Soriano y col. (1992). Se mezclaron 50 g de harina de amaranto desengrasada con 300 mL de Na₂SO₄ al 5%, manteniéndose en agitación durante 30 min a 4°C; al término de este tiempo se centrifugó a 4°C y 13000 xg durante 20 min. El sobrenadante fue separado y al residuo se le adicionaron 200 mL de Na₂SO₄ al 5%, mezclándolo durante 30 min; se centrifugó a 4°C y 13000 xg durante 20 min. Se juntaron los sobrenadantes obtenidos, la proteína solubilizada se precipitó con (NH₄)₂SO₄ al 50, 70 y 100% de saturación, centrifugando en cada nivel de saturación a 4°C y 13000 xg durante 20 min para separar la proteína, que posteriormente fue

dializada durante 24 h frente a agua desionizada (con cuatro cambios de agua) con una membrana Spectra/Por (Spectrum tamaño de corte MWCO: 6 – 8 kDa). A continuación se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante obtenido contenía la fracción de albúmina 1 (AN, fracción soluble en agua), que posteriormente fue liofilizada. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (Anexo 1).

9.4 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa

La hidrólisis de la albúmina 1 con alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*; actividad específica de 2.4 UA/g, Sigma-Aldrich) se llevó a cabo por el método de Tovar y col. (2009) En un matraz Erlenmeyer se adicionaron 32 mL de búfer de fosfatos (0.5 M, pH 7.4) y 60 mL de la solución de albúmina 1 a una concentración de 5 mg/mL; la mezcla se incubó durante 5 min a 50°C. Posteriormente, se añadieron 8 mL de alcalasa 2.4 mUA/mL en solución de búfer de fosfatos (0.5 M, pH 7.4, 50°C), con una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.8 UA/g. Se realizó la hidrólisis a 50°C, en intervalos de tiempo de 24, 36 y 48 h. Al término de cada uno de los tiempos de hidrólisis (TH) se añadieron 10 mL de solución de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mg/mL en etanol, para detener la reacción (tabla 6). Una vez obtenidos los hidrolizados, se procedió a liofilizarlos y la concentración se determinó mediante una curva patrón de L-leucina (tabla 5; Anexo 2).

Tabla 5. Orden de adición de reactivos para la hidrólisis de albúmina 1 del grano de amaranto con alcalasa.

Adición de reactivos	Volumen añadido
Búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4	32 mL
Albúmina 1 (5 mg/mL)	60 mL
<i>Incubar 5 min. a 50 °C</i>	
Alcalasa 2.4 mUA/mL en búfer de fosfatos 0.5 M; pH 7.4 a 50 °C	8 mL
Tiempo de hidrólisis (24, 36 y 48 h)	
PMSF en etanol (2 mg/mL)	10 mL

9.5 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) de la albúmina 1 se determinó por cuantificación de los grupos amino primarios, que reaccionan con ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) produciendo un compuesto cromóforo que se puede detectar a 340 nm, de acuerdo al método de Adler-Nissen (1979). Alícuotas de 125 μ L del hidrolizado correspondiente se mezclaron con 1 mL de búfer de fosfatos (0.5 M, pH 8.2) y 1 mL de ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS) al 0.1% en agua. La mezcla fue incubada en la obscuridad a 50°C durante 1 h; al término de este tiempo se añadieron 2 mL de HCl 0.1 N para detener la reacción. Las mezclas se dejaron enfriar durante 30 min a temperatura ambiente para finalmente medir su absorbencia. El fundamento del método se basa en la reacción de TNBS con los grupos amino liberados durante la hidrólisis (figura 15).

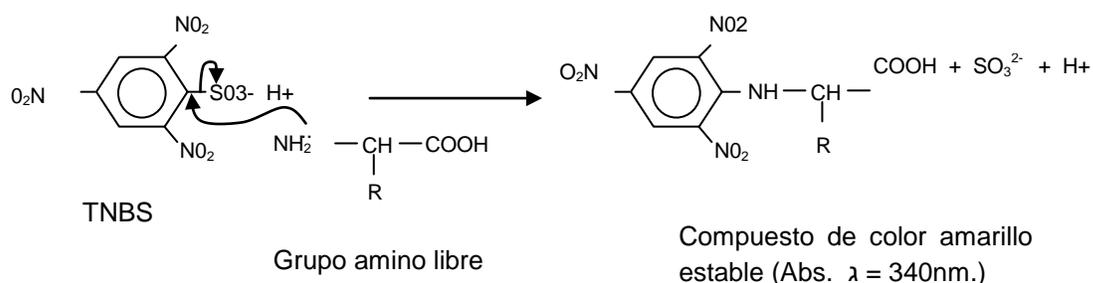


Figura 15. Reacción del TNBS con los grupos amino libres resultantes de la hidrólisis de albúmina 1 con alcalasa (Adler-Nissen, 1979).

El GH se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

donde h es el número de enlaces peptídicos que fueron hidrolizados y h_{tot} el número total de enlaces peptídicos en la proteína nativa. Este último fue determinado por la hidrólisis total de la albúmina 1 con HCl 6 N a 120°C durante 24 h. Tanto h como h_{tot} se expresan en meq L-Leucina/g de proteína, para lo cual se construyó una curva patrón (Anexo 2).

9.6 Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) para el análisis electroforético de la albúmina 1 y sus hidrolizados, de acuerdo al método de Laemmli (1970). La composición de los geles, cuyas dimensiones fueron de 10 cm x 10 cm, se muestran en las tablas 6 y 7; estos geles fueron elaborados con una T de 30% y una C de 2.67%. Cada muestra fue diluida (1:1) en búfer de muestra (tabla 8) y se aplicaron 20 μ L de la muestra de AN y sus hidrolizados a las 24, 36 y 48 h (2 mg/mL).

De igual forma, se utilizaron 10 μ L de muestra estándar de marcadores de peso molecular conocido (MW Low-Range, Sigma-ALdrich, St. Louis, Mo. USA) cuya composición fue: glutamato deshidrogenasa (55 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), α -lactoalbúmina (14.2 kDa) y aprotinina (6.5 kDa).

Tabla 6. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis SDS-PAGE

Solución	Tris (M)	Glicina (g/L)	pH	SDS (%)
0.5 M Tris-HCl	0.5	-	6.8*	-
1.5 M Tris-HCl	1.5	-	8.8*	-
Búfer de corrida	15 (g/L)	72	8.3	0.5
SDS	-	-	-	10
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida	% acrilamida (p/v)		% bisacrilamida	
30% T ^a . 2.67% C ^b	29.2		0.8	

^a % concentración de acrilamida y bisacrilamida

^b % concentración de entrecruzamiento de acrilamida-bisacrilamida

* Ajuste de pH con HCl concentrado

Tabla 7. Composición de los geles de electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Gel concentrado (4%)	Gel de separación (12%)
Agua desionizada	6.1 mL	3.5 mL
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	2.5 mL	-
1.5 M Tris-HCL, pH 8.8	-	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L	100 μ
Solución de acrilamida-bisacrilamida (30 T, 2.67% C)	1.3 mL	4.0 mL
Desgasificar al vacío	20 min.	20 min.
Persulfato de amonio (10%)*	100 μ L	100 μ L
TEMED	15 μ	10 μ

* Preparar el mismo día

Tabla 8. Composición de búfer muestra para electroforesis SDS-PAGE

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1
Glicerol	0.8
SDS 10%	1.6
2- β -mercaptoetanol	0.4
Bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

Se utilizó un gel concentrador y un gel separador con 4 y 12% p/v de poliacrilamida, respectivamente, en presencia de dodecil sulfato de sodio (tabla 8). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V durante 45 min a temperatura ambiente en un equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos durante 1 h con solución de azul brillante de Coomassie R-250 (0.1% p/v en metanol y ácido acético glacial a 40 y 10% v/v, respectivamente); se destiñeron durante 3 h en solución de metanol y ácido acético glacial (40 y 10% v/v, respectivamente).

9.7 Electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE

Se realizaron geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y tricina para el análisis electroforético, de acuerdo al método de Schägger y Von Jagom (1987) en los que se aplicaron las muestras de albúmina 1 nativa y sus hidrolizados (24, 36 y 48 h). Los geles de 10 x 10 cm fueron elaborados con una T de 49.5% y una C de 3% (tablas 9 y 10). Las muestras fueron diluidas 1:1 en búfer de muestra (tabla 11), seguido de calentamiento en agua en ebullición durante 2 min. Se aplicaron 20 μ L de cada muestra (2 mg/mL).

Se utilizaron 10 μ L de muestra estándar de pesos moleculares conocidos (MW Ultra Low-Range, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), cuya composición consistió en: ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), triosa-fosfato-isomerasa (26.6 kDa), mioglobina (17 kDa), α -lacto-albúmina (14.2 kDa), aprotinina (6.5 kDa) e insulina, cadena β (3.5 kDa).

Tabla 9. Solución estándar para la preparación de geles de electroforesis Tris-tricina-SDS-PAGE

Búfer	Tris (M)	Tricina (M)	pH	SDS (%)
Búfer ánodo	0.2	-	8.9 ¹	-
Búfer cátodo	0.1	0.1	8.25 ²	0.1
Búfer gel	3	-	8.45 ¹	0.3
Mezcla de acrilamida-bisacrilamida	% acrilamida (p/v)		% bisacrilamida	
49.5% T ^a . 3% C	48		1.5	

¹ Ajustar pH con HCl

² No es necesario ajustar

Tabla 10. Composición de los geles para electroforesis Tris-SDS-PAGE

Solución o reactivo	Gel concentrado (4% T, 3% C)	Gel de separación (10% T, 3% C)	Gel de separación (16.5% T, 3% C)
Solución de acrilamida-bisacrilamida (49.5 T, 3% C)	1 mL	2 mL	3.3 mL
Búfer gel	3.1 mL	3.3 mL	3.3 mL
Glicerol	-	-	1.1 mL
Desgasificar al vacío	20 min.	20 min.	20 min.
Anadir agua desionizada para obtener un volumen final de:	12.5 mL	10 mL	10 mL
Persulfato de amonio (10%)*	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	15 µ	10 µ	10 µ

Tabla 11. Composición del búfer de muestra para electroforesis Tris-Tricina-SDS-PAGE

Solución o reactivo	Volumen (mL)
Agua desionizada	4
0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	1
Glicerol	1
SDS 10%	1.6
2-β-mercaptoetanol	0.2
Bromofenol 0.05% (p/v)	0.2

La electroforesis se llevó a cabo en mini-placas modelo Mini Protean III (Bio Rad) a un voltaje constante de 90 V durante 150 min, a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron durante 1 h con solución de azul brillante de Coomassie R-250 (0.1% p/v en metanol y ácido acético glacial al 40 y 10%, respectivamente); se destiñeron durante 3 h en solución de metanol y ácido acético glacial (al 40 y 10%, respectivamente).

9.8 Cromatografía por filtración en gel

Los hidrolizados de albúmina 1 se caracterizaron de acuerdo a su PM relativo (MW) utilizando columnas de 1.5 x 30 cm empaquetadas con Sephadex G-15, G-50 y G-200 (rango de separación 0.25-1.5, 1.5-30 y 5-250 kDa, respectivamente) equilibradas previamente con búfer de fosfatos (32.5 mM K_2HPO_4 -2.6 mM KH_2PO_4 , 0.4 M NaCl, 20 mM 2- β -mecaotoetanol, 3.1 mM azida de sodio; pH 7.5). Para la determinación del volumen vacío (V_o) y volumen total (V_t) de la columna se utilizó azul de dextrano (2 mg/mL) y DNP-alanina (0.5 mg/mL), respectivamente. Los pesos moleculares de las fracciones obtenidas se determinaron mediante una curva patrón de marcadores de peso molecular conocido (Anexo 3).

Se analizaron 500 μ L de cada hidrolizado (5 mg/mL), eluyéndose con el mismo búfer de fosfatos descrito anteriormente, con un flujo de 20 mL/h. El volumen de las fracciones colectadas fue de 1.5 mL. La absorbencia a la que fueron leídas las fracciones correspondientes a la columna de Sephadex G-200 fue de 280 nm, para las columnas de Sephadex G-50 y Sephadex G-15 las fracciones fueron leídas a 214 nm.

Para los picos obtenidos en los cromatogramas de la columna de Sephadex G-50 se calculó el área bajo la curva para estimar el porcentaje (%) que representa cada especie de acuerdo a la clasificación (basada en el MW) de Guadix y col. (2000) y Chang y col. (2007), que consiste en: proteínas (>10 kDa), proteosas (5 – 10 kDa), peptonas (1 -5 kDa), péptidos (0.25 – 1 kDa) y aminoácidos (0.075 – 0.2 kDa).

9.9 Cultivos organotípicos de piel humana

Las muestras de piel (n=6) fueron tomadas de mujeres saludables (25-35 años; Katiyar y col., 2001) sometidas a abdominoplastia estética. Una vez que se tuvo la biopsia, fue limpiado el explante con etanol al 70% durante 30 s, inmediatamente se colocó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) para su transporte al laboratorio. Una vez en el laboratorio se removió la hipodermis (en caso de que la tuvieran) y se cortaron fragmentos con un área aproximada de 2 mm². Las muestras de piel se colocaron, con la epidermis hacia arriba, en cajas de Petri de 2 cm² con 2.5 mL de medio DMEM (Anexo 4)

complementado con suero bovino fetal (100 U/mL); las cajas de Petri fueron colocadas en una incubadora con atmosfera controlada y 5% de CO₂ a 37°C durante 72 h. La concentración de albúmina 1 nativa y sus hidrolizados de 24, 36 y 48 h (liofilizados) disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO, cuya función es hacerlos llegar a las células), fue de 100 µg/mL (Dammak y col., 2007).

9.10 Aplicación de tratamientos en cultivos organotípicos de piel humana

Cada biopsia de piel humana tuvo cuatro grupos de tratamiento para cada muestra (AN y sus hidrolizados de 24, 36 y 48 h). Los tratamientos aplicados fueron: piel no expuesta a radiación UV (control negativo, C), piel no expuesta a radiación UV más la muestra de tratamiento (G₁), piel expuesta a radiación UV (control positivo, G₂) y finalmente piel expuesta a radiación UV más la muestra de tratamiento (G₃; tabla 12 y figura 16).

Tabla 12. Grupos de tratamientos a los que fueron sometidos cada uno de los explantes de piel humana.

Grupo	Características
Control (C)	Piel (control negativo)
Grupo 1 (G ₁)	Piel + hidrolizado
Grupo 2 (G ₂)	Piel + UV (control positivo)
Grupo 3 (G ₃)	Piel + UV + hidrolizado

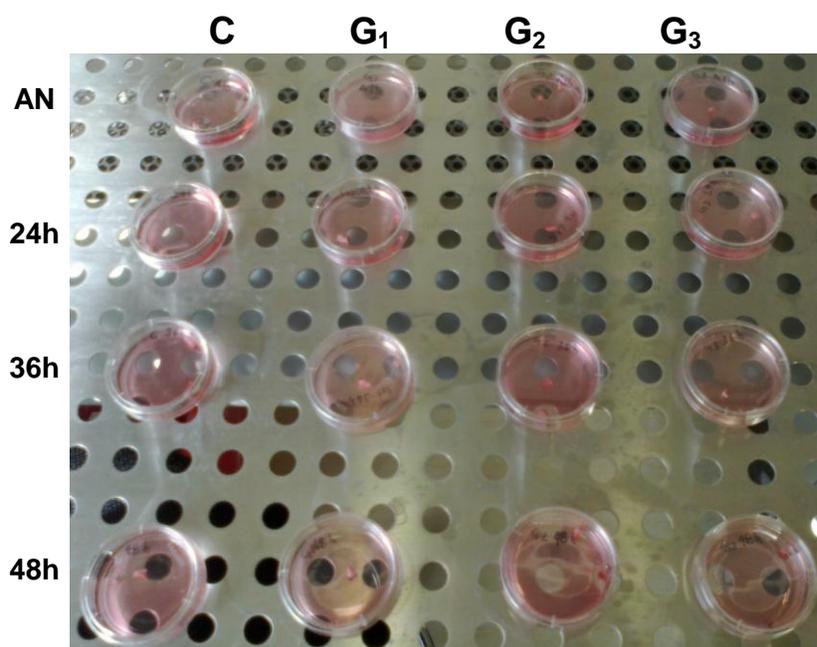


Figura 16. Arreglo de tratamientos para cada biopsia utilizada en cultivos de piel humana.

9.11 Sistemas antioxidantes en cultivos organotípicos de piel humana

Al término de las 72 h de incubación, las muestras de piel fueron colocadas en 1 mL de solución Tripsina-EDTA (con 0.025% de tripsina bovina y 0.01% de EDTA, TE, Anexo 5) para su homogenizado, que se llevó a cabo a 37°C durante 4 días. Posteriormente, los viales fueron centrifugados a 10,000 $\times g$ durante 15 min a 4°C, procedimiento que se realizó con la finalidad de liberar a las células del exceso de matriz extracelular presente en la piel. Los sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de la actividad enzimática de CAT, SOD, GPx, cuyos valores fueron expresados en U/mg de proteína. La determinación del grado de peroxidación se realizó midiendo la concentración de MDA presente en los cultivos de piel y fue expresada en nmol/mg proteína.

9.11.1 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa

La actividad enzimática de SOD se midió utilizando Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit Item No. 706002 (96 pozos), que emplea una sal de tetrazolio para la detección del radical superóxido generado por la enzima xantina oxidasa e hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para realizar el 50% de la dismutación del radical superóxido. El ensayo de SOD mide la actividad de las tres formas de SOD presentes en organismos vivos: citosólica (Cu/Zn-SOD), mitocondrial (Mn-SOD) y extracelular (Fe-SOD).

Las soluciones utilizadas se prepararon como se indica en el kit: búfer de ensayo - BE (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM ácido dietilentriaminapentaacético-DTPA, 0.1 mM hipoxantina), búfer muestra 10X - BM (50 mM Tris-HCl, pH 8; usado para diluir la xantina oxidasa y las muestras de SOD), detector del radical - DR (50 µL de solución de sal de tetrazolio en 19.95 mL de BE), estándar de SOD - SS (100 µL de eritrocitos bovinos, SOD Cu/Zn) y xantina oxidasa - XO (50 µL de solución enzimática y 1.95 mL de BE). Para elaborar la curva estándar de SOD se diluyeron 20 µL de SS en 1.98 mL de EB (solución stock) y a partir de ella se elaboró la curva patrón de SOD.

En cada pozo se colocaron 200 µL de DR y 10 µL de muestra (homogenizado de células de cada grupo de tratamiento C, G₁, G₂ y G₃ para cada muestra a probar, estándar de SOD). Posteriormente se inició la reacción, adicionando 20 µL de XO en todos los pocillos e incubándose durante 20 min a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se leyó la absorbencia a 440 nm en un lector de placas. El volumen final en cada pozo fue de 230 µL, a una temperatura de 25°C, por lo que todos los reactivos debieron estar a esta temperatura (excepto las muestras y la xantina oxidasa).

La actividad enzimática se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$SOD (U/mL) = \left[\left(\frac{Abs_m - b}{m} \right) \times \frac{0.23 mL}{0.01 mL} \right] \times FD$$

donde: Abs_m es la absorbencia de las muestras a 440 nm, b y m son la ordenada y la pendiente (respectivamente) de la curva patrón de SOD (Anexo 6) y FD es el factor de dilución de cada muestra.

9.11.2 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante catalasa

La actividad enzimática de CAT se midió utilizando Cayman's Catalase Assay Kit Item. No. 707002. El método se basó en la reacción de la enzima CAT con H_2O_2 , el formaldehído producido fue medido colorimétricamente utilizando 4-amino-3-hidrazino-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno, la reacción hace que se forme un heterociclo con aldehídos, pasando de incolora a púrpura.

Las soluciones se prepararon para la realización del ensayo de acuerdo al kit: búfer de ensayo 10X – BE (2 mL de búfer de catalasa concentrada que contenía 100 mM de fosfato de potasio a pH 7 y fue diluido en 18 mL de agua), búfer muestra – BM (5 mL de solución de catalasa concentrada en 45 mL de agua, 25 mM de fosfato de potasio, 1 mM EDTA, 0.1% BSA), estándar de formaldehído – EF (4.25 M), CAT control – CC (100 μ L de solución de CAT de hígado de bovino con 1.9 mL de BM), solución de hidróxido de potasio – HP (10 M), solución de peróxido de hidrógeno – PH (40 μ L de solución 8.82 M en 9.96 mL de agua), solución de Purpald – P (4 mL de 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol en 0.5 M de HCl), solución de peryodato de potasio -PYP (0.5 M).

Se colocaron, en cada pocillo, 20 μ L de muestras (estándar de formaldehído, dos pocillos con CC y muestras a analizar) diluidas en tampón BE y metanol. La reacción se inició adicionando 20 μ L de PH (H_2O_2) a temperatura ambiente; transcurridos 20 min se adicionaron 30 μ L de HP (KOH) para detenerla y posteriormente se añadieron 30 μ L de P; se dejó reaccionar durante 10 min en agitación. Finalmente se adicionaron 10 μ L de PYP y se dejó reposar durante 5 min. El volumen final del ensayo fue de 240 μ L en cada pozo. Los reactivos fueron manejados a temperatura ambiente y la absorbencia fue medida a 540 nm en un lector de placas.

Para calcular la concentración de formaldehído en las muestras se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Formaldehído}(\mu\text{M}) = \left[\frac{\text{Abs}_m - b}{m} \right] \times \frac{0.17 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}}$$

donde: Abs_m corresponde a los valores de absorbencia de cada muestra, b y m son la ordenada en el origen y la pendiente de la curva patrón de formaldehído (Anexo 6).

La ecuación para el cálculo de la actividad enzimática de la CAT:

$$\text{Actividad CAT} = \left[\frac{\mu\text{MF}_m}{20 \text{ min}} \right] \times \text{FD}$$

donde: μMF_m concentración de formaldehído en las muestras y FD es el factor de dilución de cada muestra.

9.11.3 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa

La actividad enzimática se midió utilizando Cayman's Glutathione Peroxidase Assay Kit Item. No. 703102. Este ensayo se basó en la capacidad de la GPx para reducir hidroperóxido, utilizando para ello glutatión (GSH), por medio de una reacción acoplada con la enzima glutatión reductasa (que llevó a cabo la oxidación del $\text{NADPH} + \text{H}^2$ a NADP). La actividad enzimática de GPx es medida de forma indirecta, por medio del decremento de absorbencia debido a la formación del NADP^+ .

Se prepararon: búfer de ensayo – BE (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.6), búfer muestra – BM (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, pH 7.6), GPx control – GC (10 μL de GPx de eritrocitos de bovino en 490 μL de BM), mezcla de co-sustrato – MCS (1 vial de NADPH liofilizado en 2 mL de agua), hidroperóxido de cumeno – HC (12 mL).

Se añadió 120 μL de BE y 50 μL de MCS (solo en tres pozos), para el control positivo, por otro lado (en tres pozos diferentes a los anteriores) 100 μL de BE, 50 μL de MCS y 20 μL de GC. Para el análisis de los sobrenadantes de las muestras de piel se añadieron 100 μL de BE, 50 μL MCS y 20 μL de muestra. La reacción fue iniciada adicionando 20 μL de HC, se agitó y se leyó la absorbencia cada minuto a 340 nm en un lector de placas hasta obtener 5 lecturas. El volumen final del ensayo fue de 190 μL en cada pozo y el experimento fue realizado a 25°C.

La determinación de cambio de absorbencia por minuto (ΔA_{340}) se realizó por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \frac{A_{340}(T_2) - A_{340}(T_1)}{T_2 - T_1}$$

donde: $A_{340}(T_2)$ y $A_{340}(T_1)$ corresponden a los datos de absorbencia en los tiempos 1 y 2; T_1 y T_2 son los tiempos 1 y 2 (min).

El cálculo de la actividad de GPx se realizó con la siguiente ecuación:

$$GPx = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{\epsilon_{NADPH}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}}$$

donde: $\Delta A_{340}/\text{min}$ es el cambio de absorbencia por minuto calculada con la ecuación anterior, ϵ_{NADPH} corresponde al coeficiente de extinción del NADPH ($0.00373 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

9.11.4 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

La determinación de la lipoperoxidación se realizó por medio de la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBARS, figura 18), y se llevó a cabo con el TBARS Assay Kit Item. No. 10009055.

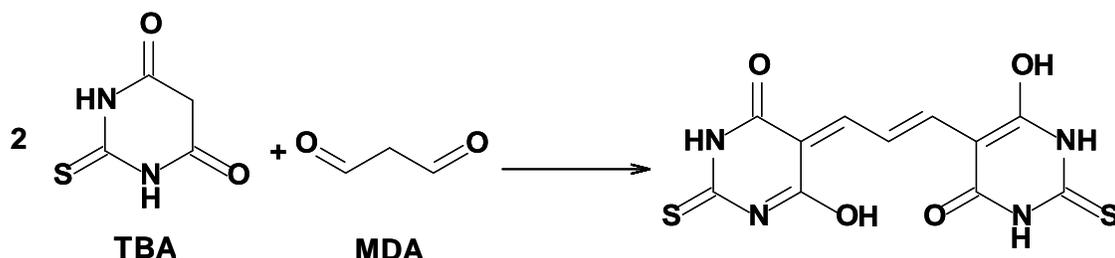


Figura 17. Reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (Wada y col., 2011).

Las soluciones utilizadas fueron: ácido tiobarbitúrico – TBA (2 g), ácido acético concentrado – AAC (20% v/v en agua), hidróxido de sodio 10X– HS (10% p/v en agua), estándar de malondialdehído - MDA (500 mM), solución de dodecil sulfato de sodio – SDS, reactivo de color – RC (530 mg de TBA, 150 mL de AAC, 50 mL de HS).

El análisis de las muestras se realizó añadiendo 100 μ L de muestra a 100 μ L de SDS; <tras agitarse, se añadieron 4 mL de RC, se colocaron los viales en agua hirviendo durante 1 h, y posteriormente en hielo durante 10 min, para detener la reacción. A continuación fueron centrifugados (10 min, 1600 xg , 4°C) y se dejaron reposar 3 min a temperatura ambiente. Se colocaron 150 μ L de cada vial en la placa de pozos para leer su absorbencia a 535 nm.

Los cálculos de concentración del MDA presente en las muestras se realizaron utilizando la siguiente ecuación:

$$MDA(\mu M) = \left[\frac{Abs_c - b}{m} \right]$$

donde: Abs_c absorbencia corregida que se calculó con la diferencia entre el valor de absorbencia del estándar (0 μM) y las absorbencias de las muestras ensayadas (cultivos de piel y estándar), b y m correspondientes a la ordenada en el origen y pendiente, respectivamente, de la curva patrón de MDA (Anexo 6).

9.12 Modelo y análisis estadístico

Se aplicó un Diseño de Bloques al Azar, con tres factores fijos a considerar: la muestra probada, grupo de tratamiento e individuo. Todos los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar y se les realizó análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), utilizando el paquete estadístico SPSS, v. 20.0.

10. Resultados y discusión

Los resultados de caracterización de hidrolizados de AN y evaluación antioxidante *ex vivo* en cultivos organotípicos de piel humana realizados durante el desarrollo de esta investigación, se presentan a continuación.

10.1 Extracción de albúmina 1 del grano de amaranto

En el presente trabajo se utilizó harina del grano de amaranto desengrasada como material inicial para la extracción de AN, utilizando una solución de Na₂ SO₄ al 5% p/v. Se ha reportado que al utilizar este método se obtiene un mayor rendimiento de nitrógeno proteico (Soriano y col., 1992; Tovar y col., 2009) comparado al que se obtiene al utilizar solución de NaCl (Bressani y col., 1990; Segura y col., 1992). Por otro lado, no se consideró la extracción de albúmina 2, ya que la principal fracción de albúminas del grano de amaranto corresponde a albúmina 1 (Konishi y col., 1991; Gorinstein y col., 2005).

Diversas investigaciones basadas en diferentes metodologías para la extracción de proteínas han reportado que en el grano de amaranto siempre se ha encontrado una mayor proporción de albúminas, seguidas de globulinas y glutelinas (Búcaro y Bressani, 2002; Gorinstein y col., 2002). Por tal motivo, se decidió trabajar con la fracción de AN, aunado a que en trabajos previos se encontró una mayor actividad antioxidante tanto en AN y sus hidrolizados con que en la fracción de globulina y sus hidrolizados (Ortiz y Soriano, 2011). El hecho de no existir reportes con respecto al efecto protector contra el estrés oxidativo en la piel humana de AN y sus hidrolizados enzimáticos fue también un factor tomado en cuenta.

Con el método utilizado para la extracción de AN se obtuvo una concentración de proteína de 7.67 ± 0.48 g/100 g de harina desengrasada. Esta fracción representó el 49.87% del total de proteína del grano de amaranto, cálculo que se basó en la cantidad de proteína cruda (15.38%) reportada por Ortiz y Soriano (2010).

10.2 Hidrólisis enzimática de albúmina 1 con alcalasa

En diversas investigaciones han reportado la hidrólisis enzimática de proteínas extraídas de fuentes naturales tanto animales como vegetales. Entre estas proteínas destacan la de soya, huevo, cerdo, alfalfa, pollo, atún entre otras (Morales y col., 2009). Estas proteínas, además de haber sido estudiadas como fuentes nutricionales (Meisel, 2001), también lo han sido como fuente de péptidos bioactivos capaces de intervenir y/o regular actividades biológicas en el organismo humano. Entre estos péptidos bioactivos destacan los antihipertensivos, antitrombóticos, inhibidores de proteasas y antioxidantes. Específicamente, los biopéptidos antioxidantes reportados se caracterizan por ser de cadena corta (2 – 16 aminoácidos) en cuya composición predominan la prolina, histidina, tirosina y triptófano (Hua y col., 1996; Roberts y col., 1999; Hook y col., 2001).

La hidrólisis de AN ha sido reportada con anterioridad y se sabe que se requiere de tiempos de hidrólisis de 18 h para obtener péptidos antihipertensivos, y superiores a 24 h para obtener péptidos antioxidantes (Tovar y col., 2009; Ortiz y Soriano, 2010).

Al hacer la hidrólisis de AN con alcalasa se observó que los tres tiempos de hidrólisis utilizados (24, 36 y 48 h) no aportan diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al GH (ya sea en porcentaje, mg eq L-leu/mL o en mg eq L-leu/g de liofilizado). Esto no significa que la actividad antioxidante disminuya, ya que de acuerdo a lo reportado en el trabajo previo a esta investigación la actividad antioxidante observada en estos tiempos de hidrólisis aumenta y presenta su máximo valor a las 48 h de hidrólisis (tabla 13).

Tabla 13. Grado de hidrólisis de AN obtenidos con alcalasa.

TH (h)	GH (%)
24	47.36±1.55 ^a
36	47.70±1.03 ^a
48	48.32±0.77 ^a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Se ha reportado que al hidrolizar con alcalasa las proteínas extraídas del maíz (Kong y Xiong, 2006) el máximo GH obtenido fue a las 5 h y que la capacidad antioxidante de estos hidrolizados aumenta; por otro lado, en proteínas de soya (Chen y col., 1995) reportaron que el máximo GH se obtuvo a las 24 h de tratamiento y que, al contrario de lo reportado en las proteínas de maíz y en esta investigación, la actividad antioxidante disminuye, ya que su máxima actividad se reporta antes de tres horas de hidrólisis. De acuerdo a lo anterior, los hidrolizados de AN se comportan de forma similar a lo reportado para las proteínas de maíz, ya que su actividad antioxidante aumenta al incrementarse el GH, con la diferencia de que se requiere de una TH mayor (debido a que en el grano de amaranto existen inhibidores de serinproteasas y la alcalasa pertenece a este grupo de enzimas).

10.3 Perfiles electroforético de la albúmina 1 del grano de amaranto y sus hidrolizados

Las electroforesis de la AN se han publicado en diversos trabajos de investigación, en los que se destaca la presencia de fracciones proteicas de PM 45, 36, 26, 22, 17 kDa. La fracción correspondiente a 17 kDa ha sido identificada con el nombre de polipéptidos 2S (2MRPs), con un contenido de metionina de 16 a 18% y se ha reportado por diversos autores como la subunidad proteica de mayor concentración (Konoshi y col., 1991; Segura y col., 1992; Silva y col., 2004; Tovar y col., 2009).

El perfil electroforético de AN mostró bandas de PM 56, 48, 34, 20 y 17 kDa, mismas que han sido reportadas por Barba de la Rosa y col. (1992), Gorinstein y col. (2005) y Tovar y col. (2009). La fracción de 34 kDa se ha descrito como una fracción de la AN que contiene altas concentraciones de lisina, tirosina, fenilalanina, leucina, valina y aminoácidos azufrados (Raina y Datta, 1992). Al comparar los perfiles electroforéticos de los hidrolizados de AN a los tiempos de 24, 36 y 48 se observó que los hidrolizados mostraron degradación de las fracciones observadas para AN, las bandas correspondientes a fracciones proteicas de PM superior a 30 kDa ya no se aprecian y el resto disminuyen su intensidad. En estos perfiles electroforéticos se destaca la presencia de fracciones de PM <6.5 kDa, lo que coincide con lo reportado por Tovar y col. (2009), trabajo en el que se reporta que la hidrólisis de AN con alcalasa produce fracciones mayoritarias de PM menor a 6.5 kDa (figura 18).

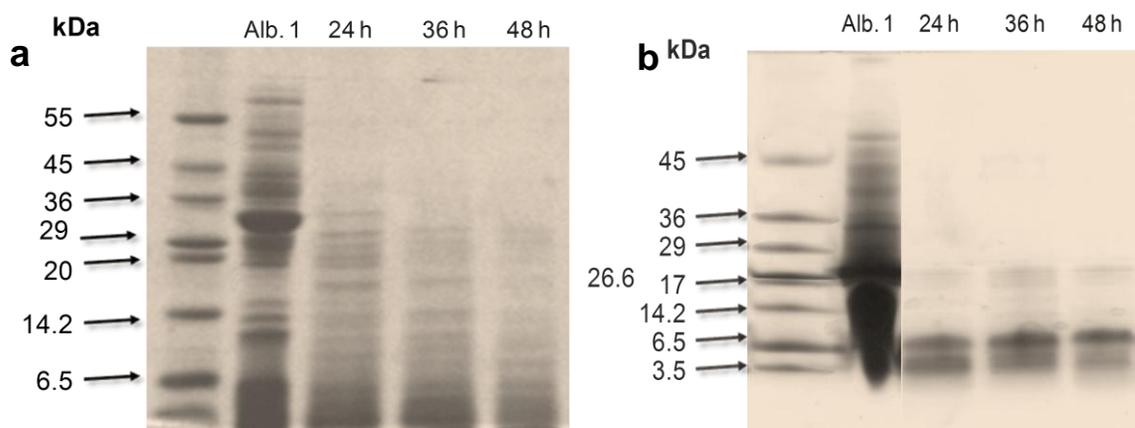


Figura 18. Perfiles electroforéticos de albúmina 1 nativa y sus hidrolizados enzimáticos de 24, 36 y 48 h. a) SDS-PAGE y b) Tris-Tricina-SDS-PAGE.

Por otro lado, el perfil electroforético de los hidrolizados de 24, 36 y 48 h no muestra cambios de consideración entre ellos, lo que corrobora que a estos tiempos se obtiene una hidrólisis máxima que no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$). Lo antes mencionada se ha reportado en el trabajo de investigación de Tovar y col. (2009) y Ortiz y Soriana (2010).

En el trabajo previo a esta investigación se reportaron las fracciones de PM < 6.5 kDa como fracciones peptídicas que presentan actividad antioxidante y poder de quelar iones metálicos (Fe y Cu). Por otro lado, diversos autores reportan hidrolizados de proteínas de fuentes naturales como la soya (Hua y col., 1996), el pez conocido como abadejo de Alaska (Se y col., 2001), alfalfa (Zhengjun y col., 2008) que son de cadena corta y con presencia de los aminoácidos histidina, triptófano y tirosina.

10.4 Cromatografía por filtración en gel

La hidrólisis de proteínas de fuentes alimenticias se lleva a cabo, ya sea por métodos químicos o enzimáticos. Con la finalidad de tener un mayor control de las especies peptídicas liberadas durante la hidrólisis se prefiere utilizar enzimas con las características necesarias para obtener en los hidrolizados cualidades concretas. Actualmente no solo se hidrolizan a las proteínas con la finalidad de aumentar su digestibilidad, sino para que también los hidrolizados liberados aporten beneficios para la salud. Por ello se busca conocer más características de los mismos, como el PM, composición de aminoácidos, funciones biológicas, características que están relacionadas y que les dan un alto potencial de utilidad en la formulación de alimentos funcionales, fármacos, cosméticos y nutricosméticos (Wu y col., 2005; Morales y col., 2009; Tabor y Blair, 2009).

Los resultados observados en la cromatografía por filtración en gel, utilizando una columna de Sephadex G-50, mostraron que los hidrolizados de AN presentan en su composición de especies peptídicas fracciones de proteína, proteosas, peptonas, péptidos y aminoácidos. Esta composición presentó variaciones de acuerdo al tiempo de hidrólisis al que fue sometida la AN, destacándose una disminución en el porcentaje de proteína y un aumento en porcentaje de peptonas debido al aumento del TH (tabla 14 y figura 19). Es importante mencionar que la distribución del PM nos permite observar que en los TH mayores (36 y 48 h) las fracciones de PM <5 kDa representan el 61.6 y 88.5 %, respectivamente, del total.

Tabla 14. Clasificación de especies hidrológicas de las fracciones obtenidas por cromatografía por filtración en gel Sephadex G-50 de los hidrolizados de albúmina 1 del grano de amaranto.

Proteína	Tiempo de hidrólisis	% Proteína (>20 kDa)	% Proteosa (5-10 kDa)	%Peptonas (1-5 kDa)	% Péptidos (200-500 Da)	% Aminoácidos (75-200 Da)
Albúmina 1	24	20.5	43.4	26.5	2.4	1.2
	36	9.6	28.7	60.0	0.5	1.1
	48	4.6	5.9	87.2	1.3	1.0

El porcentaje de cada especie se determino calculando el área bajo la curva.

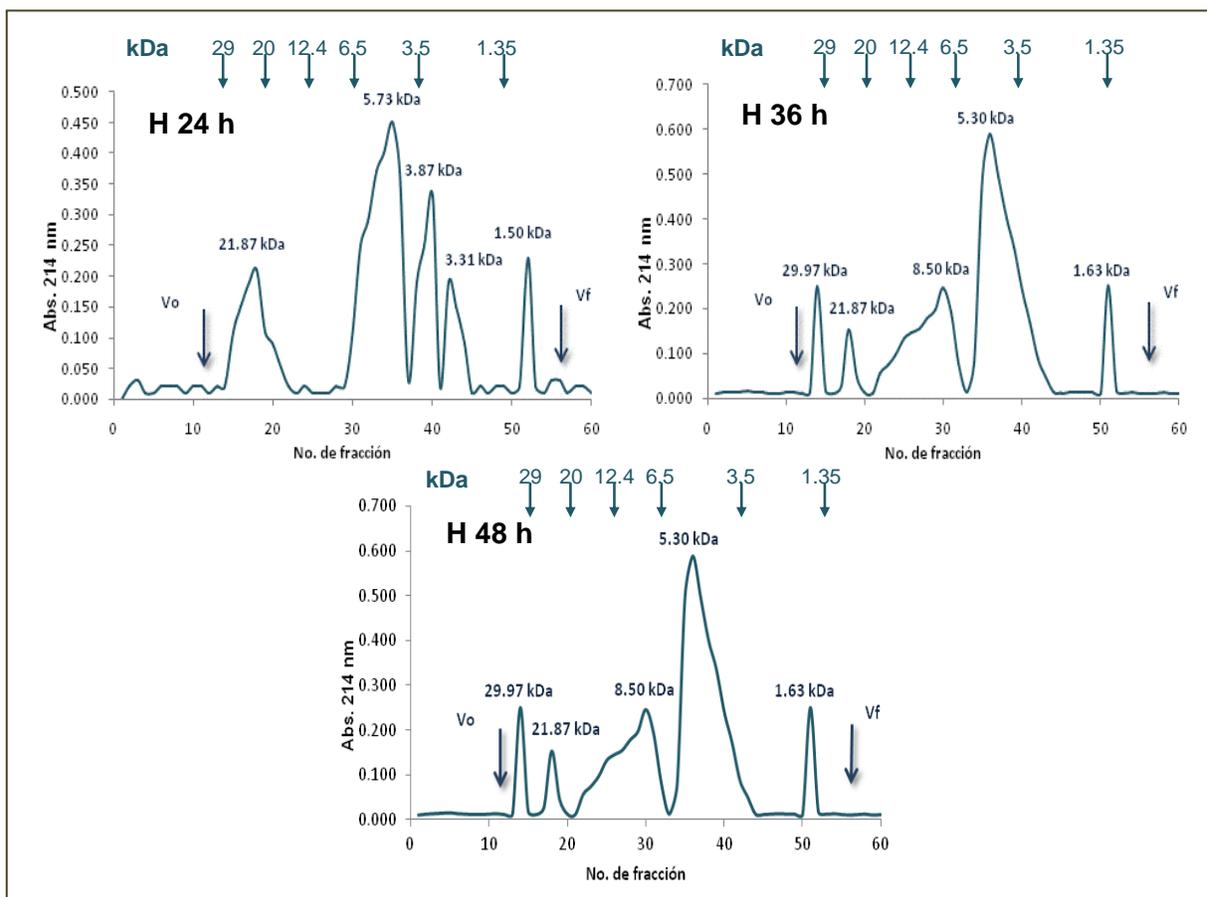


Figura 19. Perfiles cromatográficos de la composición de especies hidrolíticas en hidrolizados de albúmina 1 obtenidos utilizando una columna de Sephadex G-50.

Los cromatogramas por filtración en gel obtenidos mostraron que las fracciones observadas de mayor tamaño correspondían a un PM <30 kDa, resultado que concuerda con los obtenidos en la electroforesis, donde las bandas que correspondían a las fracciones proteicas con PM >30 kDa ya no se pueden apreciar en los perfiles de los hidrolizados. En general, se observó un mayor número de fracciones correspondientes a un PM <5 kDa que, como se ha venido mencionando, se han reportado con actividad antioxidante (figura 20).

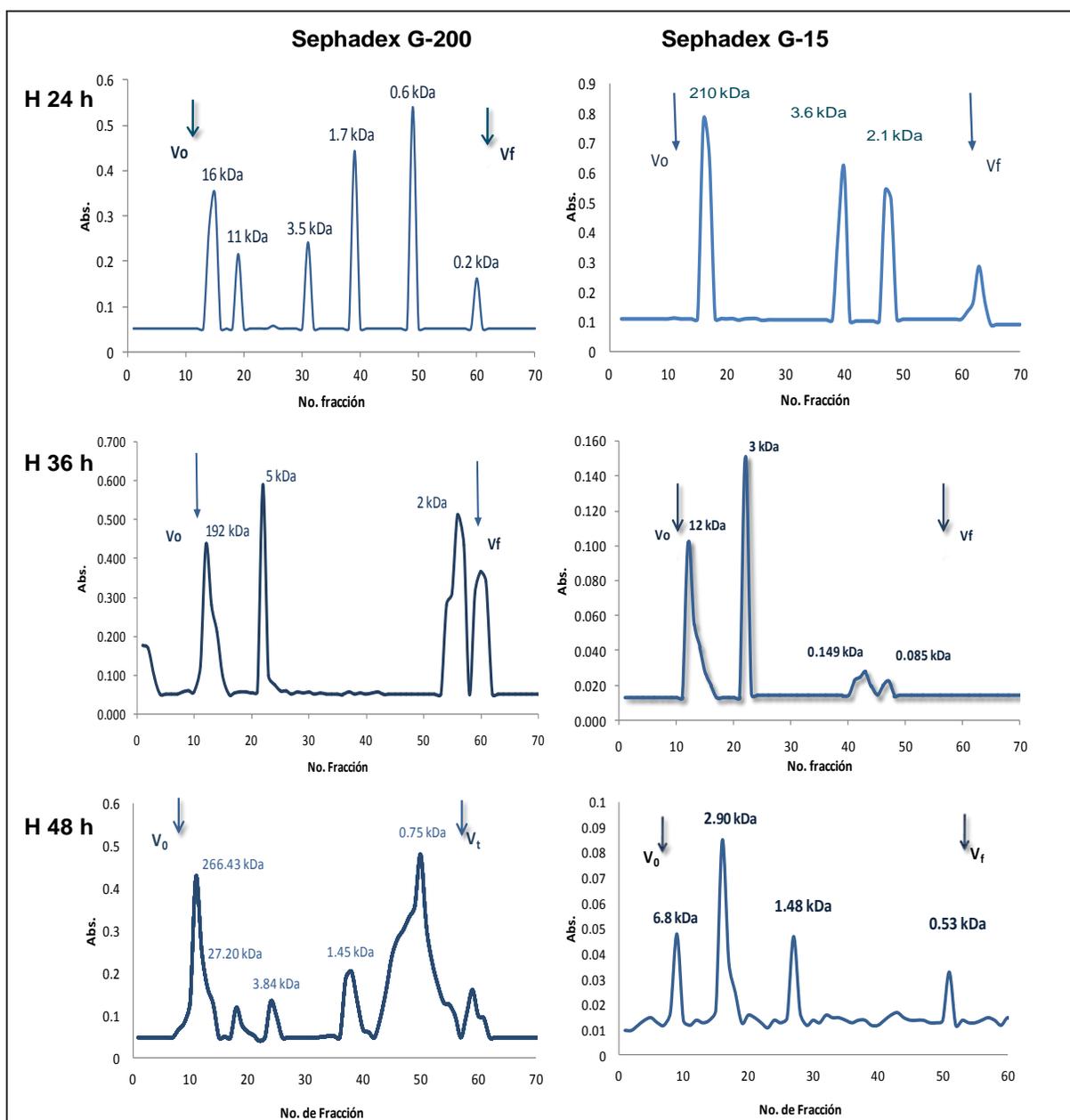


Figura 20. Perfiles cromatográficos de la composición de especies peptídicas de los hidrolizados de albúmina 1 (Sephadex G-15 y G-200).

Cabe mencionar que pocas investigaciones realizan la clasificación de especies peptídicas presentes en hidrolizados de acuerdo al porcentaje contenido: Algunas de ellas se han realizado en hemoglobina porcina (Chang y col., 2007) y trigo (Wang y col., 2007), clasificando las especies en intervalos de PM <5 (grupo III), 5-1 (grupo II) y >10 kDa (grupo I) y reportando una disminución en las cadenas de PM >10 kDa, un aumento en las de PM < 5 kDa y un contenido variable entre las especies de un PM de entre 5-10 kDa. Es importante clasificar a las especies hidrolíticas que componen a los hidrolizados de AN, ya que esta composición (cantidad y tamaño) se relaciona con la actividad biológica que presentan y su posible uso en la formulación de productos nutricosméticos.

10.5 Sistemas antioxidantes en cultivos organotípicos de piel humana

Un antioxidante es una sustancia que ayuda a prevenir y/o contrarrestar la oxidación de las macromoléculas de cuerpo humano. Estos antioxidantes se clasifican en dos tipos: exógenos y endógenos, siendo los primeros obtenidos por medio de la dieta y los segundos son sistemas que se encuentran en el organismo (Tabor y Blair, 2009). Debido a ello, esta investigación se enfocó en determinar el efecto protector de AN y sus hidrolizados en piel humana sometida a estrés oxidativo, midiendo la actividad de enzimas antioxidantes (específicamente la SOD, CAT y GPx), así como la inhibición del proceso de lipoperoxidación. La finalidad del trabajo fue determinar si la actividad antioxidante mostrada por AN y sus hidrolizados en métodos *in vitro* podría ser aplicados en métodos *ex vivo*, y de esta forma ser tomados en cuenta para una futura formulación de productos nutricosméticos.

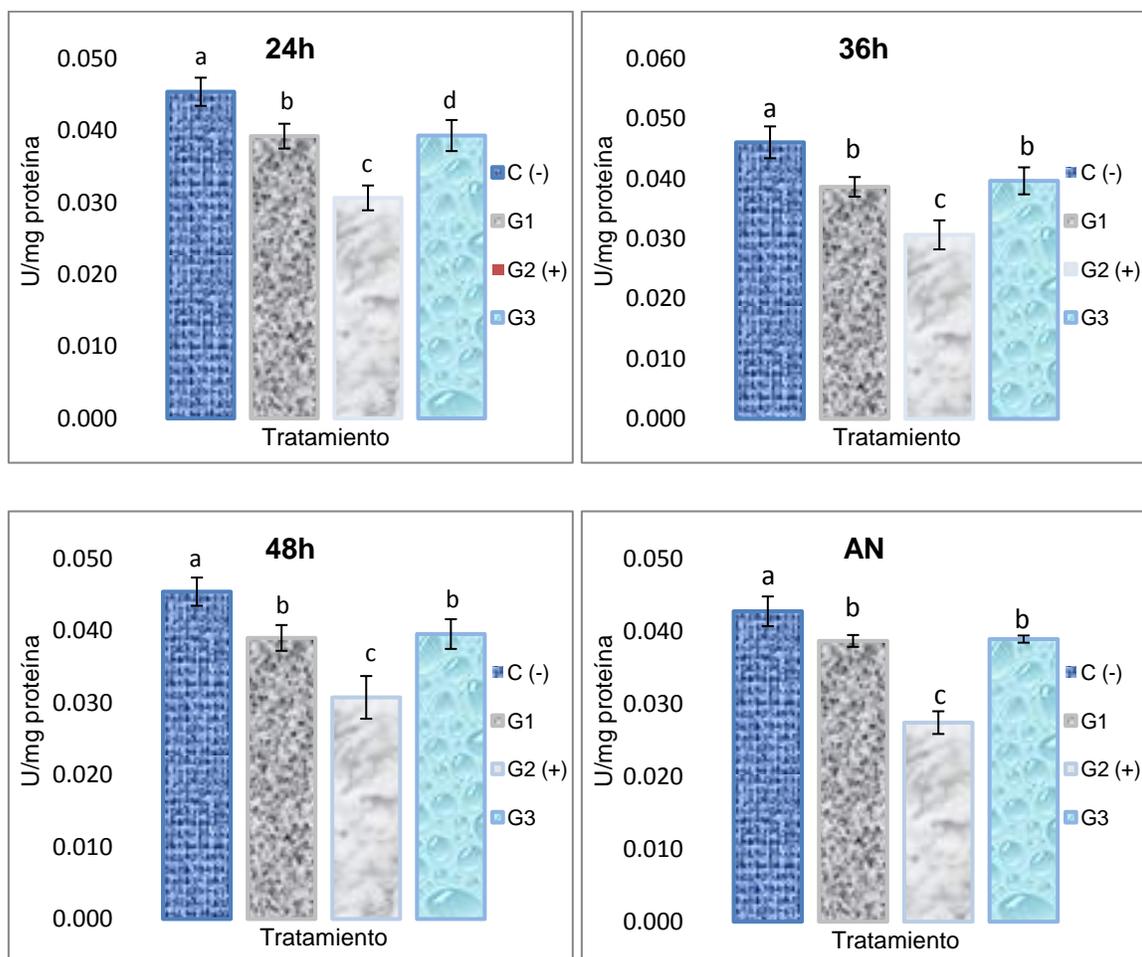
10.5.1 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa

La enzima antioxidante SOD es parte del sistema antioxidante endógeno del organismo humano, cuya función principal es reducir el O_2^- a H_2O_2 . La expresión de la enzima SOD se activa por la presencia factores oxidantes endógenos, como el humo de tabaco, la radiación solar y ciertos productos químicos, entre otros. Esta enzima antioxidante no sólo se encarga de la reducción antes mencionada, también regula determinadas enzimas que controlan los niveles de hierro libre. Con la regulación de estas enzimas se evita que exista un exceso de

iones Fe en el organismo, ion metálico que por medio de la reacción de Fenton inicia la formación de RL, radicales que a su vez forman más RL (Barroso y col.; 2003; Tabor y Blair, 2009).

Los beneficios que aporta la enzima SOD en contra de los efectos nocivos ocasionados por los RL en la piel se relacionan con el control de las reacciones que se llevan a cabo en el proceso de inflamación. Ejemplos de estas reacciones son: la iniciación de la lipoperoxidación por la presencia de iones metálicos, la inhibición de las enzimas de cadena respiratoria mitocondrial (sitio de mayor formación de ERO), la actividad de la ATPasa en la membrana celular y la inactivación de los canales de sodio de la membrana (Tabor y Blair, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo exhibieron que al exponer los fragmentos de piel humana a radiación UV se inhibe la actividad enzimática de SOD, observando una reducción en la actividad de 0.045 ± 0.002 (C) a 0.031 ± 0.001 U/mg proteína (G_2), índice de la presencia de estrés oxidativo. Con respecto a C en comparación con G_1 , se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la actividad enzimática de 0.045 ± 0.002 a 0.039 ± 0.002 U/mg proteína, respectivamente. Analizando G_2 en relación con G_3 se observó una actividad enzimática de 0.031 ± 0.001 y $0.039-0.040$ U/mg proteína, respectivamente; estos resultados indican una protección de NA e hidrolizados sobre la actividad enzimática de SOD en presencia de estrés oxidativo inducido con radiación UV (figura 21).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 21. Efecto protector de la albúmina nativa y sus hidrolizados (24, 36 y 48 h) en la actividad enzimática antioxidante de superóxido dismutasa.

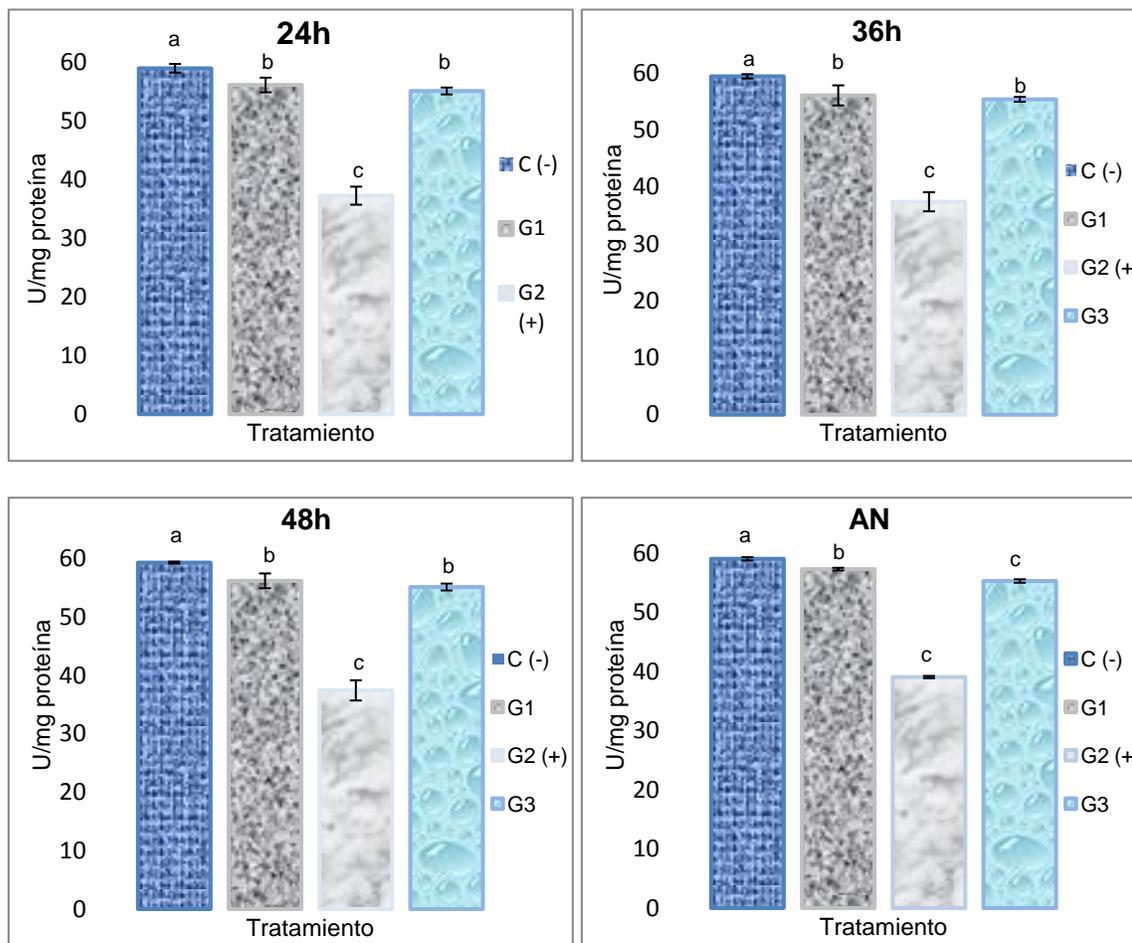
Los resultados obtenidos corroboran lo reportado en el trabajo previo a esta investigación, en la que se midió la actividad antioxidante de AN y sus hidrolizados por métodos *in vitro*. Es muy importante saber que ese tipo de resultados puede ser extrapolado a cultivos de células de piel humana. Tanto la AN como los hidrolizados protegen la actividad de la enzima antioxidante SOD y, por consiguiente, también ayudarían, de forma indirecta, a mantener las funciones que realiza esta enzima.

Se han reportado estudios en los que se evalúan los efectos protectores sobre las enzimas antioxidantes, entre ellos se encuentra el trabajo realizado por Dammak y col. (2007), en el que se realizan pruebas del efecto protector de aceites de semillas contra el estrés oxidativo en la piel, o el realizado por Chandra y col. (2003), quienes probaron los efectos protectores del ácido ascórbico contra el estrés oxidativo inducido por la exposición a los rayos γ (radiación que es utilizada en el tratamiento contra el cáncer). Al ser comparados los resultados del presente trabajo con los obtenidos en las investigaciones antes mencionadas se observó que AN y sus hidrolizados (24, 36 y 48 h) presentan un efecto similar al reportado en aceites de semillas (de C=0.030 a G₃=0.039 y C=0.031 a G₃=0.039 U/mg de proteína, respectivamente).

10.5.2 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante catalasa

La CAT es otra enzima antioxidante que forma parte del sistema endógeno destoxicador de RL del organismo, trabajando en conjunto con SOD. La CAT se puede localizar en grandes concentraciones en los fibroblastos, los cuales son responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular (Shin y col., 2005). La CAT está relacionada con la reversión del envejecimiento cutáneo, encargándose de la activación del proceso de mitosis celular. Además funciona como un biomarcador en algunas enfermedades de la piel, aunque su principal función radica en la protección de las células contra la proliferación de carcinomas malignos y cáncer de piel de tipo no melanoma (Tabor y Blair, 2009).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que la exposición de los fragmentos de piel humana a radiación UV inhibe la actividad enzimática de CAT, observándose una reducción en la actividad de 59 ± 0.737 (C) a 37 ± 1.541 U/mg proteína (G₂), lo que es indicativo de que las células sufrieron estrés oxidativo. Comparando el tratamiento C con el G₁, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la actividad enzimática de 59 ± 0.737 a $56-57$ U/mg proteína, respectivamente. Comparando G₂ con G₃, se obtuvo una actividad enzimática de 37 ± 1.541 y 55 ± 0.588 U/mg proteína, respectivamente. Estos resultados indican también una protección de NA e hidrolizados en la actividad enzimática de CAT en presencia de estrés oxidativo inducido con radiación UV (figura 22).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 22. Actividad enzimática de la enzima antioxidante catalasa en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados en cultivos de piel humana.

La capacidad protectora de la actividad de CAT fue medida para aceite de semillas (Dammak y col., 2007), reportándose una actividad enzimática que va de $G_2=38$ a $G_3=56$ U/mg proteína. Al ser comparados esos resultados con los valores de actividad enzimática obtenidos en esta investigación se observa que el comportamiento de protección entre el aceite de semillas y AN e hidrolizados es muy similar. Esto nos lleva a proponer a la AN y

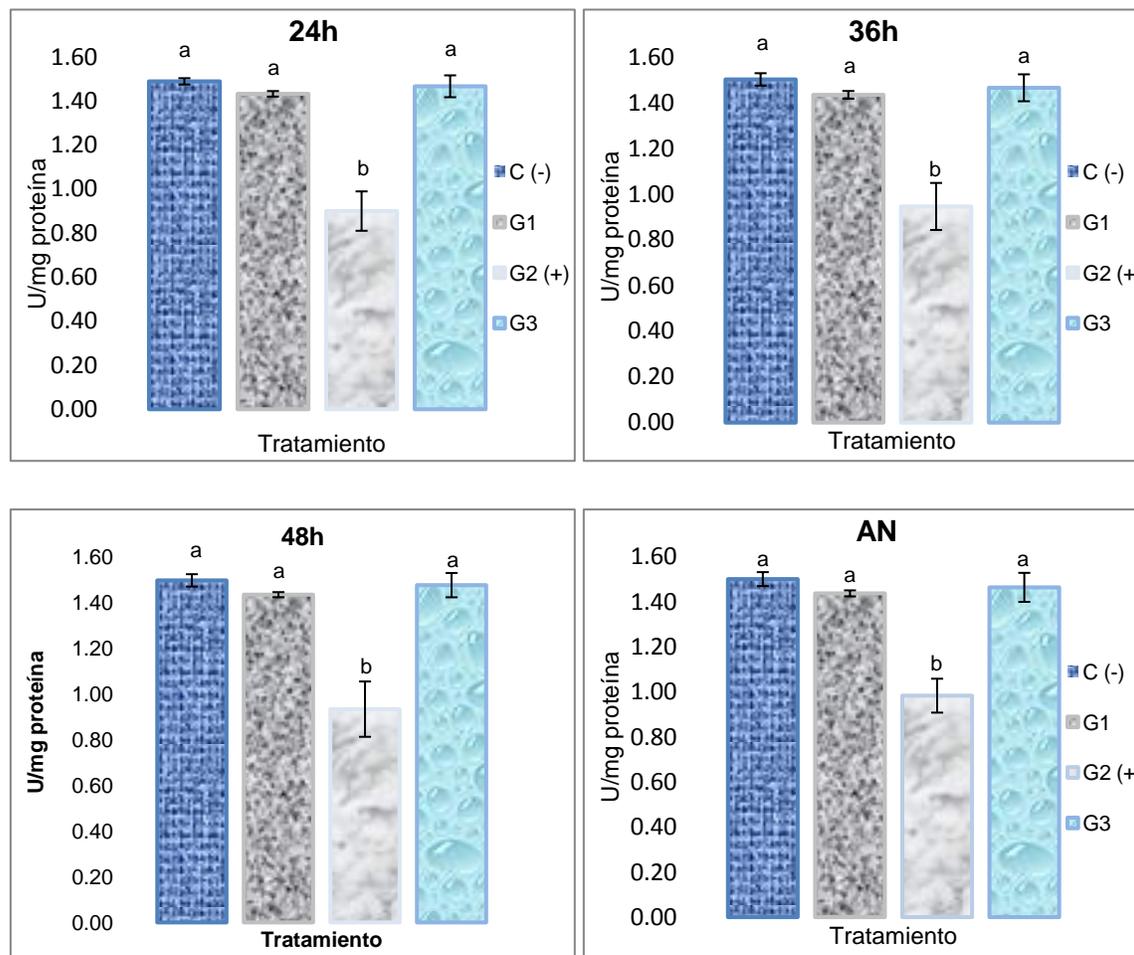
sus hidrolizados como compuestos antioxidantes que podrían ser utilizados en la formulación de productos nutricosméticos.

10.5.3 Ensayo de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa

Dentro del sistema de antioxidantes endógenos del organismo, además de SOD y CAT, se encuentra la GPx, enzima antioxidante cuya función consiste en reducir al H_2O_2 en H_2O en presencia de GSH. El GSH es un tripéptido antioxidante presente en las células, que en parte es proporcionado por la dieta (cereales, huevo, pescado, entre otros). Este tripéptido está formado por cisteína, glutamina y glicina y se caracteriza por transferir sus hidrógenos a molecular oxidadas para reducirlas (Morales J. A. G. y col., 2009).

La enzima GPx interviene en diversos procesos biológicos, entre los que se encuentran la catálisis de enzimas, la síntesis de proteínas, el transporte de membrana, la maduración de células y la síntesis de leucocitos. Estas actividades mencionadas, en conjunto con las que desempeña el GSH, permiten la reducción de los RL formados en la mitocondria. El efecto antioxidante de GPx y GSH está relacionado con la protección y reparación del sistema inmune y ADN (Tabor y Blair, 2009). Otras funciones que desempeña en el organismo son protección a la membrana del daño oxidativo y disminución de la velocidad de oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina en el eritrocito (Morales J. A. G. y col., 2009).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo exhibieron que al exponer los fragmentos de piel humana a radiación UV se inhibe la actividad enzimática de GPx, observándose una reducción en la actividad de 1.49 ± 0.014 (C) a 0.94 ± 0.089 U/mg proteína (G_2), indicativo de la presencia de estrés oxidativo. Comparando el tratamiento C con G_1 se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la actividad enzimática de 1.49 ± 0.014 a 1.43 - 1.44 U/mg proteína, respectivamente. Comparando G_2 con G_3 se obtuvo una actividad enzimática de 0.94 ± 0.089 y 1.46 - 1.48 U/mg proteína, respectivamente. Estos resultados también indican una protección de AN e hidrolizados sobre la actividad enzimática de GPx contra el estrés oxidativo inducido con radiación UV (figura 23).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 23. Actividad enzimática de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados en cultivos de piel humana.

Trabajos de investigación del efecto protector de ácido ascórbico (Chandra y col., 2003) y aceites de semillas (Dammak y col., 2007) reportaron que la actividad de las muestras probadas está relacionada con su actividad antioxidante y estas dos sustancias evitan la disminución de la actividad de la enzima antioxidante GPx. De acuerdo a los datos presentados en esta investigación, el efecto exhibido por AN y sus hidrolizados, en comparación con los reportados en aceites de semillas, demuestran que tanto el aceite como

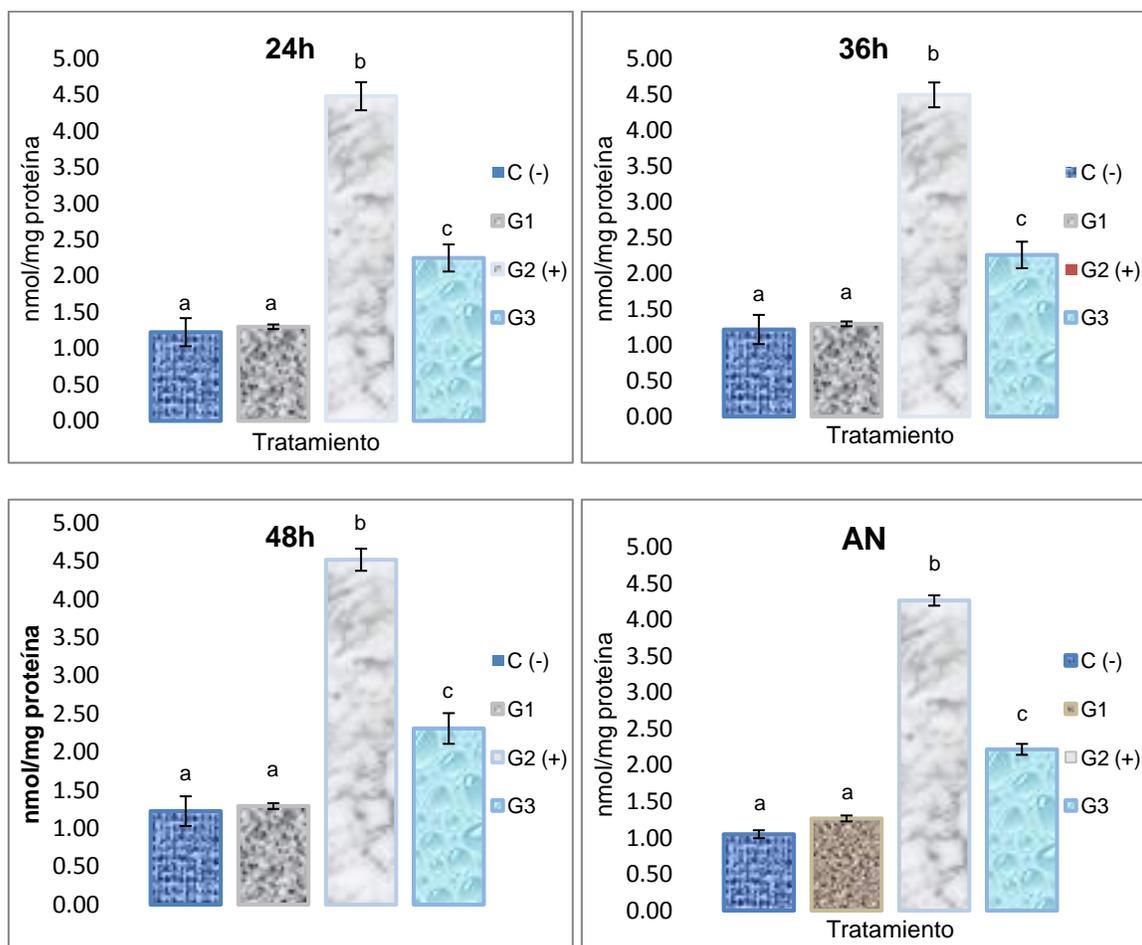
los hidrolizados protegen a la enzima antioxidante GPx contra el estrés oxidativo inducido en células de piel humana por la acción de rayos UV. Cabe mencionar que si se toma en cuenta la actividad enzimática de tanto SOD como CAT y GPx, se observa el mismo efecto protector de la AN e hidrolizados que el que se reporta en el caso de los aceites de semillas.

10.5.4 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Como se ha mencionado con anterioridad, la piel está formada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. Específicamente, la hipodermis, capa que funciona como amortiguador entre las capas de la piel y los órganos internos está constituida por adipocitos que contienen grandes cantidades de lípidos, los cuales sufren un proceso de oxidación (peroxidación de los lípidos). Este proceso no sólo daña a los lípidos de la piel, además desencadena la producción de RL, que a su vez daña a otras macromoléculas como proteínas y ADN, provocando con ello diversas patologías, no sólo en la piel, sino en el organismo humano completo (López y col., 2003; Morales J. A. G. y col., 2009).

El TBARS es el método más utilizado para medir la lipoperoxidación, con el cual se evalúa la concentración de especies capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico, y se utiliza para medir la concentración de especies reactivas presentes en los grupos de células de piel ensayados para cada muestra (AN, 24, 36 y 48 h).

Los resultados obtenidos exhibieron que al exponer los fragmentos de piel humana a radiación UV aumentó la presencia de especies reactivas de ATB, esto se observó al comparar los valores obtenidos en C y G₂ con valores de 1.18±0.01 y 4.44±0.01 nmol/mg proteína, respectivamente. Comparando los valores de MDA del tratamiento C con los del G₁ no se observaron diferencias significativas (P<0.05). Analizando G₂ en relación con G₃, se detectó una concentración de MDA de 4.44±0.01 y 2.22-2.31 nmol/mg proteína, respectivamente. Se observó, pues, una considerable reducción en la concentración de MDA (≈50 %), lo que indica que la AN y sus hidrolizados son una buena opción para la protección contra la peroxidación de los lípidos en la piel (figura 24).



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Figura 24. Concentración de malondialdehído medido en los tratamientos con albúmina nativa y sus hidrolizados probados en cultivos de piel humana.

Anteriormente se han mencionado trabajos de investigación relacionados con el efecto protector de compuestos antioxidantes (ácido ascórbico y aceite de semillas), donde también se mide la inhibición de la lipoperoxidación. Al igual que con las enzimas antes mencionadas, el comportamiento de la AN e hidrolizados es muy similar al reportado para el aceite de semillas. Este efecto inhibitor también se ha medido en extractos de romero, que al igual que el ácido ascórbico y el aceite de semillas presentan actividad antioxidante (Wada y col., 2011)

La reducción en la concentración de MDA se relaciona con lo reportado en el trabajo previo de Ortiz y Soriano (2010), en el que se encontró que los hidrolizados de AN tienen la capacidad de formar compuestos quelantes con los iones metálicos Fe y Cu. De esta forma, evitan la lipoperoxidación provocada por el estrés oxidativo inducido con rayos UV, ya que estos iones son los encargados de iniciar la formación de RL por medio de la reacción de Fenton. Adicionado a esto, la capacidad antioxidante de los hidrolizados les permite reducir a los RL que se formen, evitando de esta forma el padecimiento de diversas patologías que en la actualidad aquejan a la piel (Matés, 2000; Badui, 2006; Wada y col., 2011).

A pesar de sólo haberse ensayado el efecto protector en células de piel, este mismo beneficio podría ser probado en diferentes zonas del organismo humano que requieran prevenir la oxidación de lípidos presentes en su composición. Por lo tanto, en los productos en los que se utilice los hidrolizados de AN como principio activo, tendrían doble beneficio: protección contra los RL, tanto para el producto como para las personas que lo consuman.

10.5.5 Comparación de efecto protector

Al realizar la comparación de los efectos protectores de la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y el decremento en la concentración de MDA se observó que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los resultados exhibidos por AN y sus hidrolizados enzimáticos (figura 24). Este mismo efecto se presenta en cada una de las enzimas ensayadas y en la inhibición de la lipoperoxidación. Con estos resultados, se esperaría que al utilizar la AN del grano de amaranto sin hidrolizar en la formulación de productos nutricosméticos se obtendría el efecto protector. Sin embargo, debido a su PM de 35 kDa (Morales J. A. G. y col., 2009), en comparación con los péptidos obtenidos por la hidrólisis (que en su mayoría, tienen un peso molecular < 5 kDa) presentaría desventajas y los hidrolizados, al ser de PM menor, tendrían mayor facilidad para actuar en contra de los RL del organismo. Lo antes mencionado ha sido descrito previamente en relación al colágeno y sus hidrolizados, observándose que el colágeno presenta menor actividad protectora al ser probado en métodos *in vivo*, en comparación con sus hidrolizados (Le y col., 2007; Shigemura y col., 2009).

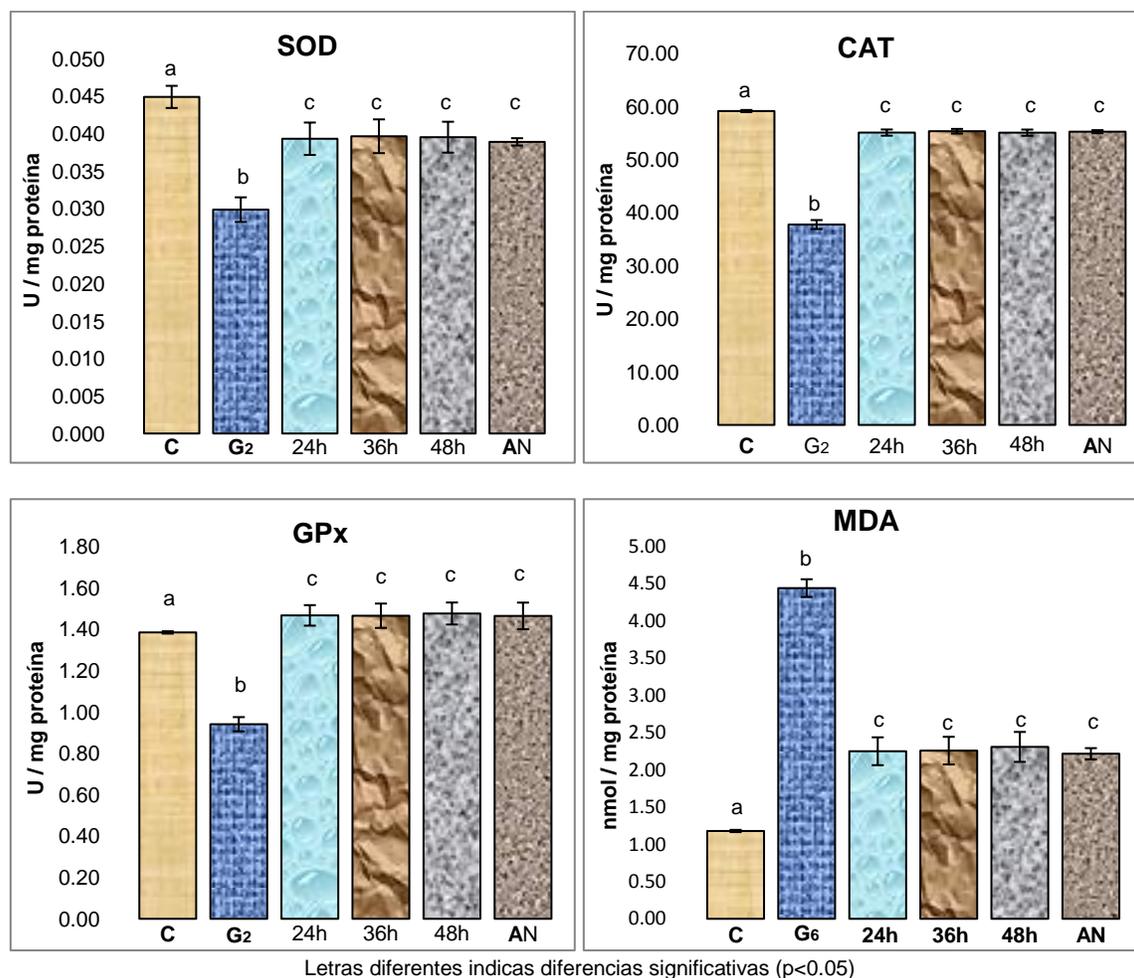


Figura 25. Comparación de los efectos de tratamientos en la actividad de enzimas antioxidantes ensayadas.

Las enzimas antioxidantes estudiadas durante la presente investigación son de gran relevancia en la depuración de RL en la piel. Tanto SOD como CAT y GPx son un sistema enzimático que trabaja en conjunto, siendo parte de los antioxidantes endógenos más importantes (Morales J. G. A. y col., 2009; Tabor y Blair, 2009). Por tal motivo, las investigaciones se han centrado en la forma en la que estas enzimas trabajan (Barroso y col., 2003; Morales J. A. G y col., 2009; Tabor y Blair, 2009), los sustratos que utilizan, su estructura e inclusive el estudio de sustancias que las protejan. Diversos autores reportan efectos protectores en la actividad de las enzimas antioxidantes presentes en la piel por

inducción de estrés oxidativo por la exposición prolongada con rayos gamma y UV con ácido ascórbico (Chandra y col., 2003) y con aceite de semillas (Dammak y col., 2007).

Con respecto a las industrias cosméticas y nutricosméticos, se ha reportado el empleo de péptidos naturales y sintéticos en la formulación de sus productos (Amer y Maged, 2009; Bissett, 2009; Tabor y Blair, 2009, Zhang y Falla, 2009), péptidos que presentan en su cadena aminoácidos con diversos beneficios antioxidantes contra los efectos de la radiación UV en la piel humana, como son glutamina, cisteína, metionina, histidina, lisina y arginina (Tabor y Blair, 2009). Algunos de estos aminoácidos se reportan en la secuencia de la albúmina 1 (Anexo 7) y, por lo tanto, están presentes en sus hidrolizados.

De igual forma, se han reportado investigaciones en las que se estudia el efecto protector de compuestos antioxidantes en otras aéreas del organismo, como en fibroblastos (Del Hoyo y col., 2010), en sangre (Iwai y col., 2005) o mediante valoración del efecto antiinflamatorio y reparador de ADN (Nichols y Katiyar, 2010). Estos estudios podrían realizarse utilizando la AN e hidrolizados en modelos vivos de experimentación (ratas o cerdos) y en humanos.

Este estudio se enfocó en los efectos de estos sistemas enzimáticos, que pueden ser protegidos por la AN y sus hidrolizados contra el estrés oxidativo inducido por radiación UV que afecta a células de piel humana. Esta protección está relacionada con la actividad antioxidante y capacidad de quelación que se ha reportado con anterioridad, no sólo en esta investigación, sino también en otras investigaciones en las que se busca proteger a la piel contra el estrés oxidativo ocasionado por diversos factores oxidantes exógenos a los que es sometida.

La capacidad de preservar la actividad de las enzimas antioxidantes, la reducción de la lipoperoxidación, la capacidad antioxidante y el alto valor nutricional de las proteínas del grano hacen de los hidrolizados de AN una buena opción de fuente natural de compuestos antioxidantes que pudiera ser utilizada en la formulación de alimentos funcionales, fármacos, cosméticos y, sobre todo, nutricosméticos.

11. Conclusiones

- El GH de los hidrolizados de AN obtenido a los tiempos de 24, 36 y 48 h no presenta diferencias significativas ($p < 0.05$).
- La electroforesis mostró que la hidrólisis con alcalasa de AN libera péptidos de PM < 6.5 kDa.
- Los perfiles electroforéticos presentan una disminución en las fracciones proteicas de PM > 30 kDa.
- Los hidrolizados de AN presentan una composición porcentual variada de especies peptídicas, donde predomina la presencia de fracciones de PM < 5 kDa. Especies peptídicas que se sabe tienen actividad antioxidante.
- La clasificación porcentual de especies pépticas muestra que en los hidrolizados de AN disminuye del contenido de proteína y aumento en el contenido de proteosas al aumentar TH.
- Tanto la AN como sus hidrolizados (24, 36 y 48 h) presentaron efectos protectores sobre la piel irradiada con luz UV al proteger la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx contra el estrés oxidativo.

- AN y sus hidrolizados disminuyen de forma significativo ($p < 0.05$) la concentración de MDA presente en los cultivos de piel, lo que indica una inhibición en el proceso de lipoperoxidación.

- Tanto la AN del grano de amaranto como sus hidrolizados son una buena fuente de fotoprotectores cutáneos, que proporcionarían efectos benéficos para la salud de la piel y, al mismo tiempo, nutrientes al organismo. Estas cualidades suponen un valor añadido del amaranto, que incentivaría el cultivo de esta planta.

- El presente estudio es el primero en evaluar la actividad antioxidante de la albúmina 1 del grano de amaranto y sus hidrolizados en el estrés oxidativo inducido por la exposición prolongada de radiación UV en cultivos organotípicos de células de piel humana, efecto que fue medido por la evaluación de la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y la reducción del proceso de lipoperoxidación.

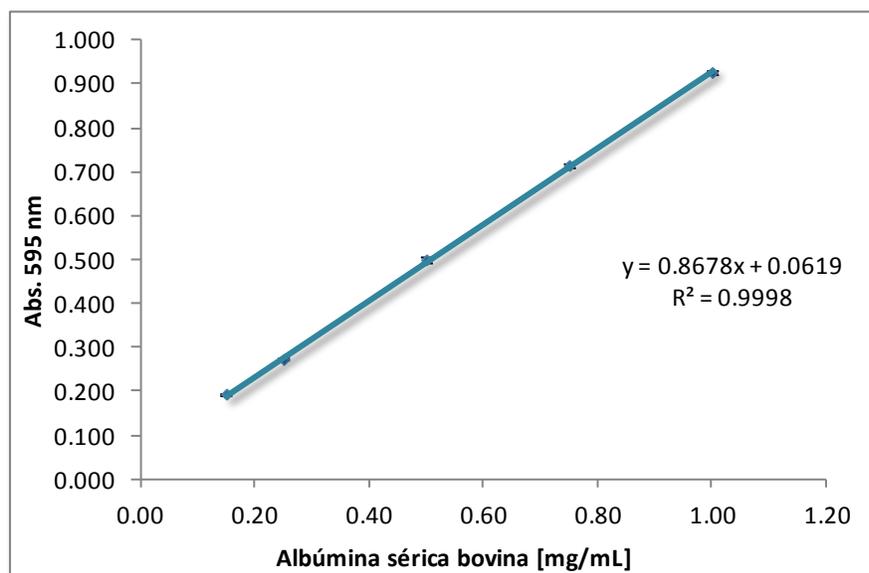
12. Recomendaciones

- 🌿 Evaluación de la actividad protectora de los hidrolizados de globulina y glutelinas en el estrés oxidativo de la piel humana.
- 🌿 Secuenciación de péptidos presentes en hidrolizados.
- 🌿 Evaluación de la capacidad atrapadora de ERO *in vitro* ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , $HOCl$, $NO_3^{\cdot-}$).
- 🌿 Evaluación de las enzimas antioxidantes glutatión reductasa (GR) y glutatión transferasa (GT).
- 🌿 Evaluación de efectos protectores de los hidrolizados de las proteínas del grano de amaranto en piel de ratas, por medio de la incorporación de los hidrolizados en su dieta.
- 🌿 Evaluación de efectos protectores de los hidrolizados en piel humana, al ser suministrados en la dieta de las personas.
- 🌿 Evaluación de los efectos antiinflamatorios y en el mecanismo de reparación del ADN.
- 🌿 Formulación de un producto nutricosmético en el que se incorpore el o los hidrolizados de las proteínas del grano de amaranto.

13. Anexos

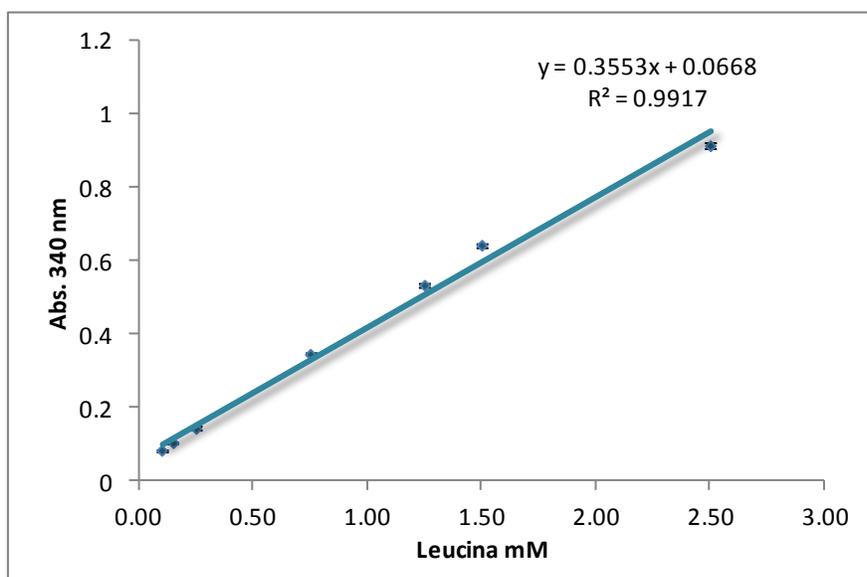
Anexo 1. Curva patrón de albúmina sérica bovina

Albúmina sérica bovina	Abs. 595 nm
0.15	0.194±0.003
0.25	0.273±0.003
0.50	0.500±0.006
0.75	0.715±0.004
1.00	0.927±0.004



Anexo 2. Curva patrón de L-leucina

Leucina mM	Abs. 340 nm
0.1	0.085±0.003
0.15	0.106±0.003
0.25	0.145±0.006
0.75	0.347±0.004
1.25	0.535±0.004
1.5	0.644±0.005
2.5	0.915±0.006



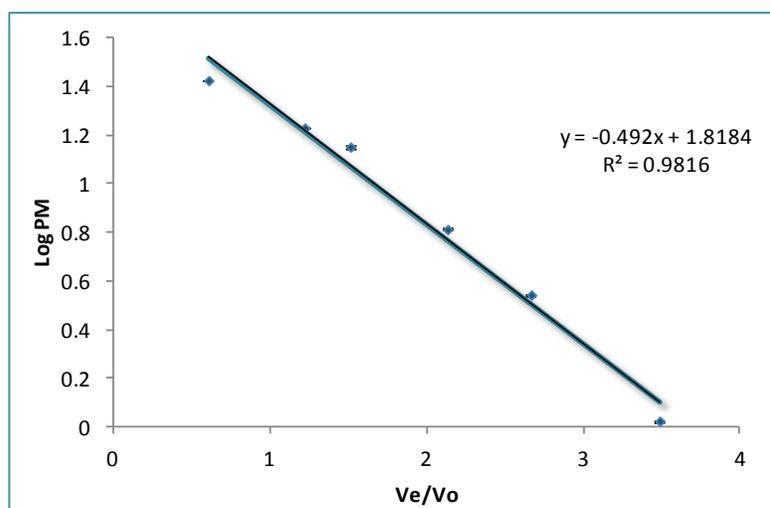
Anexo 3. Curvas patrón de marcadores para filtración en gel

Curva patrón de marcador de peso molecular conocido: triosa-fosfato-isomerasa (26.6 kDa), mioglobina (17 kDa), α -lacto-albúmina (14.2 kDa), aprotinina (6.5 kDa), insulina (3.5 kDa), bradicinina (1.06 kDa); utilizados en filtración en gel Sephadex G-15.

Estándar	Ve/Vo	Log (PM)
Triosafofatoisomerasa	0.607	1.425
Mioglobina	1.221	1.230
α -lactoalbúmina	1.513	1.152
Aprotinina	2.133	0.813
Insulina	2.667	0.544
Bradicinina	3.487	0.025

Ve/Vo: volumen de elución / volumen vacío

PM: peso molecular

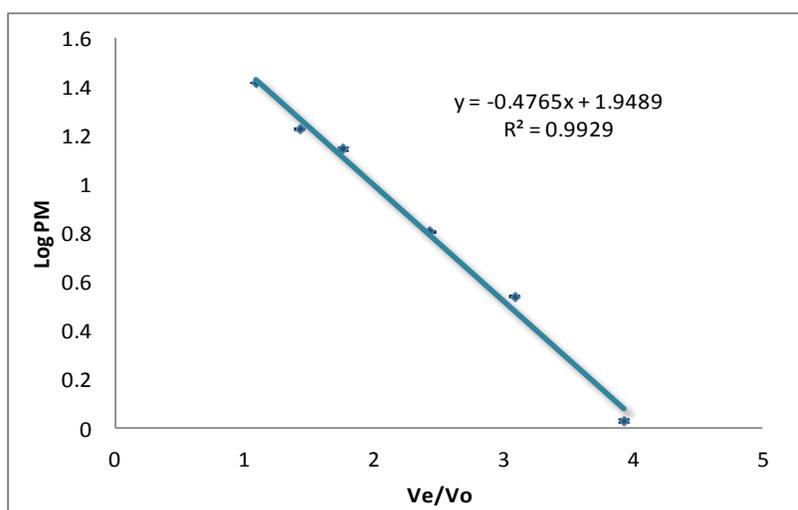


Curva patrón de marcador de peso molecular conocido: anhidrasa carbónica (29 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa), citocromo C (12.4 kDa), aprotinina (6.5 kDa), insulina (3.5 kDa), Vitamina B₁₂ (1.35 kDa); utilizados en filtración en gel Sephadex G-50.

Estándar	Ve/Vo	Log (PM)
Anhidrasa carbónica	1.08	1.42
Inhibidor de tripsina	1.42	1.23
Citocromo C	1.75	1.15
Aprotinina	2.42	0.81
Insulina	3.08	0.54
Vitamina B ₁₂	3.92	0.03

Ve/Vo: volumen de elución / volumen vacío

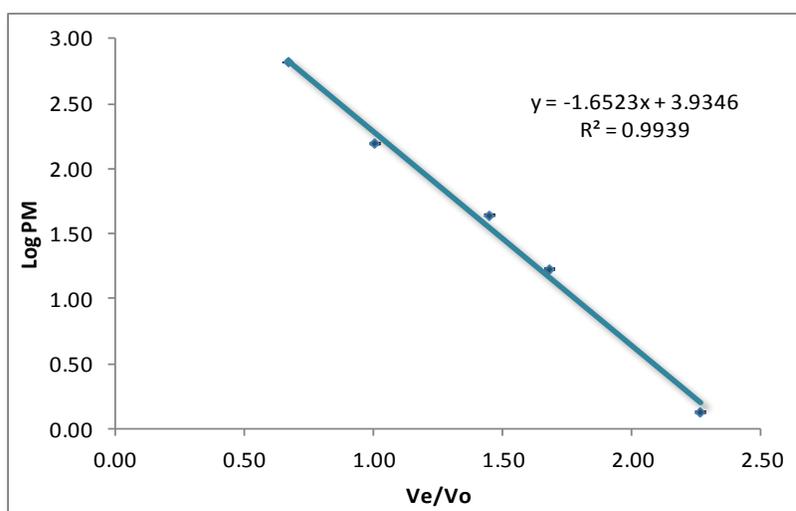
PM: peso molecular



Curva patrón de marcadores de peso molecular conocido: tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) y Vitamina B₁₂ (1.35 kDa); utilizados en filtración en gel Sephadex G-200.

Estándar	Ve/Vo	Log (PM)
Tiroglobulina	0.667	2.826
γ -Globulina	1.000	2.199
Ovoalbúmina	1.444	1.643
Mioglobina	1.677	1.230
Vitamina B ₁₂	2.26	0.130

Ve/Vo: volumen de elución / volumen vacío
PM: peso molecular



Anexo 4. Composición del DMEM

Drogas (mg/L)	L4100	P3100
Sales Inorgánicas		
CaCl ₂	165,00	165,00
MgSO ₄	97,67	97,67
NO ₃ K	0,076	0,076
Na ₂ SeO ₄ .5H ₂ O	0,017	0,017
KCl	330,00	330,00
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	125,00	125,00
NaCl	4500,00	4500,00
NaHCO₃	3024,00	
Vitaminas		
Biotina	0,013	0,013
D-Pantotenato.Ca	4,00	4,00
Clorhidrato Colina	4,00	4,00
Cianocobalamina	0,013	0,013
Fólico, ácido	4,00	4,00
i-Inositol	7,20	7,20
Niacinamide	4,00	4,00
Piridoxal.ClH	4,00	4,00
Riboflavina	0,40	0,40
Tiamina.ClH	4,00	4,00
Aminoácidos		
L-Alanina	25,00	25,00
L-Arginina.ClH	84,00	84,00
L-Asparagina.H ₂ O	28,40	28,40
L-Aspártico, ácido	30,00	30,00
L-Cistina.2ClH	91,20	91,20
L-Glutámico, ácido	75,00	75,00
L-Glutamina	584,00	584,00
Glicina	30,00	30,00
L-Histidina.ClH.H ₂ O	42,00	42,00
L-Isoleucina	105,00	105,00
L-Leucina	105,00	105,00
L-Lisina.ClH	146,00	146,00
L-Metionina	30,00	30,00
L-Fenilalanina	66,00	66,00
L-Prolina	40,00	40,00
L-Serina	42,00	42,00
L-Treonina	95,00	95,00
L-Triptofano	16,00	16,00
L-Tirosina.2Na	103,79	103,79
L-Valina	94,00	94,00
Otros Componentes		
Dextrosa anhidra	4500,00	4500,00
HEPES	5958,00	5958,00
Rojo Fenol.Na	15,00	15,00
Piruvato.Na	110,00	110,00

Anexo 5. Solución de Tripsina / EDTA

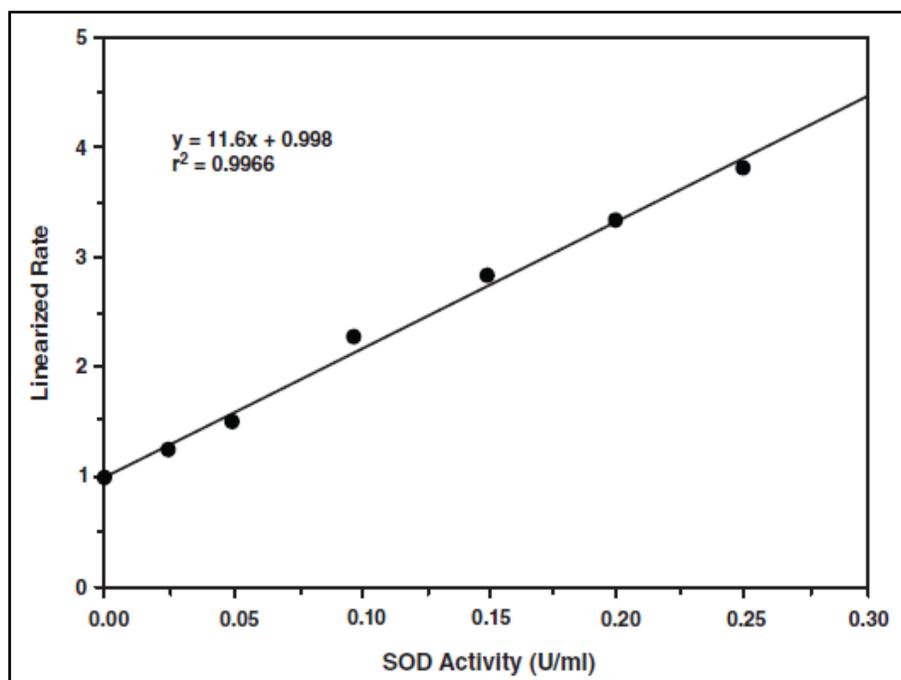
Tripsina / EDTA 100 mL

Número de catálogo: R-001-100

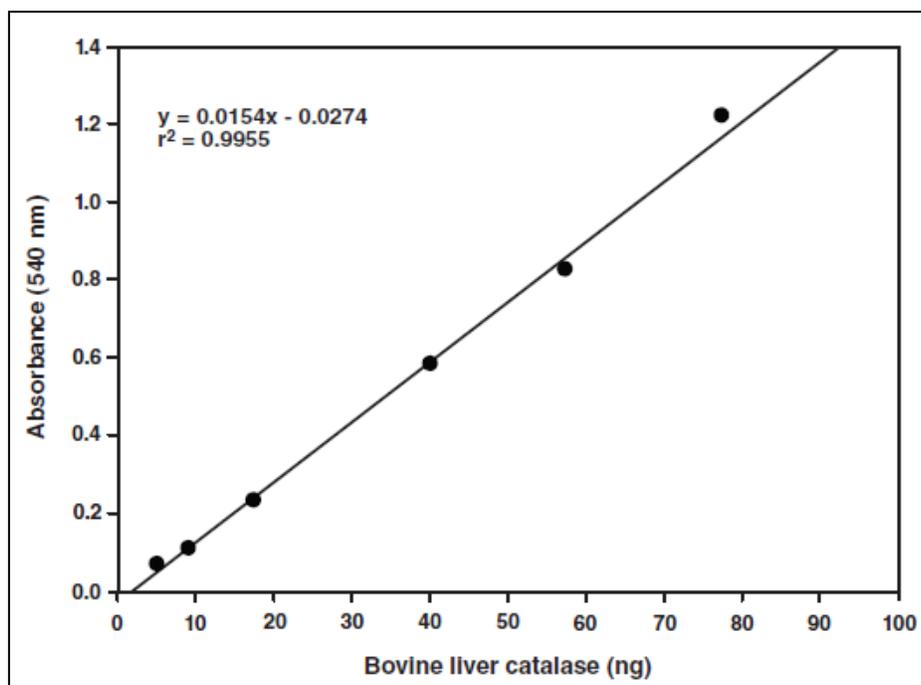
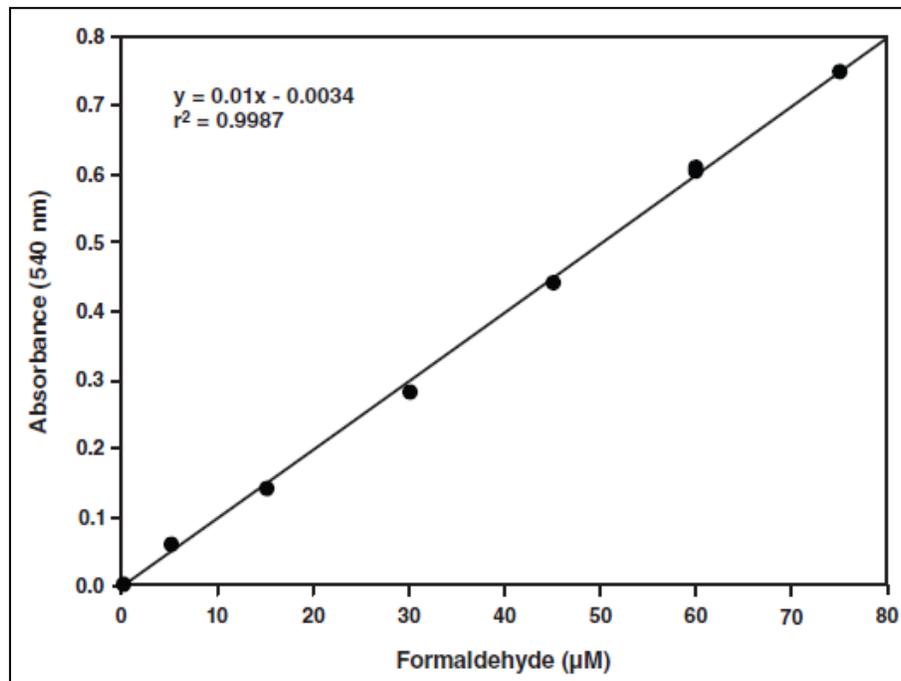
Descripción: Tripsina / EDTA (TE) solución estéril, tamponada con una solución salina de fosfatos (1x) que contiene 0.025% de tripsina bobina y 0.01% de EDTA, con un pH de 7.4 ± 0.1 a temperatura ambiente.

Anexo 6. Curvas patrón de ensayos enzimáticos

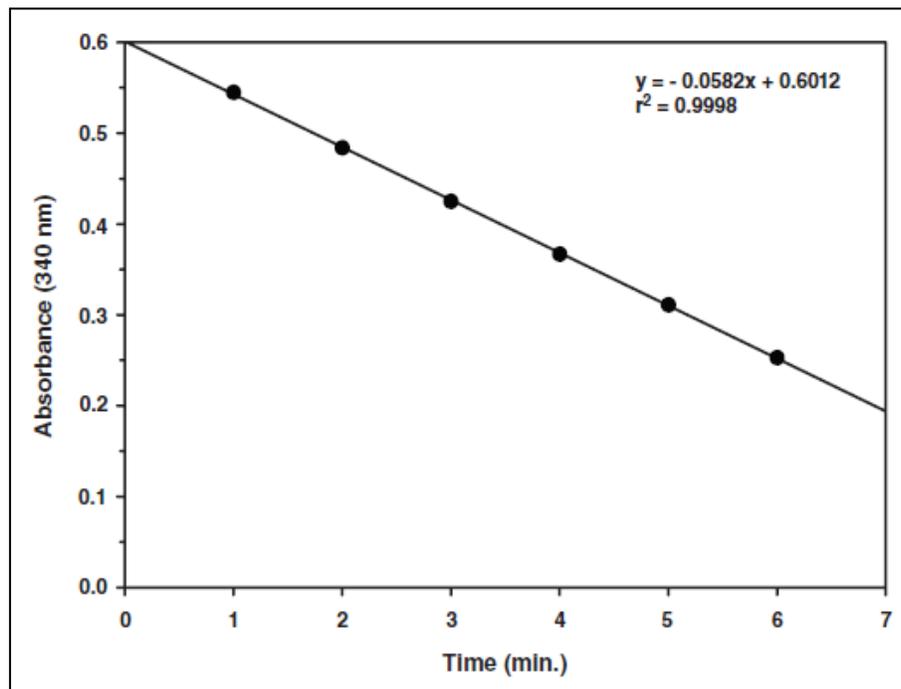
Curva patrón para determinar la actividad de SOD.



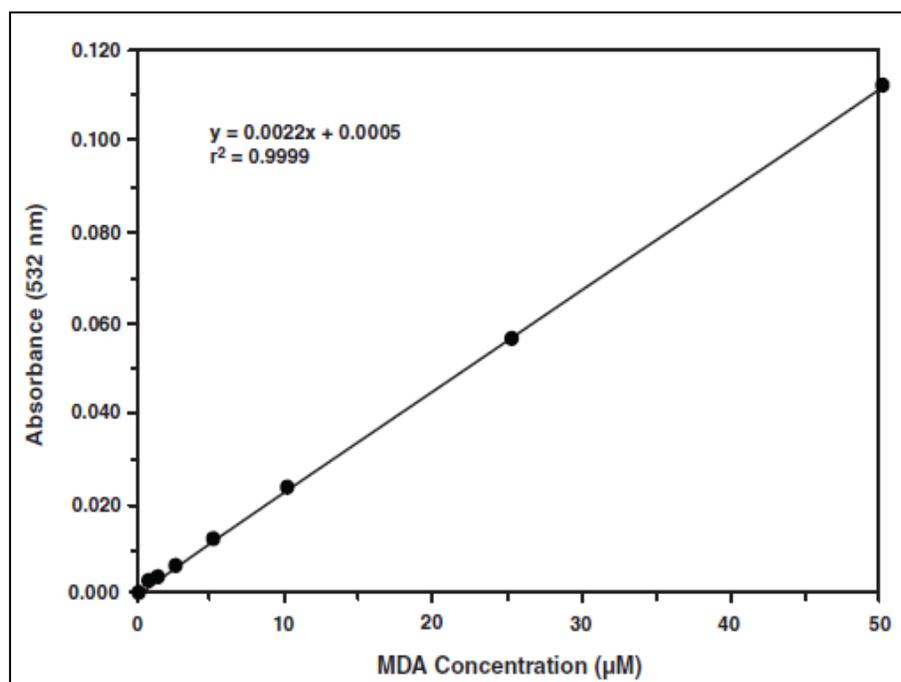
Curvas patrón para determinar la actividad de CAT.



Curvas patrón para determinar la actividad de CAT.



Curvas patrón para el Método de TBARS.



Anexo 7. Composición de aminoácidos en la secuencia de albúmina del grano de amaranto

Aminoácido	Albúmina
Ácido glutámico	17.5
Arginina	8.1
Lisina	7.6
Ácido aspártico	6.2
Leucina	5.7
Alanina	5.1
Fenilalanina	5.1
Serina	4.8
Valina	4.5
Metionina	4.1
Treonina	3.9
Glicina	3.7
Isoleucina	3.7
Prolina	3.7
Tirosina	3.3
Histidina	2.5

(Barba de la Rosa y col., 1992)

Anexo 8. Análisis estadístico

Análisis estadístico de efector protectores obtenidos al tratar a las células de piel humana con la albúmina nativa y sus hidrolizados.

Tabla de análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significancia
A: Tratamiento	2.800948E-03	3	9.336493E-04	116.96	0.000000
B: Individuos	6.730208E-05	5	1.346042E-05	4.00	0.002936
AB	1.197396E-04	15	7.982639E-06	2.37	0.007776
S	2.4225E-04	72	3.364583E-06		
Total (Ajustado)	3.230239E-03	95			
Total		96			

$\alpha=0.05$

Para el hidrolizado de 24 h:

SOD

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	.0307		
1	6		.0393	
3	6		.0393	
0	6			.0455
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

CAT

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	37.2500		
3	6		55.1000	
1	6		56.1250	
0	6			58.9667
Sig.		1.000	.392	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

GPx

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2	6	.9000	
1	6		1.4333
3	6		1.4667
0	6		1.4900
Sig.		1.000	.266

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

MDA

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1	6	1.3000		
0	6		2.2500	
3	6		2.2500	
2	6			4.4833
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Para el hidrolizado de 36 h:

SOD

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	.0307		
1	6		.0387	
3	6		.0397	
0	6			.0462
Sig.		1.000	.863	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

CAT

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	37.3667		
3	6		55.3667	
1	6		56.0500	
0	6			59.4000
Sig.		1.000	.781	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

GPx

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2	6	.9467	
1	6		1.4350
3	6		1.4650
0	6		1.5017
Sig.		1.000	.270

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

MDA

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0	6	1.2167		
1	6	1.2967		
3	6		2.2583	
2	6			4.4967
Sig.		.831	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Para el hidrolizado de 48 h:

SOD

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	.0308		
1	6		.0390	
3	6		.0395	
0	6			.0455
Sig.		1.000	.978	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

CAT

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	37.4083		
3	6		55.0833	
1	6		56.1417	
0	6			59.2583
Sig.		1.000	.378	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

GPx

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2	6	.9333	
1	6		1.4350
3	6		1.4767
0	6		1.4983
Sig.		1.000	.395

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

MDA

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0	6	1.2250		
1	6	1.2917		
3	6		2.3083	
2	6			4.5200
Sig.		.884	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Para la albúmina nativa:

SOD

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2	6	.0275		
1	6		.0387	
3	6		.0390	
0	6			.0428
Sig.		1.000	.978	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

CAT

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
2	6	39.0333			
3	6		55.2667		
1	6			57.2667	
0	6				59.0167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

GPx

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
2	6	.9833	
1	6		1.4383
3	6		1.4650
0	6		1.5017
Sig.		1.000	.193

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

MDA

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	6	1.0500			
1	6		1.2667		
3	6			2.2167	
2	6				4.2633
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

14. Bibliografía

Aito-Inoue, M.; Ohtsuki, K.; Nakamura, Y.; Park, E. Y.; Iwai, K.; Morimatsu, F. y Sato, K. 2006. Improvement in isolation and identification of food-derived peptides in human plasma based on precolumn derivatization of peptides with phenyl isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 5261-5266.

Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **27**: 1256-1262.

Amer, M. y Maged, M. 2009. Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clinics Dermatology*. **27**: 428-430.

Badui, S. D. 2006. Química de alimentos. Pearson Educación de México, S. A. de C. V. 283-287; 370-373.

Barba de la Rosa, A. P.; Gueguen, J.; Paredes, L. O. y Viroben, G. 1992. Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**: 931-936.

Barroso, A. S.; Quissell D. O. y Colepicolo, P. 2003. Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. *Archives of Oral Biology*. **48**: 133-139.

Bartosz, G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochemical Pharmacology*. **77**: 1303–1315.

Benkhail, H.; Köhler, F.; Lademann, J.; Lemanski, S.; Below, H. y Kramer, A. 2011. Comparison of the antioxidant potential in urine, saliva and skin. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* **6**: ISSN 1863-5245 (1-4).

Bissett, D. L. 2009. Common cosmeceuticals. *Clinics in dermatology*. **27**: 435-445.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.

Bressani, R. y García, L. A. V. 1990. Proteins fraction in amaranth grain and their chemical characterization. *Journal Agriculture Food Chemistry*. **38**: 1205-1215.

Bressani, R.; González, J. M.; Zuñiga, J.; Breuner, M. y Elías L. G. 1987. Yield, selected chemical composition and nutritive value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *Journal of Science of Food and Agriculture*. **38**: 347-353.

Búcaro, M. E. y Bressani, R. 2002. Distribución de la proteína en fracciones físicas de la molienda y tamizado del grano de amaranto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. **52**: 167-171.

Chandra, J. G.; Rajanikant, G. K.; Rao, S. K; Shrinath, B. M. 2003. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated γ radiation. *Clinica Chimica Acta*. **332**: 111–121.

Chang, Ch. Y.; Wu, K. Ch. Y Chiang, S. H. 2007. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*. **100**: 1537-1543.

Chen, H. M.; Muramoto, K.y Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean P-Conglycinin. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **43**: 574-578.

Cosmetics & Toiletries (Latinoamérica). 2009. Nutricosméticos. Belleza de dentro para fuera. **8**: 7-11.

Dammak, I.; Abdallah, F. B.; Boudaya, S.; Keskes, L.; Besbes, S.; El Gaied, A.; Attia, H.; Turki, H. y Hentatl, B. 2007. Effects of date seed oil on normal human skin *in vitro*. *European Journal of Dermatology*. **17**: 516-519.

Del Hoyo, P.; Garcia, R. A.; de Bistos, F; Molina, J. A.; Sayed, Y.; Alonso, N. H.; Caballero, L.; Arenas, J.; Agúndez, J. A. G. y Jiménez, J. F. J. 2010. Oxidative stress in skin fibroblasts cultures from patients with Parkinson's disease. *BMC Neurology*. **10**: 1-7.

Délano, F. J. P.; Avilés, A. H.; Casarrubias, C. K.; Casique, A. G.; Castrillón, A. P. A.; Herrera, E. L.; Massange, S. J.; Martínez, G. N. A.; Parra, C. F. I.; Vargas, O. E. y Estrada, H. M. G. 2011. Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) using

454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics*. 12: 363, 1-18.

Dooley, A; Richard, B. K. y Abraham, D. J. 2012. Modulation of fibrosis in systemic sclerosis by nitric oxide and antioxidants. *Hindawi Publishing Corporation Cardiology Research and Practice*. **2012**: 1-9.

Dziuba, J.; Iwaniak, A. y Minkiewicz, P. 2003. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Polymer*. **48**: 50-53.

Draelos, Z. D. 2010. Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinic in Dermatology*. **28**: 400-408.

El Mesallamy, H. O.; Metwally, N. S.; Soliman, M. S.; Ahmed, K. A. y Moaty, M. M. A. 2011. The chemopreventive effect of *Ginkgo biloba* and *Silybum marianum* extracts on hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Cell International*, **11**: 1-12

Ferrer, V. D; Fonseca, J. C.; Clavel, C. I.; Rodríguez, G. R. E. y Arce, G. D. L. 1999. Radicales libres y su papel en la homeostasia neuronal. *MEDISAN*. **3**: 5-11.

Flamand, N.; Marrot, L.; Belaidi, J. P.; Bourouf, L.; Dourille, E.; Feltes, M. y Meunier, J. R. 2006. Development of genotoxicity test procedures with Episkin®, a reconstructed human skin model: Towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? *Mutation Research*. **606**: 39–51

Fogg-Johnson, N. 2007. Venture capital investment drives health & wellness innovation. *Nutraceuticals World*. **10**: 70-86.

García, M.; Escamez, M. J.; Carretero M.; Mirones, I.; Martínez, L. S.; Navarro, M.; Jorcano, J. L.; Meana, A.; Del Rio, M. y Larcher, F. 2007. Modeling normal and pathological processes. through skin tissue engineering. *Molecular Carcinogenesis*. **46**:741–745.

GEDCyT (Grupo Español de Dermatología Cosmética y Terapéutica). 2007. Nutricosméticos y efecto anti-aging. *Simposio Satélite INNEOV*. 41-43.

Giacomoni, P. U. 2008. Advancement in skin aging: the future cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology*. **26**: 364–366.

Giacomoni, P. U. y Rein, G. 2004. Review: A mechanistic model for the aging of human skin. *Micron*. **35**: 179–184.

Gorinstein, S.; Pawelzik, E.; Delgado, L. E.; Haruenki, R.; Weisz, M. y Trakhtenberg, S. 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal protein by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **82**: 886-891.

Gorinstein, S.; Drzewiecki, D.; Delgado, L. E.; Pawelzik, E.; Martinez, L; Medina, O.; Haruenkit, R. y Trakhtenberg, S. 2005. Relationship between dicotyledone-amaranth, quinoa, fagopyrum, soybean and monocots-sorghum and rice base on protein analyses and their use as substitution of each other. *Europe Food Research Technology*. **221**: 69-77.

Gruenwald, J. 2007. Discovering active food and nutraceutical ingredients. *Nutraceuticals Worl*. **10**: 30-31.

Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez, D. M.; González, T. P. y Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. **41**(1): 79-89.

Ho, K. H.; Chop, S.; Lee, S.; Han, K. K.; Hyun, K. C.; Chul, H. E. y Ho, C. J. 2006. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin *in vivo*. *Journal of Lipid Research*. **47**: 2006.

Hook, V. Y. H.; Burton, D.; Yasothornsrikul, S.; Hastings, R. H. y Deftos, L. J. 2001. Proteolysis of ProPTHrP (1-14) by “Prohormone Thiol Protease” at multibasic residues generates PTHrP-Related peptides: Implications for PTHrP peptide production in lung cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **285**: 932-938.

Hua, C. M.; Muramoto K.; Yamauchi F. y Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**: 2619-2623

Iwai, K.; Hasegawa, T.; Taguchi, Y.; Morimatsu, F.; Sato, K.; Nakamura, Y.; Higashi, A.; Kido, Y.; Nakabo, Y. y Ohtsuki, K. 2005. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. **53**: 6531-6536.

Jae, J. Y.; Zhong, J. Q.; Hee, B. G. y Se, K. K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. **42**: 840-846.

Jair, A.; Mal, J.; Mehndiratta, V. y Chander, R. 2011. Study of oxidative stress in vitiligo. *Indian Journal of Clinic Biochemistry*. **26**:78–81.

Katiyar, S. K.; Afaq, F.; Perez, A. y Mukhtar, H. 2001. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis*. **22**: 287-294.

Kim, H. H.; Cho, S.; Lee, S.; Kim, K. H. y Cho, K. H.; Eun, H. C. and Chung, J. H. 2010. Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin *in vivo*. *Journal of Lipid Research*. **47**: 921-930.

Kong B. y Xiong, Y. L. 2006. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 6059-6068.

Konishi, Y.; Fumita, Y., Ikeda, K.; Okuno, K. y Fuwa, H. 1985. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus*. *Agriculture Biological Chemistry*. **49**: 1453-1458.

Konishi, Y; Horikawa, K., Oku, Y.; Azumaya, J. y Nakatani, N. 1991. Extraction of two anbumin fractions from amaranth grains: comparison of some physicochemical properties and putative localization in the grain. *Agricultural and Biological Chemistry*. **11**: 2745-2750.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.

Le, B.; Chen, F.; Wang, X.; Ji, B. y Wu, Y. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*. **102**: 1135–1143.

Lizárraga, D. M. A. 2008. Nutricosméticos. ¿Son peligrosos? *Más Dermatología*. **6**:17-21.

López, D. G. N.; Gutiérrez, R. M. C.; Cortés, B. E.; Zentella, D. A. y Konigsberg, F. M. 2003. Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. *Rev Cubana Invest Biomed*. **22**:109-116.

Madeleine Porr /proyecto El Pan Alegre. 2009. Amaranto: planta latinoamericana con fuerzas colosales. 1-12.

Matés J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. **153**: 83–104

Matés, J. M.; Pérez, G. C. y Núñez C. I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. **32**: 595–603.

Meisel, H. 2001. Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Australian Journal of Dairy Technology*. **56**: 83-91.

Morales, G. J. C.; Vázquez, M. N. y Bressani, C. R. 2009. El Amaranto. *Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán*.

Morales, J. A. G.; Fernández, A. M. S.; Bautista, M. A.; Vargas, N. M y Madrigal, E. O. S. 2009. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México. Vol. I y II.

Morganti, P. 1991. The future of cosmetic dermatology. Oral cosmesis: a new frontier. *Every Day Problems in Dermatology: The Cosmetic Connection*. **2**: 291-300.

Morganti, P.; Randazzo, S. D. y Cardillo, A. 1986. Role of insoluble and soluble collagen as skin moisturizer. *Journal Application Cosmetol*. **4**: 141-152.

Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. 2007. Review: Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*. **43**: 477–503.

Nichols, J. A. y Katiyar, S. K. 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives Dermatological Research*. **302**: 71-83.

Obregón, O.; Aure, G.; Navas, C.; Rangel, Y.; Nadaf, R.; Castro, J. y Gutiérrez, E. 2007. Proteína C reactiva (PCR), niveles de malondialdehído (MDA) y resistencia a la insulina en la revolución de eventos aterotrombóticos agudos de pacientes con niveles bajos. *Revista Medica* **15**: 163-169.

Oesser, S. y Seifst, J. 2003. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res.* **311**: 393-399.

Ortega, D. E. 2009. Amaranto: planta latinoamericana con fuerzas colosales. *Informaciones Madeleine Porr /proyecto El Pan Alegre.* 1-12.

Ortiz, H. A. y Soriano S. J. 2010. Tesis de especialidad: Evaluación de la capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L). Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. *Buren St., Suite 1000.* Chicago, IL USA.

Ortiz, H. A. y Soriano, S. J. 2011. Biopéptidos antioxidantes obtenidos de la hidrólisis con alcalasa de las proteínas de grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L). Memorias en extenso AMIDIQ.

Osborne, T. B. 1924. The vegetable proteins. *Monographs in Biochemistry.* 2a. edición. Logmans, Green and Co., Nueva York.

Padhye, V. W. y Salunke, D. K. 1977. Biochemical studies on black gran (*Phaseolus mungo*): solubilization and electrophoretic characterization of the proteins. *Journal Food Biochemistry.* **1**: 111.

Pappinen, S; Pryazhnikov, E.; Khiroug, L.; Ericson, M. B.; Yliperttula, M. y Urtti, A. 2012. Organotypic cell cultures and two-photon imaging: Tools for in vitro and in vivo assessment of percutaneous drug delivery and skin toxicity. *Journal of Controlled Release.* **161**: 656–667.

Paredes, O. L.; Guevara, F. L. y Bello, L. A. P. 2006. Amaranto. En: *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas.* FCE, SEP, CONACyT, CAB (Colec. La ciencia para todos). México D.F. 88-104.

Pérez, G.P. L. y Pérez, A. J. L. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Medico Militar*. **29**:192-198.

Pileggi, V. P.; Afonso, J. A.; Adriano, J. F.; Vannucchi, H.; Marchini, J. S.; Carvalho y C. S. F. 2011. Inflammatory and oxidative stress after surgery for the small area corrections of burn sequelae. *Acta Cirúrgica Brasileira*. **26**: 320-324.

Raina, A. y Datta, A. 1992. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balance amino acid composition from *Amaranthus*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America. *Biology*. **89**: 11774-11778.

Rijnkels, J. M.; Moison, R. M. W.; Podda, E. y Beijersbergen G. M. J. van H. 2003. Photoprotection by antioxidants against UVB-radiation-induced damage in pig skin organ culture. *Radiation Research*. **159**: 210–217

Robbins, D. y Zhao, Y. 2011. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. *Enzyme Research*. **2012**: 1-7.

Robert, L.; Labat-Robert J. y Robert A. M. 2008. Physiology of skin aging. *Pathologie Biologie*. **57**: 336–341.

Roberts, P. R.; Burney, J. D.; Black, K. W. y Zaloga, G. P. 1999. Effect of chain length on absorption of biologically active peptides from the gastrointestinal trac. *Digestion*. **60**: 332-337.

Rodríguez, P. J. M.; Menéndez, L. J. R. y Trujillo, L. Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Medica Militar*. **30**: 36-44.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación): <http://www.sagarpa.gob.mx>. 2011.

Schägger, H. y Von Jagom, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. **166**: 368-379.

Se, K. K.; Yong, T. K.; Hee, G. B; Kyung, S. N. Dong, S. J. y Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**: 1984-1989

Segura, N. M.; Barba de la Rosa, A. P.; y Paredes, L. O. 1994. *Biochemistry of amaranth protein*. In O. Paredes-López (Ed.). *Amaranth: Biology, Chemistry and Technology* (pp. 75-106). Boca Ratón, Florida: CRC Press.

Shigemura, Y.; Iwai, K.; Morimatsu, F.; Iwamoto, T.; Mori, T.; Oda, C.; Taira, T.; Park, E. Y.; Nakamura, Y. y Sato, K. 2009. Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57**, 444–449

Shin, M. H.; Rhie, G. E.; Kim, Y. K.; Park, C. H.; Cho, K. H.; Eun, H. C. y Chung, J. H. 2005. H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin *in vivo*. *Journal of investigative Dermatology*. **125**: 221-229.

Silva, S. C.; González, C. J.; De León, R. A. y Barba de la Rosa, A. P. 2004. Functional and rheological properties of amaranth albumins extracted from two Mexican varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*. **59**: 169-174.

Silva, S. C.; Barba de la Rosa, A. P.; León, G. M. F.; de Lumen, B. O.; León, R. A. y González, M. E. 2008. Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 1233-1240.

Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS): <http://www.sinais.salud.gob.mx/indicadores/basicos.html>. 2012.

Soriano, J. S.; Iwabuchi, S. y Fujimoto, K. 1992. Solubility of amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride: the main factor in quantitative extraction for analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. **27**: 337-346.

Sun, Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine*. **8**: 583-599.

Tabor, A. y Blair, R. M. 2009. Nutritional cosmetics: Beauty from within. William Andrew: Applied Science Publisher.

Tovar, P. E. G.; Guerrero, L. I.; Farrés, G. A. y Soriano, S. J. 2009. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide fractions from albumin 1 and globulin as obtained of amaranth grain. *Food Chemistry*. **116**: 437-444.

Wada, M.; Nagano, M.; Kido, H.; Ikeda, R.; Kuroda, N. y Nakashima, K. 2011. Suitability of TBA Method for the evaluation of the oxidative effect of non-water-soluble and water-soluble rosemary extracts. *Journal of Oleo Science*. **60**: 579-584.

Wildman, R. E. C. 2001. Nutraceuticals: a brief review of historical and theological aspects. *Nutraceutical and Functional Food*. 1-12.

Zahouani, H.; Boyer, G.; Pailler-Mattei, C.; Ben Tkaya, M. y Vargiolu R. 2011. Effect of human ageing on skin rheology and tribology. *Wear*. **271**: 2364– 2369

Zhang, L. y Falla, T. J. 2009. Cosmeceuticals and peptides. *Clinics Dermatology*. **27**: 485-494.

Zhengjun, X.; Junrong, H.; Xueming, X. y Zhengyu, J. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hidrolysate. *Food Chemistry*. **111**: 370-376.