

# EVALUACIÓN INMUNONUTRICIONAL DEL AMARANTO. DESARROLLO DE PRODUCTOS PROTEICOS DE ALTO VALOR AÑADIDO

ALICIA MARTÍNEZ LÓPEZ

TESIS DOCTORAL 2022



INSTITUTO DE LA GRASA  
Departamento de Alimentación y Salud

FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Bioquímica Médica y  
Biología Molecular e Inmunología





# **EVALUACIÓN INMUNONUTRICIONAL DEL AMARANTO. DESARROLLO DE PRODUCTOS PROTEICOS DE ALTO VALOR AÑADIDO**



**INSTITUTO DE LA GRASA**

Departamento de Alimentación y Salud



**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología

Memoria presentada por Dña. Alicia Martínez López para optar al grado  
de Doctor por la Universidad de Sevilla



**Dr. SERGIO MONTSERRAT DE LA PAZ**, Profesor del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla

**Dra. MARÍA DEL CARMEN MILLÁN LINARES**, Responsable de la Unidad de Biología Celular del Instituto de la Grasa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “EVALUACIÓN INMUNONUTRICIONAL DEL AMARANTO. DESARROLLO DE PRODUCTOS PROTEICOS DE ALTO VALOR AÑADIDO” realizada por Dña. Alicia Martínez López para optar al grado de Doctor, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

V.º B.º

Los Directores

Dr. Sergio Montserrat de la Paz

Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Millán Linares

Dr. VÍCTOR SÁNCHEZ MARGALET, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla, CERTIFICA que Dña. Alicia Martínez López cumple los requisitos académicos (R.D. 99/2011) para optar al grado de Doctor.

V.º B.º

El Tutor

Dr. Víctor Sánchez Margalet



“Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar...”

A ti, abuela Luisa,  
por enseñarme el valor de cada oportunidad.





## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría comenzar agradeciendo, en primer lugar, a mis directores de tesis, Sergio Montserrat de la Paz y María del Carmen Millán Linares, por la oportunidad que me han dado. Por su disposición siempre a ayudarme, por su paciencia y por hacer que todo fuera siempre tan fácil con ellos. Así mismo, agradecer al departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular e Inmunología de la Universidad de Sevilla y al departamento de Alimentación y Salud del Instituto de la Grasa con sus respectivos directores, por permitir desarrollar este trabajo en sus grupos e instalaciones, así como a los compañeros de ambos departamentos que me han ayudado para que todo saliera adelante.

Así mismo, no quiero olvidarme de aquellas personas que me dieron la primera oportunidad en el mundo de la investigación y me enseñaron la base para desarrollar mi carrera investigadora. A Antonio Carrillo, a mis compañeros Nuria e Ivan por enseñarme tanto desde que llegue al laboratorio, recién acabada la carrera, y tuvieron la paciencia y tesón de formarme, y a Guille y Ana por acompañarme también en esa etapa.

Por último, y no menos importante, me gustaría agradecer a mi familia y a mi marido, por creer más en mí que yo misma, por su apoyo incondicional para que siga luchando siempre por lo que me propongo y no dejar que me rinda nunca. A mis abuelas, porque siempre están presentes para mí y son una razón más para no abandonar. Sé que hubieran estado orgullosas de su nieta.

GRACIAS.



## ABREVIATURAS

---

APK	Aislado Proteico de Kiwicha
ApoA/B	Apo-Lipoproteína A/B
Arg-1	Arginasa-1
AU	Unidades Anson
BHT	Butilhidroxitolueno
CU	Colitis Ulcerosa
DE	Desviación Estándar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-IV	Dipeptidil Peptidasa-4
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EC	Enfermedad de Crohn
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ELISA	Inmunoensayo Ligado a Enzimas
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
FRAP	Poder Antioxidante de Reducción del Hierro
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa
GH	Grado de Hidrólisis
HDK	Harina Desengrasada de Kiwicha
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HDP	Péptidos de Defensa Natural del Huésped
HPK	Hidrolizado Proteico de Kiwicha
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
HPRT	Hipoxantina Fosforribosiltransferasa
IA	Índice Aterogénico
IDR	Ingesta Diaria Recomendada
IFN $\gamma$	Interferón Gamma
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LPS	Lipopolisacárido Bacteriano
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
OPC	Células Precursoras de Oligodendrocitos
PER	Índice de Eficiencia Proteica
PGE2	Prostaglandina E2
pI	Punto Isoeléctrico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real
SNC	Sistema Nervioso Central
STZ	Estreptozotocina
TAE	Equivalentes de Ácido Tánico
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNBS	Ácido Trinitrobenceno Sulfónico
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
UNU	Universidad de Naciones Unidas
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<i>Amaranthus caudatus</i> L. ....	3
Características y usos.....	3
Composición nutricional de <i>Amaranthus caudatus</i> .....	12
Compuestos bioactivos de <i>Amaranthus caudatus</i> .....	27
Actividad biológica de <i>Amaranthus caudatus</i> .....	31
HIDROLIZADOS PROTEICOS Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS .....	38
Hidrolizados proteicos vegetales .....	38
Péptidos bioactivos.....	43
INFLAMACIÓN .....	52
Inflamación Intestinal .....	55
Inmunomodulación.....	56
Neuroinflamación .....	58
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
Reactivos y muestras .....	69
Curva de solubilidad de proteínas.....	69
Obtención del aislado de proteína de kiwicha .....	69
Hidrólisis del aislado de proteína de kiwicha .....	70
Evaluación del grado de hidrólisis.....	71
Composición química de los productos proteicos obtenidos .....	71
Determinación de la composición de aminoácidos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución .....	72
Digestibilidad proteica .....	73
Perfil molecular por Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas.....	74
Actividad antioxidante .....	75
Cultivo y tratamiento de células Caco-2 .....	76
Cultivo y tratamiento de monocitos .....	77
Diferenciación y polarización de monocitos en macrófagos M1 y M2 .....	77
Cultivo y tratamiento de células BV-2.....	78
Ensayo de viabilidad celular .....	79

Extracción de ARN y Retrotranscripción .....	79
Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real cuantitativa (qRT-PCR).....	80
Cuantificación extracelular de citoquinas .....	81
Análisis por citometría de flujo .....	82
Análisis estadístico .....	83
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
1. Caracterización química de productos proteicos de alto valor añadido de kiwicha .....	87
Obtención del aislado de proteína de kiwicha .....	87
Caracterización química de productos de kiwicha .....	88
Composición en aminoácidos de los productos de kiwicha .....	89
Grado de hidrólisis y perfil molecular de los productos de kiwicha .....	91
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante de los hidrolizados de kiwicha	93
2. Evaluación de las propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados proteicos de kiwicha a nivel intestinal .....	95
3. Evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de los hidrolizados proteicos de kiwicha a nivel de inflamación sistémica .....	104
Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha en la quimiotaxis de monocitos .....	104
Propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados de proteína de kiwicha en monocitos .....	111
Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha sobre la polarización de monocitos .....	115
4. Evaluación de las propiedades neuroprotectoras de los hidrolizados proteicos de kiwicha .....	117
Propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados de proteína de kiwicha en microglía .....	117
Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha sobre la polarización de microglía .....	120
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>123</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>145</b>



# 1. INTRODUCCIÓN





## INTRODUCCIÓN

### *Amaranthus caudatus* L.

#### Características y usos

La familia Amaranthaceae es considerada generalmente como la “familia del Amaranto”. En la actualidad también es conocida como el cultivo del tercer milenio. Basado en estudios taxonómicos, la familia se divide en dos secciones denominadas *Amaranthus saucer* y *Blitopsis dumort.*

La palabra "amaranto" proviene de la palabra griega "amarantos" que significa "no marchito"; este término se aplicó a esta planta para resaltar sus abundantes características, simbolizando la inmortalidad [1]. Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), el género amaranto se compone principalmente de unas 70 especies, la mayoría de ellas nativas de América y solo 15 especies provenientes de Europa, Asia, África y Australia. La división de especies se basa en la utilización de la planta, diferenciando entre especies en las que se utiliza el grano de amaranto, la parte vegetal, su uso ornamental o si simplemente es considerada maleza [2]. Dentro de los conocidos como amarantos de grano encontramos cuatro especies, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. caudatus*, y *A. edulis* [3, 4]. El género *Amaranthus* generalmente incluye plantas anuales monoicas excepto alguna forma dioica (muy restringida en distribución y tiene una aspecto ramificado y tupido). La planta puede medir desde 0,3 a 5 metros dependiendo de la especie y las hojas son oblongas y elípticas con un color verde de tonalidades claras u oscuras y que

puede presentar pigmentaciones rojas. Las inflorescencias son muy prominentes y coloridas, pudiendo presentar de 100 a 250 flores por glomérulo [4]. Los granos de polen son de forma esférica y las semillas son pequeñas y lenticulares con un diámetro promedio de 1 a 1,5 mm [5, 6]. El color de las semillas varía entre especies, pudiendo ser desde color marfil a negras [4, 6-8]. En la **Figura 1** se pueden apreciar detalles de la planta de amaranto.



**Figura 1.** Detalles de las características botánicas de las hojas, inflorescencias y semillas de *Amaranthus*.

Los amarantos son un grupo destacado dentro de las plantas clasificadas como pseudocereales, con un gran potencial para prevenir la desnutrición, especialmente en los países en desarrollo

y con deficiencia de alimentos [9]. Los pseudocereales se definen como frutos o semillas de especies distintas a las herbáceas que se consumen de forma muy similar a los cereales y son eficaces suplementos nutricionales de los mismos. Actualmente, el amaranto es considerado como uno de los pocos cultivos polivalentes que suministran semillas en grandes cantidades, pudiendo ser utilizadas de diferentes formas, es decir, como pseudocereal, como sabrosa verdura de hoja de alta calidad nutricional, y también como alimento y pienso animal [9-11]. Comparados con el trigo, el arroz y la avena, los granos o semillas de amaranto no contienen gluten [12] y poseen un alto contenido en proteínas, incluyendo un perfil equilibrado de aminoácidos [9].

La mayoría de las especies del género *Amaranthus* spp. son nativas de América, con una alta variación fenotípica [13]. La semilla de amaranto se cultivó por primera vez en América, en el período prehistórico. La evidencia más antigua se encontró en una excavación arqueológica en una cueva en Tehuacán, México, donde encontraron semillas con una antigüedad de 6000 años. Este hecho sugiere que el amaranto se utilizaba como alimento principal en Centroamérica durante el período maya y azteca [14], aunque después de la colonización de América, su uso disminuyó significativamente [13]. Es decir, el amaranto es una de las primeras plantaciones conocidas, cultivada y utilizada extensamente por los aztecas, quienes la consideraban un superalimento. De hecho, el amaranto no solo se ha consumido por su semilla, sino también por sus hojas ricas en proteínas y micronutrientes [1]. Por ejemplo, en

India y otros países asiáticos las hojas de amaranto se comen como las espinacas, es por ello que es conocida como “espinaca china” [15].

Hoy en día, el amaranto se conoce a menudo como kiwicha. Se cultiva en pequeña escala en algunos lugares del mundo como México, Guatemala, Perú y Nepal, y tiene una perspectiva brillante para convertirse en un cultivo mayor en Estados Unidos y países tropicales [16].

Como se indicó anteriormente, existen aproximadamente 70 especies de *Amaranthus* que se distribuyen por todo el mundo en zonas de clima templado, subtropical y tropical [3]. Además de la zona de América tropical, la India ha sido considerada como uno de los centros de distribución del amaranto [3]. Más recientemente, se ha sugerido que China es también uno de los mayores productores a nivel mundial de amaranto, tanto para el consumo de cereales como para el uso como planta forrajera. Otros países en los que comienza a ser importante la producción de amaranto son Estados Unidos, Canadá y Argentina. Sin embargo, no hay datos oficiales sobre los niveles de producción mundial [11].

El amaranto puede crecer en condiciones climáticas muy variadas y en distintos tipos de suelos [17, 18]. Las características de *A. caudatus* lo convierten en un cultivo atractivo, tanto en el mundo occidental como en los países en desarrollo, adaptándose fácilmente a entornos nuevos y exigentes, incluidos algunos que son inhóspitos para los cereales. En la actualidad, es un cultivo alimenticio prometedor, principalmente por su resistencia al calor, a la sequía [3, 19, 20], a las enfermedades y a las plagas [21]. Además, presenta un potencial efecto para mitigar los problemas del cambio climático

por su menor requerimiento de agua en comparación con otros cultivos como el trigo, el maíz y el algodón [16]. Por todas estas razones, el cultivo de amaranto es un cultivo sostenible, permitiendo el sustento de las demandas alimentarias y nutricionales de las poblaciones más vulnerables [22].

El amaranto es una planta cuyas hojas se comen como verdura mientras que las semillas se comen como cereal [6, 23]. Debido al alto rendimiento de los cultivos y a su alta capacidad de producción de semillas, las especies *A. caudatus*, *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, tienen un enorme potencial para satisfacer la demanda de alimento en países menos desarrollados. Actualmente es utilizado en panadería, galletas, bizcochos, caramelos, tortitas, pasta y fideos, entre otros. [3]. En Perú, Bolivia y México las semillas de amaranto se utilizan como grano. En Perú con las semillas cocinadas como palomitas hacen dulces y melazas y con las semillas en crudo se hace harina. En la India, las semillas se usan principalmente para hacer dulces llamados *ladus* y, a veces, se toman con arroz después de hervirlas. En la región del Himalaya, la harina de semillas se usa para hacer *chapatis*. En los Estados Unidos, las semillas se utilizan para hacer galletas saladas, galletas dulces, como cereal y también en la preparación de productos horneados. Un uso tradicional del amaranto en México y otros países es mezclar amaranto con miel para hacer un tipo de aperitivo o snack y a veces, las semillas enteras se utilizan para hacer gachas o como condimento en otras preparaciones [3]. El uso más común es moler las semillas para obtener harina y usarla en la producción de panes, tortitas, cereales o pasteles, siendo un alimento con características de cereal, libre de

gluten, muy nutritivo y con buena aceptación [11]. De hecho, los dulces y aperitivos elaborados con este grano se consumen ampliamente en Asia y América del Sur [24, 25].

La harina de trigo mezclada con un alto contenido de proteína de amaranto se puede utilizar para mejorar el valor nutricional de productos alimenticios como fideos y galletas o bien preparados de patatas o yuca y panes y pasteles de maíz. Así mismo, el amaranto se puede utilizar para sustituir el trigo y otros productos de cereales alterando significativamente las propiedades funcionales y tecnológicas de los productos. Incluso podría utilizarse para elaborar pan sin gluten, especialmente para consumidores celíacos [26, 27].

La harina de amaranto también se utiliza frecuentemente mezclada con maíz para obtener una fuente equilibrada de proteínas [28, 29]. Además, se ha demostrado que el valor nutricional del pan podría mejorarse con la adición de granos enteros de amaranto expandidos (10-20%), aumentando el contenido en hierro, fósforo, calcio, magnesio y potasio [11, 30-32]. Sin embargo, es necesario estudiar la percepción de los consumidores sobre todos estos productos y desde una perspectiva sociológica [33, 34].

Se ha demostrado que el maíz con almidón de grano de amaranto podría usarse como espesante en salsas [24, 25] y además, se han propuesto varias tecnologías de procesamiento de alimentos (por ejemplo, germinación) como formas de mejorar la densidad de nutrientes y reducir los antinutrientes [35]. Se observó que el almidón presente en el amaranto es resistente a la congelación y descongelación, y por tanto, estable a algunos tipos de tratamiento

térmico, aunque las condiciones ácidas podrían limitar su estabilidad [36].

Hace unos años, se describieron los usos agroindustriales de la semilla de amaranto, así como el resultado de la primera aproximación sobre el procesamiento y la utilización de la semilla de amaranto y su conversión en alimento de alta calidad para lactantes [37-39]. Tanto el amaranto como la quinoa producen cantidades significativas de semillas comestibles [14], y son fuentes más ricas en minerales y vitaminas que la mayoría de los cereales, especialmente en el caso del amaranto, que se considera la semilla del siglo XXI [40].

Por otro lado, varios estudios han demostrado la aplicabilidad de la proteína de amaranto como material para la producción de películas comestibles [41, 42]. Estos estudios se han centrado en el desarrollo de películas y recubrimientos a partir de polímeros naturales como las proteínas y polisacáridos de amaranto, y también los lípidos. Se desarrollaron películas a partir de harina de *A. caudatus* y se llegó a la conclusión de que este material permitía formar películas con buenas propiedades como barrera a los gases en comparación con otras películas de base biológica. Aunque se demostró que las películas de harina de amaranto eran muy flexibles, mostraban una resistencia mecánica relativamente baja [43]. Según estos autores, las películas de amaranto tienen una estructura compleja, ya que no solo están formadas por almidón y plastificantes, sino que también poseen un importante contenido de proteínas y lípidos. En este caso, estos lípidos y el agua actúan como plastificantes, dando lugar a un

aumento en la elasticidad de las películas y una reducción de su rigidez [11]. Recientemente, se ha mostrado un interés considerable en la microencapsulación de nutraceuticos para la prevención de enfermedades. Diferentes estudios han demostrado que los biopolímeros extraídos del amaranto se pueden utilizar como material de microencapsulación de compuestos hidrofílicos y lipofílicos y como fuente de compuestos bioactivos para encapsular [11].

Además de su papel potencialmente importante en la dieta y nutrición, podría contribuir a mitigar o prevenir muchas enfermedades como el cáncer [44], la obesidad, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares [45] y los trastornos neurodegenerativos, que en conjunto se encuentran dentro de las principales causas de muerte mundial [46].

Los alimentos altamente procesados y el azúcar o las bebidas edulcoradas tienen efectos dañinos, mientras que los alimentos ricos en compuestos bioactivos como frutas, verduras, frutos secos, semillas y legumbres tienen efectos protectores [47]. Una dieta saludable que incluya la ingesta de alimentos funcionales podría contribuir a minimizar o prevenir estas enfermedades [48]. Así, en los últimos años se ha incrementado el interés de la investigación en compuestos bioactivos alimentarios como alternativa al tratamiento farmacológico y se ha asociado la introducción en la dieta de las semillas de amaranto con la promoción de la salud y la prevención de enfermedades [3].

De hecho, tanto las semillas como las hojas de amaranto se han utilizado tradicionalmente como remedios naturales. Por



ejemplo, *A. caudatus* se ha utilizado como antipirético, como agente astringente, diurético, antihemorrágico y hepatoprotector en la medicina tradicional india y nepalí [49]. *A. caudatus* también se ha utilizado para tratar molestias en la vejiga, hemorroides, dolor de muelas, trastornos sanguíneos e incluso disentería [50].

Los amarantos son una fuente rica en lisina,  $\beta$ -caroteno, vitaminas, minerales y fibra dietética [51, 52] y aunque también contienen nitratos y oxalatos, considerados antinutrientes, están presentes en pequeña cantidad, lo que no ocasiona ningún problema nutricional en condiciones normales de consumo [53].

Las principales actividades de investigación realizadas sobre el amaranto se han centrado en su excepcional valor nutritivo debido al contenido en proteína, grasa y otros principios activos con efectos antidiabéticos, antihiperlipidémicos [54], antihipercolesterolémicos [55, 56] y actividades antioxidantes [28, 57] y antimicrobianas [58].

Como ejemplo de su relevancia frente a la demanda nutricional y sus propiedades en la prevención de enfermedades, destaca el desarrollo de una formulación nutracéutica en forma de polvo para tratar la prevalencia de anemia en niños y adolescentes mexicanos, así como en adultos. La anemia por deficiencia de hierro es un importante problema de salud pública en niños pequeños de países en desarrollo y está asociada con un deterioro del desarrollo cognitivo y morbilidad. El nombre comercial de esta fórmula es “Naturalmente Alegría”, y fue aprobado por el Comité Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios en México (COFEPRIS). Hasta

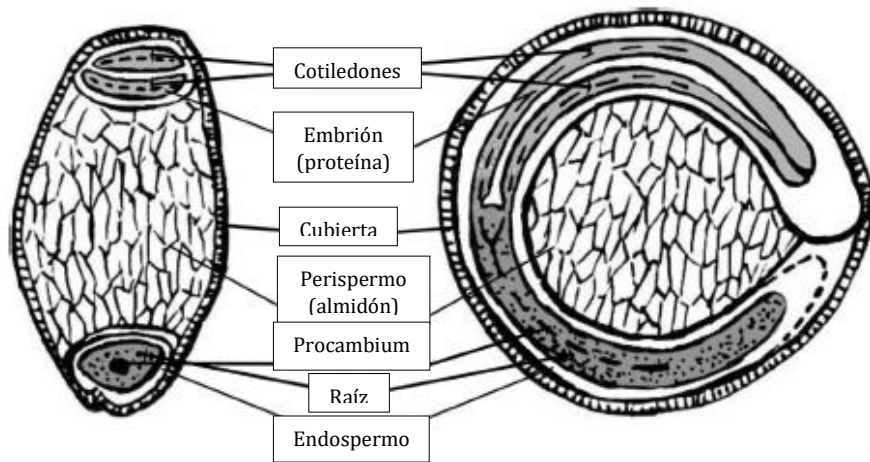
la fecha, el producto ha sido consumido por varios miles de mexicanos con anemia [59].

Por tanto, en la actualidad, el amaranto es un alimento tradicional que se vende mayoritariamente como un producto artesanal pero que además ha sido señalado como alimento funcional por sus propiedades beneficiosas que promueven la salud [33, 34, 60]. En el mercado se incorporan nuevos productos de amaranto con características de “superalimento” como granolas, galletas o yogures [33, 34]. Como se ha descrito, esta semilla se agrega a diferentes alimentos para mejorar su perfil nutricional y sus características. Por todo ello, el amaranto es un tipo de alimento con un amplio contenido nutricional y que va más allá de su función básica, lo que le aporta característica de alimento funcional [61]. La creciente conciencia sobre el valor nutricional, los beneficios para la salud y los usos médicos e industriales del amaranto ha dado como resultado la reactivación de su cultivo [13].

### **Composición nutricional de *Amaranthus caudatus***

El amaranto es un pseudocereal, del cual solo tres especies se utilizan para la producción de semillas comestibles: *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus* [1]. Para comprender la composición nutricional del amaranto y su valor proteico es importante conocer cómo está estructurada su semilla. Es muy pequeña (1–1,5 mm de diámetro) y está formada por diferentes capas como son: la cubierta de la semilla; el perispermo, rico en almidón; el endospermo; el embrión formado por los 2 cotiledones, con alto contenido de proteínas; el procámbium; la radícula; y la raíz. La distribución del

almacenamiento de las principales reservas es diferente en las distintas partes: el embrión y el endospermo almacenan proteínas, lípidos y minerales, mientras que el perispermo almacena almidón [46] (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de secciones transversales y longitudinales de una semilla de *Amaranthus*. Se pueden distinguir cuatro compartimentos dentro de la semilla madura: cubierta, endospermo, embrión y perispermo.

La semilla de amaranto está compuesta de 13-19% de proteína, 5-13% de lípidos, 62-74% de almidón [46, 62, 63], 6-9% de fibra dietética [62], y aproximadamente 2-3% de ceniza [62, 63]. La **Tabla 1** resume un estudio comparativo de la composición nutricional de *A. caudatus*.

Por otro lado, los principales minerales en la semilla de amaranto son Ca, Fe, Mg, Mn, K, P, S y Na. A su vez, posee un alto contenido en vitaminas del complejo B [14, 46, 64]. Además, el amaranto es una buena fuente de lisina y otros elementos bioactivos como compuestos fenólicos, escualeno, folato, fitatos y tocoferoles [65].

**Tabla 1.** Contenido nutricional de la semilla de amaranto.

Nutriente	Amaranto spp.[66]	Harina de amaranto [62]	Semilla de amaranto [46]	Harina de amaranto [63]
	(g/100 g)			
<b>Agua</b>	11,29	8,13±0,05	-	7,97±0,18
<b>Proteínas</b>	13,56	15,05±0,05	13-19	14,21±0,77
<b>Lípidos</b>	7	6,68±0,08	5-13	8,93±0,03
<b>Cenizas</b>	2,88	2,91±0,08	-	2,14±0,03
<b>Carbohidratos</b>	65,3	62,41±0,03	-	-
<b>De los cuales Azúcares</b>	1,6	-	-	-
<b>De los cuales Almidón</b>	57	-	62	74,72
<b>De los cuales Fibra dietética total</b>	6,7	9,52±0,02	-	-

Los datos que no aparecen en la tabla (-) no fueron determinados por los autores.

- **Proteínas**

La composición proteica de los pseudocereales es similar a la de leguminosas y crucíferas, sin embargo, cualitativa y cuantitativamente la proteína de semilla de amaranto es mejor que la de cereales y legumbres [24, 25, 67, 68]. En el amaranto el contenido en proteínas es comparable al del trigo (13,3%), y

significativamente mayor que en el maíz (10,2%) o el arroz (6,7%) [69]. Las proteínas predominantes en *Amaranthus* spp. son albúminas y globulinas con niveles bajos o no detectables de prolaminas [70]. Las distintas especies de amaranto presentan ligeras diferencias entre las proteínas que contienen, en promedio *A. caudatus* presenta 13,5g de proteínas por 100g de pseudocereal en comparación con *A. cruentus* (15,7g/100g), y *A. hypochondriacus* (15,5g/100g). En la **Tabla 2** se resume y compara la composición de aminoácidos de *A. caudatus*. Por lo general, la lisina aparece como aminoácido limitante en los cereales, sin embargo, en el amaranto es el doble que en el trigo y el triple que en el maíz [13]. Su contenido en lisina convierte al amaranto en una fuente de proteína de alta calidad [12, 14]. Esto se debe a la disponibilidad del 65% del total de proteínas en el embrión (rico en lisina) de la semilla y solo del 35% en el perispermo (pobre en lisina), al contrario de lo que ocurre en las semillas de otros cereales, que concentran sus proteínas en el perispermo (85%) [9, 71-73].

**Tabla 2.** Composición de aminoácidos esenciales de *A. caudatus*.

Aminoácido	<i>A. Caudatus</i>	<i>A. Caudatus</i>	Harina desengrasada de <i>A. Caudatus</i> [74]	FAO/OMS/UNU IDR [75]
	[22]	[46]		
(g/100g proteína)				
Isoleucina (Ile)	3,6-4,2	4,1	3,08±0,31	3
Leucina (Leu)	5,7-6,4	6,3	6,12±0,02	5,9
Lisina (Lys)	4,8-5,2	5,9	6,23±0,08	4,5
Histidina (His)	-	-	2,43±0,03	1,5
Metionina (Met)	-	-	1,31±0,14	-
Cisteína (Cys)	-	-	1,94±0,13	-
Met+ Cys	4,5-4,7	4,9	-	2,2
Fenilalanina (Phe)	-	-	4,30±0,03	-
Triptófano (Trp)	1,1-1,8	1,1	0,92±0,04	6
Tirosina (Tyr)	-	-	3,49±0,14	-
(Phe+Trp+ Tyr)	7,2-7,0	8,1	-	3,8
Treonina (Thr)	3,3-3,4	4,0	3,98±0,05	2,3
Valina (Val)	4,5-4,6	4,7	3,53±0,29	3,9
Aspartato (Asp) + Asparragina (Asn)	-	-	9,43±0,35	-
Glutamina (Gln) + Glutamato (Glu)	-	-	18,30±0,61	-
Serina (Ser)	-	-	7,91±0,36	-
Glicina (Gly)	-	-	8,31±0,36	-
Arginina (Arg)	-	-	8,73±0,15	-
Alanina (Ala)	-	-	4,14±0,17	-
Prolina (Pro)	-	-	5,85±0,72	-

OMS: Organización Mundial de la Salud; UNU: Universidad de Naciones Unidas; AA: aminoácido. Los datos que no aparecen en la tabla (-) no fueron determinados por los autores. <sup>1</sup>FAO/OMS/UNU. Patrón de puntuación mg/g de las necesidades de proteínas en adultos convertido a g/100g proteína.

La evaluación de la calidad de las proteínas tiene como objetivo determinar la capacidad de las fuentes alimentarias de proteínas para satisfacer los requerimientos de proteína y nitrógeno amínico de los aminoácidos esenciales, es decir, para satisfacer las necesidades metabólicas de aminoácidos y nitrógeno. En el estudio de la eficacia global de una proteína deben considerarse dos componentes, la digestibilidad y valor biológico.

A pesar de que la digestibilidad o biodisponibilidad ileal (determinada en el íleon terminal, al final del intestino delgado) medida directamente en humanos, aplicable en todas las etapas de la vida humana, a una amplia gama de alimentos, a todos los aminoácidos individuales, en dietas humanas mixtas y de suplementación, y potencialmente reconocido por la Comisión del Codex Alimentarius (CODEX) es el método recomendado, es difícil y costoso, permitiendo el uso de modelos animales para la determinación rutinaria de la digestibilidad de aminoácidos, como el cerdo o la rata. En este sentido el Índice de Eficiencia Proteica (PER, por sus siglas en inglés) nos muestra que las semillas amaranto muestran un PER de 2,59 [76], siendo este índice ampliamente utilizado para evaluar la calidad de las proteínas en los alimentos. Además, la puntuación de aminoácidos corregida por la digestibilidad de las proteínas o PDCAAS (del inglés Protein digestibility-corrected amino acid score) es un método para evaluar la calidad de una proteína en función de los requerimientos de aminoácidos de los humanos y su capacidad para digerirla. Este parámetro es calculado teniendo en cuenta la proporción del aminoácido limitante por gramo de proteína en el alimento de

interés, un patrón de proteínas de referencia y los valores de digestibilidad publicados por la FAO [75].

La clasificación de PDCAAS fue adoptada por la FDA y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) en 1993 como el mejor método para determinar la calidad de la proteína. El valor del PDCAAS calculado para el amaranto es de 6,17, mientras que para el trigo y quinoa es 2,75 y 2,90 respectivamente [77]. Estudios recientes de cultivos emergentes muestran que la proteína de las semillas cocidas de amaranto tiene una alta digestibilidad, de aproximadamente el 90% [9, 64].

Por todas estas razones, el componente proteico del amaranto es cualitativa y cuantitativamente muy similar a los niveles recomendados por la FAO según se establece en su Informe FAO 92 de 2017 “Evaluación de la calidad de la proteína de la dieta en nutrición humana” y lo convierten en una fuente de proteína ideal para satisfacer las necesidades dietéticas humanas [75].

- **Hidratos de carbono**

Los gránulos de almidón contenidos en el amaranto se componen principalmente de amilopectina (93,6–95,2%) dando lugar a gránulos pequeños en comparación con otras semillas de cereales [22]. Esta estructura le confiere mejores propiedades para su utilización en la industria alimentaria, además muestra una mayor resistencia a la acción de las amilasas. El almidón de amaranto muestra propiedades únicas de gelatinización y congelación/descongelación que podrían ser beneficiosas para la



industria alimentaria [21]. Las características del almidón, como su alta solubilidad y digestibilidad, se deben a su tamaño excepcionalmente pequeño, que es aproximadamente una décima parte del tamaño del almidón presente en la maicena y, por lo tanto, ofrece nuevas posibilidades para la industria alimentaria, farmacológica y cosmética. El almidón del amaranto también tiene una carga glucémica más alta y su consumo está relacionado con un mejor rendimiento físico y una recuperación más rápida asociada a la actividad física intensa y a la recarga de los depósitos de glucógeno después del ejercicio [78].

- **Lípidos**

El contenido de lípidos del amaranto también es más alto en comparación con la mayoría de las especies de cereales, alrededor del 5–13% [46, 62, 63]. Las fracciones lipídicas de *A. caudatus* están compuestas por triacilgliceroles (80,3%) [22], fosfolípidos (10,2%) [22], escualeno (2,4-8,0%) [1] y vitaminas liposolubles como tocoferoles y tocotrienoles (0,006-0,013%) [79]. Entre los fitoesteroles detectados en las fracciones de lípidos insaponificables, el condilasterol se ha descrito como el más abundante en *A. caudatus* [80].

En cuanto al perfil de ácidos grasos, es rico en ácidos grasos insaturados, alrededor de un 73% del total de ácidos grasos [81], siendo mayoritariamente linoleico (C18:2 $\Delta^{9,12}$ ) (44,5-47,8%) y oleico (C18:1 $\Delta^9$ ) (23,7-28,8%) [27, 63]. En el amaranto, la relación ácidos grasos insaturados/saturados es 2,7 y la relación linoleico/ $\alpha$ -

linolénico es 52,4 [27]. Estos hechos hacen que el amaranto sea una atractiva fuente de ácidos grasos insaturados. La **Tabla 3** muestra el perfil de lípidos y ácidos grasos del Amaranto.

**Tabla 3.** Perfil lipídico y de ácidos grasos de semilla de *A. caudatus*.

Ácidos grasos	Semilla de amaranto [63]	Semilla de amaranto [27]
	g/100 g	
<b>Saturados</b>	-	26,9±0,2
<b>Monoinsaturados</b>	-	23,9±0,1
<b>Poliinsaturados</b>	-	49,1±0,2
<b>Insat. / saturados</b>	-	2,7±0,0
<b>Ác. Mirístico</b> C14:0	0,22±0,004	-
<b>Ác. Palmítico</b> C16:0	19,08±0,012	20,9±0,3
<b>Ác. Esteárico</b> C18:0	4,10±0,01	4,1±0,1
<b>Ác. Oleico</b> C18:1 $\Delta^9$	28,82±0,02	23,7±0,1
<b>Ác. Linoleico</b> C18:2 $\Delta^{9,12}$	44,48±0,004	47,8±0,2
<b>Ác. A-linolénico</b> C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0,89±0,005	0,9±0,0
<b>Ác. Araquídico</b> C20:0	0,97±0,005	0,8±0,0
<b>Ác. Eicosenoico</b> C20:1 $\Delta^{11}$	0,22±0,001	-
<b>Ác. Behénico</b> C22:0	0,35±0,006	0,4±0,0
<b>Ác. Lignocérico</b> C24:0	0,22±0,004	0,4±0,0

Los datos que no aparecen en la tabla (-) no fueron determinados por los autores.

- **Vitaminas y Minerales**

Respecto a las vitaminas, las semillas de *A. caudatus* contienen ácido ascórbico (29,8-70,5mg/kg) y vitaminas del complejo B como niacina o B3 (8,9-66,5mg/kg), piridoxina o B6 (4,5-7,6mg/kg) y riboflavina o B2 (2,4-4,9mg/kg). Estos valores pueden verse alterados cuando el grano se cocina, se germina o se seca, debido a cambios químicos, exposición a cambios térmicos, etc., habiéndose observado por ejemplo, que si se elabora una harina rica en proteínas, aumenta la cantidad de dichas vitaminas: B3 (66,5mg/kg), B6 (7,6mg/kg) y B2 (4,9mg/kg) debido a la concentración de estas en la harina resultante [82]. En la **Tabla 4** se resume la composición de vitaminas del Amaranto.

Sin embargo, las vitaminas más importantes identificadas en *A. caudatus* son las diferentes isoformas de la vitamina E, como tocoferoles y tocotrienoles con un rango total de concentración de 63,7-129,3mg/kg [79], con  $\delta$ -tocoferol (21,7-48,8mg/kg),  $\beta$ -tocoferol (19,5-43,9mg/kg) y  $\alpha$ -tocoferol (12,5-34,8mg/kg) en concentraciones mayores y  $\gamma$ -tocoferol (0,6-2,2mg/kg) en concentraciones menores [79, 80]. El interés de los tocoferoles y tocotrienoles radica en que actúan como antioxidantes naturales y su presencia en semillas oleaginosas a menudo se correlaciona con la abundancia relativa de ácidos grasos insaturados. Además de su conocida acción como antioxidantes y captadores de radicales libres, también son activos contra la aterosclerosis hipercolesterolémica [83]. Además, *A. caudatus* es una fuente rica en hierro (72-174ppm), calcio (1300-2850ppm), magnesio (2300-3360ppm) y zinc (36,2-40ppm) [82], de esta forma, presenta una mayor cantidad de calcio,

hierro y fósforo que el arroz y el maíz, y una cantidad de hierro comparable a la del trigo [84]. La **Tabla 5** resume la composición mineral de *A. caudatus*.

**Tabla 4.** Composición vitamínica de la semilla de *A. caudatus*.

Vitamina	Amaranto [66]	Semilla de amaranto [82]	Semilla de amaranto [79]	Semilla de amaranto [85]	AESAN IDR Hombre/Mujer (mg) [86]
	(mg/kg)				
<b>C</b>	42	29,8	-	41,3-70,5	75/75
<b>B1</b>	1,16	-	-	0,72-2,4	1,2/1,1
<b>B2</b>	2,0	2,4-4,9	-	1,8-2,7	1,5/1,2
<b>B3</b>	9,2	28,0-66,5	-	8,9-10	17/14
<b>B6</b>	5,9	4,5-7,6	-	-	1,7/1,3
<b>B9</b>	0,82	-	-	-	0,33/0,33
<b>E total</b>	-	-	63,7-129,3	-	
<b>α-tocoferol</b>	11,9	-	12,5-34,8	2,97-34,81	13/11
<b>β- tocoferol</b>	-	-	19,5-43,9	5,92-211,8	-
<b>δ- tocoferol</b>	-	-	21,7-48,8	0,01-48,79	
<b>γ-tocoferol</b>	-	-	0,6-2,2	0,95-57,07	-
<b>α-tocotrienol</b>	-	-	-	10,2-20,6	-
<b>β- tocotrienol</b>	-	-	-	35,4-48,5	-
<b>δ- tocotrienol</b>	-	-	-	15,5-18,4	-
<b>γ- tocotrienol</b>	-	-	-	2,0-4,0	-

IDR (Ingesta Diaria Recomendada): dosis mínima que se debe consumir de un nutriente para mantenerse sano. Los datos que no aparecen en la tabla (-) no fueron determinados por los autores.

**Tabla 5.** Composición mineral de la semilla de *A. caudatus*.

Mineral	Amaranto [66]	Semilla de amaranto [82]	Semilla de amaranto [27]	AESAN IDR Hombre/Mujer (mg) [86]
	(mg/100g)			
<b>Ca</b>	159	176-308	180,1±6,1	950/650
<b>Fe</b>	7,61	14-27	9,2±0,2	9,1/18
<b>Mg</b>	248	288-497	279,2±1,1	350/300
<b>P</b>	557	582-1014	-	700/700
<b>Zn</b>	2,87	3,9-5,3	1,6±0,0	11/8
<b>Mn</b>	3,33	1,3-2,2	-	3/3

IDR (Ingesta Diaria Recomendada): dosis mínima que se debe consumir de un nutriente para mantenerse sano. Los datos que no aparecen en la tabla (-) no fueron determinados por los autores

- **Fracción fenólica y otros fitoquímicos**

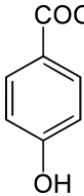
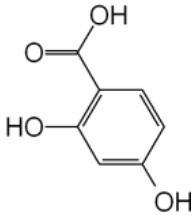
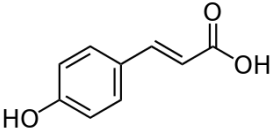
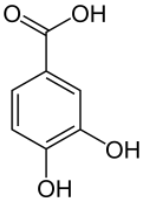
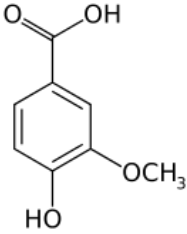
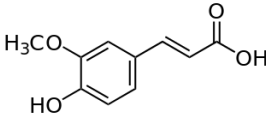
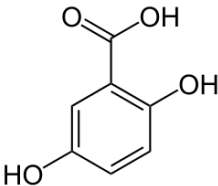
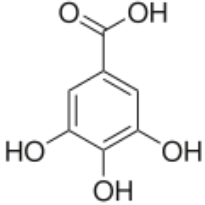
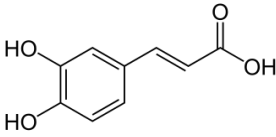
Se ha descrito que los ácidos fenólicos totales en distintos tipos de amaranto de Perú pueden variar entre 18,3 y 40,1 mg/100g y entre 16,8 y 32,9 mg/100g (peso seco) [87]. Además, se ha identificado una fracción fenólica de *A. caudatus* de 5,24g TAE/kg en una harina de semilla (peso seco) y de 6,86g TAE/kg en una harina de alto contenido proteico (peso seco), definiéndose TAE como equivalentes de ácido tánico (por sus siglas en inglés) o mg ácido tánico/g material seco [22]. Sin embargo, la composición fitoquímica depende de las múltiples variables que condicionen el crecimiento de esta planta.

Basándonos en la composición química de la fracción fitoquímica total, los principales compuestos polifenólicos identificados en *A. caudatus* son: ácido ferúlico (120-620mg/kg), ácido vanílico (15,5-69,5mg/kg), ácidos benzoicos (4,7-136mg/kg), ácido cafeico (6,41-6,61mg/kg) y ácido cumárico (1,2 -17,4mg/kg) [85, 87]. En el caso del ácido gálico encontramos valores muy variables en la semilla (11,0-440mg/kg) [85]. Por otro lado, puede detectarse un derivado del ácido cafeico en hojas de amaranto [88]. La **Tabla 6** resume la fracción polifenólica en la semilla de *A. caudatus*.

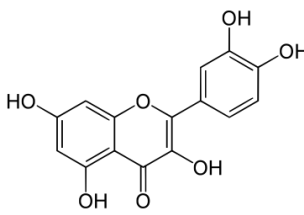
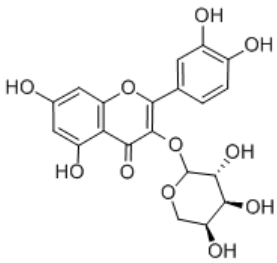
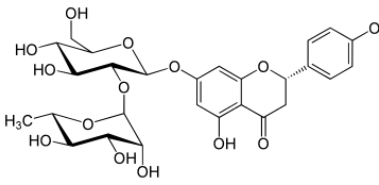
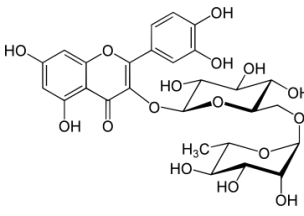
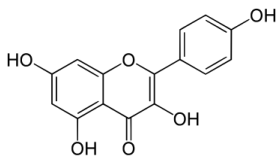
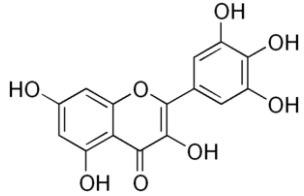
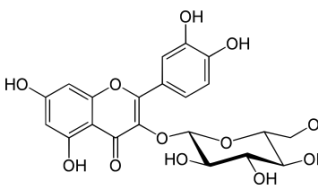
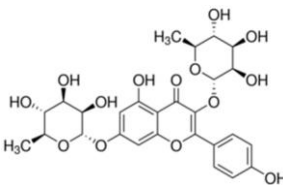
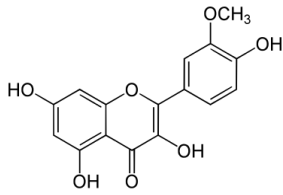
Además de estos ácidos fenólicos, se han detectado algunos flavonoides monoméricos y diméricos en muestras de semillas de *A. caudatus* como quercetina (214-843mg/kg), kaempferol (22,4-59,7mg/kg), isorhamnetina (42-600mg/kg), rutina (7-592mg/kg) y otros flavonoides minoritarios [22, 85]. La **Tabla 7** muestra algunos flavonoides identificados en *A. caudatus*.

Se han identificado otros fitoquímicos importantes en *A. caudatus*, como betalaínas (betacianinas y betaxantinas). Las principales betalaínas de *A. caudatus* son la amarantina (151,3mg/kg) y la isoamarantina (58,7mg/kg) [85]. Por otro lado, se ha observado que el extracto de *A. caudatus* contiene  $24,1 \pm 1,29$ mg/100g de antocianinas [89], 17,7mg/kg de betaína, 5mg/kg de isobetaína, 3,55-4,29mg/kg de luteína y 0,14-0,32mg/kg de zeaxantina [85]. Las betalaínas se utilizan comúnmente como colorante alimentario natural, sin embargo, recientemente el interés por estos compuestos ha aumentado debido a sus propiedades antioxidantes.

**Tabla 6.** Principales polifenoles (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos) de la semilla de *A. caudatus* [22, 85].

<p><b>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico</b> (8,5–20,9 mg/kg)</p>	<p><b>Ácido 2,4-dihidroxibenzoico</b> (4,7–5,1 mg/kg)</p>	<p><b>Ácido <i>p</i>-cumárico</b> (1,2–17,4 mg/kg)</p>
		
<p><b>Ácido 3,4-dihidroxibenzoico</b> (4,7–136 mg/kg; 13,6±9,4 µg/g)</p>	<p><b>Ácido vanílico</b> (15,5–69,5 mg/kg)</p>	<p><b>Ácido ferúlico</b> (120–620 mg/kg; 203 cis/620 trans µg/g)</p>
		
<p><b>Ácido 2,5-dihidroxibenzoico</b> (trazas)</p>	<p><b>Ácido gálico</b> (11,0–440 mg/kg)</p>	<p><b>Ácido cafeico</b> (6,41–6,61 mg/kg)</p>
		

**Tabla 7.** Flavonoides principales (flavonoides monoméricos y diméricos) de la semilla de *A. caudatus* [22, 85].

<p><b>Quercetina</b> (214–843 mg/kg; 6695±219/7755±85 mg/kg)</p> 	<p><b>Quercetina 3- arabinósido</b> (trazas)</p> 	<p><b>Naringina</b> (trazas)</p> 
<p><b>Rutina</b> (7–592 mg/kg)</p> 	<p><b>Kaempferol</b> (22,4–59,7 mg/kg)</p> 	<p><b>Miricetina</b> (1,8 mg/kg)</p> 
<p><b>Isoquercetina</b> (trazas)</p> 	<p><b>Kaempferol di- ramnosa</b> (70 mg/kg)</p> 	<p><b>Isorhamnetina</b> (42–600 mg/kg)</p> 



## **Compuestos bioactivos de *Amaranthus caudatus***

Actualmente, la mayoría de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares o inflamatorias son motivo de gran preocupación en todo el mundo, ya que, además de las implicaciones en salud, pueden provocar pérdidas económicas en materia de salud pública.

El descubrimiento de diferentes compuestos bioactivos, extraídos de fuentes alimentarias, puede explorarse como nuevo fármaco natural y alimento funcional. *A. caudatus* ha sido clasificado como uno de los cinco vegetales principales en propiedades antioxidantes. Estas propiedades se pueden explicar por la presencia de compuestos como fitoesteroles, polifenoles, vitaminas, escualeno y péptidos bioactivos [16, 51, 90-93]; que proporcionan nutrientes y pueden mejorar la salud o el bienestar de los consumidores.

Además, en los últimos años, los metabolitos secundarios de plantas como los flavonoides, terpenos y alcaloides han llamado la atención por sus diversas propiedades farmacológicas como son sus efectos citotóxicos y anticancerígenos. La tendencia a cambiar los compuestos sintéticos por naturales ha acelerado la investigación de fuentes vegetales como *A. caudatus* para identificar este tipo de componentes antioxidantes [94, 95], así como antiinflamatorios, antihipertensivos, antihipercolesterolémicos, etc.

- **Péptidos bioactivos**

El papel de los péptidos bioactivos presentes en *A. caudatus* se desarrolla en la segunda sección de la presente Introducción, dedicada específicamente a hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos (página 38).

- **Compuestos polifenólicos**

Los polifenoles son metabolitos vegetales secundarios que juegan un papel en la protección de las plantas contra la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros [96]. Se han identificado varios cientos de moléculas con estructura polifenólica en plantas comestibles [97]. Las frutas, las bebidas como el té y el café, así como las verduras, los cereales y las leguminosas también son fuentes potenciales de polifenoles [28, 97].

Los compuestos polifenólicos tienen función antioxidante actuando como donantes de electrones, aceptores de electrones, descomponedores de peróxidos e hidroperóxidos, activadores y desactivadores de metales y absorbentes de UV [98]. Los estudios han demostrado que la semilla de amaranto tiene potencial antioxidante [28].

La rutina (quercetina-3-O-rutinósido) y la quercetina (precursor de la rutina) son flavonoides que se encuentran en *A. caudatus*. Pueden ser útiles para la prevención y el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Tanto la rutina como la quercetina poseen también importantes propiedades antioxidantes y producen una inhibición significativa de la oxidación del colesterol contenido

en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [99]. Sin embargo, los principales compuestos antioxidantes detectados por HPLC en extractos de semilla de *A. caudatus* fueron el ácido cafeico y el ácido vanílico [100].

- **Fitoesteroles**

Los fitoesteroles son compuestos bioactivos que se encuentran en alimentos de origen vegetal. Están presentes en la fracción insaponificable de las matrices lipídicas vegetales y pueden actuar como inhibidores de la absorción de colesterol ya que compiten con esta sustancia a nivel intestinal [101].

Los estudios clínicos indican consistentemente que la ingesta de fitoesteroles (2g/día) se asocia con una reducción significativa (8-10%) de los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL). Es común el uso de alimentos enriquecidos en fitoesteroles para lograr alcanzar su ingesta recomendada [102].

- **Pigmentos bioactivos**

Los carotenoides son eficaces para eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en procesos fisiológicos. Moléculas como el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos pueden resultar dañadas por ROS [103]. Los amarantos contienen altas concentraciones de  $\beta$ -caroteno que podrían proporcionar la mayor parte de la ingesta recomendada de vitamina A [51, 104].

Se ha demostrado que las antocianinas tienen poderosas propiedades antioxidantes contra la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, reduciendo el riesgo de enfermedad coronaria. Las antocianinas parecen tener un efecto claro sobre la función endotelial y la protección del miocardio por su efecto sobre la distribución del colesterol y su protección frente a la señalización proinflamatoria en células endoteliales y macrófagos. Además, inhiben la biosíntesis de óxido nítrico inducida por LPS (lipopolisacárido bacteriano) [105].

- **Terpenos**

El escualeno es un compuesto terpenoide que se encuentra en la fracción insaponificable de los aceites vegetales. Su importancia como suplemento dietético está relacionada con su capacidad para reducir los niveles de colesterol y triglicéridos, así como para potenciar los efectos de algunos fármacos reductores del colesterol [106, 107]. Las semillas de amaranto son ricas en escualeno y se han considerado como una fuente alternativa de este en la dieta [37, 108]. El escualeno contenido en *A. caudatus* supone alrededor del 80% de la fracción insaponificable total [80] y se han reportado valores de 1 a 11,19% de escualeno/aceite, dependiendo de la especie de amaranto analizado [109, 110].

Además, se ha propuesto que el escualeno también desempeña un papel en la prevención de tumores [111]. Se ha planteado la hipótesis de que el efecto quimiopreventivo del aceite

de oliva virgen extra sobre el cáncer de mama puede deberse, al menos en parte, al escualeno y a los antioxidantes fenólicos [112].

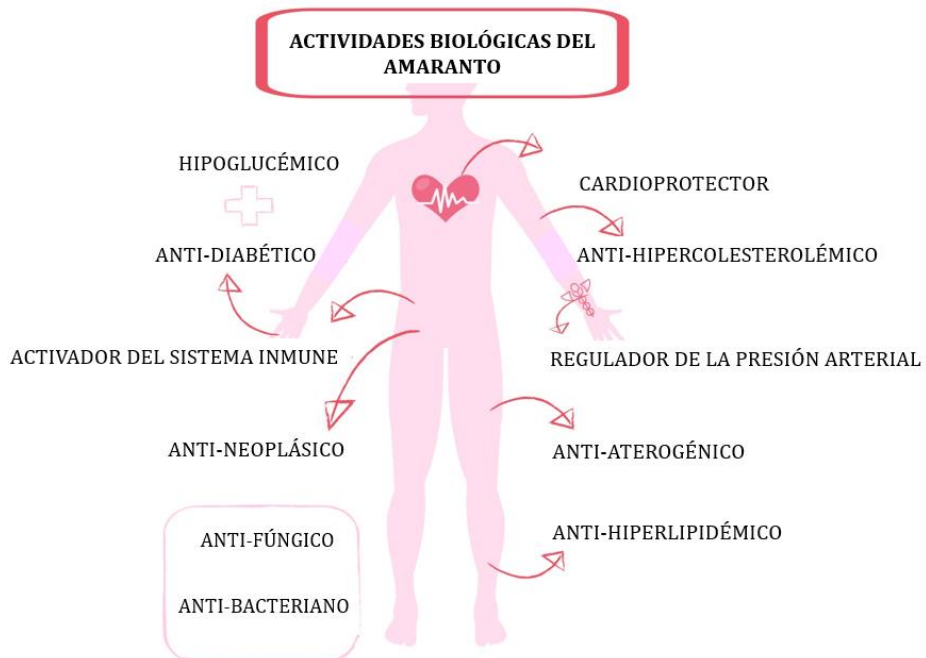
### **Actividad biológica de *Amaranthus caudatus***

El amaranto, como se indicó con anterioridad, se ha utilizado para múltiples propósitos como parte de las prácticas medicinales indígenas en todo el mundo y actualmente se sigue utilizando de esta forma. Las distintas partes de la planta de amaranto se usan como diurético, remedio para la tos y el resfriado, tratamiento de infecciones urinarias y de garganta, alivio de problemas gástricos, de problemas dermatológicos, contra la hipertensión arterial e incluso para eliminar tenias [16, 113].

Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* muestran que una suplementación de diferentes compuestos de amaranto utilizados como ingrediente de alimentos funcionales puede mejorar algunos procesos implicados en enfermedades cardiovasculares, promoviendo la reducción de la presión arterial sistólica, la reducción de los niveles de colesterol [114] y mediante un efecto antiaterosclerótico [115]. Además, *A. caudatus* ha sido utilizado por su capacidad como antihelmíntico [116], antinociceptivo [117], antipirético, anticanceroso, antialérgico, inhibidor de la  $\alpha$ -amilasa [100, 118], estimulador del sistema inmunológico y actividad hepatoprotectora en relación con su poder antioxidante [119].

Además, los estudios clínicos han demostrado que la semilla de *A. caudatus* proporciona actividad antineoplásica, hipoglucémica y reductora del colesterol, y estimula el sistema inmunológico [113].

Las principales actividades biológicas de *Amaranthus caudatus* se resumen y esquematizan en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Representación esquemática de las principales actividades biológicas de *A. caudatus*. Figura creada con BioRender.com.

- **Actividad antioxidante**

Está ampliamente aceptado que los alimentos de origen vegetal juegan un papel importante en la prevención del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades relacionadas con el envejecimiento, obesidad y cánceres e incluso en la mejora de la memoria humana [120]. Estos efectos se atribuyen a sus antioxidantes naturales que previenen los radicales libres relacionados con el envejecimiento, como las especies reactivas de oxígeno [121]. La teoría del envejecimiento por radicales libres implica un daño acumulativo a través de cambios oxidativos

naturales de los radicales libres, lo que resulta en un aumento de la antigenicidad, cambios en las proteínas y daños oxidativos del ADN [122].

Por ello, la identificación de nuevos antioxidantes representa actualmente un área de investigación muy interesante. Las plantas son algunas de las fuentes más atractivas en la búsqueda de nuevos compuestos farmacológicos y se han probado con éxito en el tratamiento de una serie de trastornos; de hecho, varios estudios han demostrado que los beneficios de los antioxidantes de origen vegetal radican en cambiar o revertir los efectos negativos del estrés oxidativo, por tanto, los alimentos ricos en antioxidantes podrían usarse para prevenir enfermedades [123].

Las semillas de *A. caudatus* contienen una cantidad significativa de ácidos fenólicos y flavonoides con actividad antioxidante [99, 124]. Varios estudios se han centrado en la actividad biológica de los compuestos fenólicos, potenciales antioxidantes y captadores de radicales libres. Se ha observado que un extracto metanólico de *A. caudatus* contiene un 48% de la fracción fenólica total, con una fuerte actividad antioxidante [118, 125]. Algunos resultados sugieren que el tanino de las hojas de *A. caudatus* es una fuente antioxidante prometedora que puede usarse como conservante de alimentos o nutracéutico [126].

Por otro lado, se ha detectado escualeno en dos variedades de *A. caudatus* (Oscar blanco y Victor red) cultivadas en Bolivia y contribuyó en gran medida a la actividad inhibidora de la peroxidación lipídica en ensayos *in vitro* [91, 100]. Un estudio reciente muestra la capacidad de los péptidos bioactivos de *A.*

*caudatus* para inhibir la peroxidación lipídica y la producción de ROS en un modelo de embrión de pez cebra [127].

- **Propiedades cardioprotectoras**

El sector de la investigación nutracéutica que presenta mayor desarrollo está vinculado a la identificación de especies vegetales que pueden ser utilizadas para producir suplementos alimenticios para contrarrestar la aparición de patologías relacionadas con el consumo de grasas y colesterol en la dieta [128]. Se considera que varios tipos de compuestos químicos presentes en la fracción lipídica de las semillas oleaginosas son corresponsables de la actividad hipocolesterolemiantes.

Se ha demostrado que el aceite de semilla de *A. caudatus* previene la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. El consumo regular de amaranto podría reducir los niveles de colesterol y la presión arterial [80, 102, 107]. Algunos estudios han revelado los efectos antihipercolesterolémicos con potencial para la prevención de enfermedades coronarias de las semillas de *A. caudatus*. La ingesta de una dieta que incluía harina de *A. caudatus* durante 21 días disminuyó significativamente las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL, y el contenido de triglicéridos fue 50% menor en animales hipercolesterolémicos en comparación con el tratamiento de control [114]. Estos efectos probablemente se debieron a la fibra dietética, el escualeno y la proteína en *A. caudatus*. En otro estudio, los extractos hidroalcohólicos de *A. caudatus* mostraron efectos antihipercolesterolémicos y antiaterogénicos



asociados con la reducción de los lípidos séricos y los marcadores de estrés oxidativo en animales alimentados con dietas con alto contenido en colesterol [89].

Otros estudios han demostrado que la semilla o el aceite de amaranto pueden ser beneficiosos para mejorar la hipertensión y las enfermedades cardiovasculares. El consumo regular de estos productos reduce la presión arterial y los niveles de colesterol, al tiempo que mejora el estado antioxidante y algunos parámetros inmunes [16, 37].

La dislipidemia se caracteriza por un aumento del colesterol total, LDL, VLDL y triglicéridos y una disminución de HDL. Un estudio mostró que este perfil lipídico sérico alterado se invirtió hacia un perfil sano después del tratamiento con extractos metanólicos de *A. caudatus*, mostrando un efecto antihiperlipidémico significativo [55, 56]. Se han llevado a cabo distintos estudios sobre el efecto hipocolesterolemante de diferentes productos de amaranto [129], mostrando por ejemplo, como el extracto de *A. caudatus*, en comparación con lovastatina, disminuyó significativamente los niveles de colesterol, LDL, triglicéridos, LDL oxidado (Ox-LDL), apo-lipoproteína B (apoB) y el índice aterogénico (IA) mientras que aumentaban los de HDL y apo-lipoproteína A (apoA) [115].

- **Actividad antidiabética**

Algunos flavonoides, debido a su estructura fenólica, están involucrados en el proceso de prevención de enfermedades, incluida la diabetes [130]. Los extractos de metanol del amaranto poseen flavonoides como principios antidiabéticos [55].

Los extractos de metanol de dos variedades de amaranto mostraron actividad antidiabética *in vitro* a través de la inhibición de la enzima  $\alpha$ -amilasa (28-50,5% a 25 $\mu$ g/mL). El modelo de rata con diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) se caracteriza por una pérdida severa del peso corporal. El tratamiento con extractos metanólicos de *A. caudatus* mostró una caída significativa en los niveles de glucosa en sangre y se observó una ganancia significativa en el peso corporal en los grupos tratados [100]. Esto puede deberse a la presencia de 20% de proteína, los 9 aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales contenidos en los extractos [131]. También se ha demostrado que *A. caudatus* estimula la secreción de insulina en ratas Goto-Kakizaki, un modelo de diabetes mellitus tipo 2 [132], a su vez, tras una dosis diaria durante cuatro semanas, diferentes hidrolizados de amaranto inhibieron la actividad dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV) en ratones diabéticos inducidos por STZ [133].

En pacientes con diabetes, tras el consumo de amaranto durante tres meses, se observaron algunas mejoras en su salud y sobre distintos marcadores de obesidad [134]. La  $\alpha$ -amilasa es una enzima que se encuentra en las secreciones salivales, mucosas intestinales y pancreáticas. Esta enzima aumenta la biodisponibilidad de la glucosa en sangre y se ha descrito que la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa reduce la biodisponibilidad de la glucosa.

Los estudios *in vitro* demuestran una apreciable actividad inhibidora de la  $\alpha$ -amilasa con el extracto metanólico de *A. caudatus* [118]. La proteína de amaranto induce una disminución de la insulina plasmática en ratones alimentados con una dieta regular, mientras que por otro lado, se observó una disminución de los triglicéridos en ratones alimentados con una dieta alta en grasas [135].

- **Propiedades antibacterianas y antifúngicas**

En las plantas, los metabolitos secundarios funcionan para atraer organismos beneficiosos y repeler organismos nocivos, sirven como fitoprotectores y responden a los cambios ambientales. En los seres humanos, sin embargo, estos compuestos tienen efectos beneficiosos que incluyen efectos antioxidantes, antiinflamatorios, modulación de las enzimas de desintoxicación, estimulación del sistema inmunológico, modulación del metabolismo de los esteroides y efectos antibacterianos y antivirales [136]. Algunos resultados indican que el extracto de hojas de *A. caudatus* contiene diversos tipos de compuestos farmacológicamente activos con actividad antimicrobiana [58].

Los péptidos antibacterianos llamados Ac-AMP1 y Ac-AMP2 fueron aislados de semillas de *A. caudatus*, demostrando actividad contra diferentes cepas bacterianas, así como actividad antifúngica [137]. Además, el extracto de *A. caudatus* inhibe la invasión de *E. coli* en las células uroepiteliales [138].

## **HIDROLIZADOS PROTEICOS Y PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Las funciones de las proteínas en los alimentos, más allá de servir como nutrientes en la dieta, son cada vez más reconocidas. Muchas de estas funciones se llevan a cabo por secuencias concretas de péptidos encriptadas dentro de la proteína original [139].

Los hidrolizados de proteínas se definen como una mezcla compleja de oligopéptidos, péptidos y aminoácidos libres que se producen por hidrólisis parcial o total de proteínas, mientras que los péptidos bioactivos se definen como péptidos que poseen propiedades biológicas beneficiosas [140].

### **Hidrolizados proteicos vegetales**

Actualmente, en el mundo se generan gran cantidad de residuos agroindustriales, ricos en proteínas, como por ejemplo la harina resultante de la extracción de aceites de semillas, utilizada normalmente para alimentación de ganado. Sin embargo, estos residuos suponen una de las mayores reservas de proteínas con potencial para la industria alimentaria humana, lo que ha llevado a despertar interés por la generación de aislados proteicos a partir de ellos. No obstante, estos procesos presentan dos grandes limitaciones, como son la baja solubilidad y su potencial alergenicidad, debido a la presencia de regiones conocidas como epítopos antigénicos. Estas razones, sumadas a la creciente demanda de nuevos alimentos, han llevado al desarrollo y optimización de procesos de hidrólisis enzimáticas de estos aislados proteicos vegetales [141].

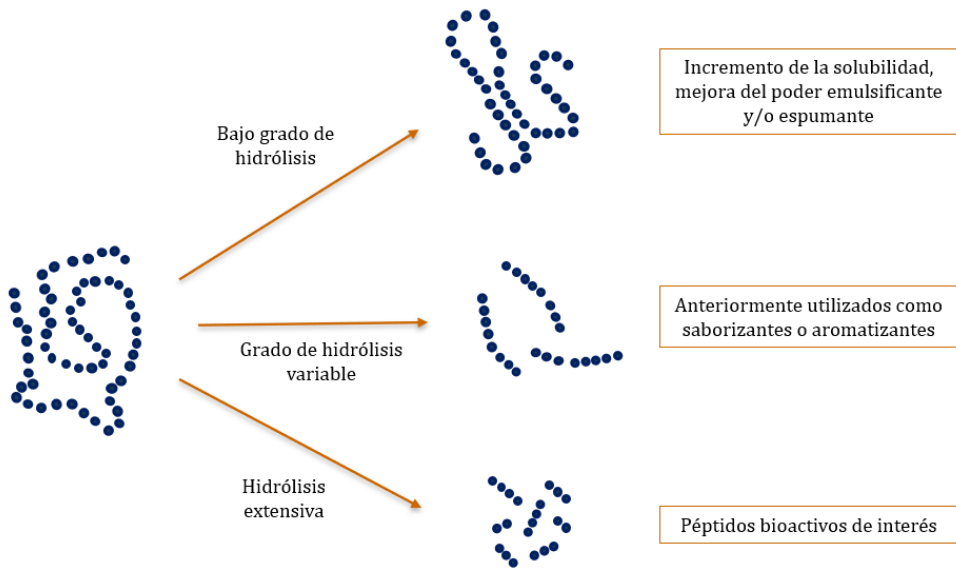
El parámetro fundamental y que va a determinar en gran medida las características de un hidrolizado proteico es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original.

Atendiendo a este parámetro, los hidrolizados proteicos de origen vegetal destinados a alimentación pueden clasificarse, en tres grandes grupos [141] (**Figura 4**):

- Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis o hidrolizados limitados (entre 1 y 10% de hidrólisis), dando lugar a un incremento de la solubilidad, que a su vez es necesaria para la mejora de otras propiedades funcionales como el poder emulsificante o espumante y la absorción de agua o aceite. Además, permite la exposición de residuos hidrófobos de la proteína que estaban en el interior de la estructura de la proteína intacta.
- Hidrolizados con grado de hidrólisis variable, generalmente alto, comúnmente usados como saborizantes o aromatizantes. Según el sustrato y las condiciones de hidrólisis, pueden aportar sabor y olor a los alimentos a los que se añadan. Normalmente se obtienen mediante la hidrólisis ácida, por lo que el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido utilizada, lo cual influirá, junto con la interacción de los péptidos resultantes con azúcares y lípidos, en los atributos sensoriales del producto final. Actualmente, el uso de estos hidrolizados está en desuso, debido a que el proceso para su obtención puede dar lugar a la aparición de antinutrientes.

Hoy día, se está potenciando el uso de proteasas para la obtención de hidrolizados extensivos que puedan usarse como flavorizante [142, 143].

- Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, destinados a alimentación especializada, como suplementos o dietas médicas. En este grupo se encuentran los hidrolizados proteicos que contienen los péptidos bioactivos de interés y a los que se hace referencia en la presente tesis al hablar de forma genérica de “hidrolizados de proteínas”.



**Figura 4.** Representación esquemática de los hidrolizados proteicos según su grado de hidrólisis. Figura creada con Microsoft Power Point.

La hidrólisis proteica puede ocurrir en nuestro cuerpo mediante la digestión gastrointestinal de los alimentos (hidrólisis fisiológica) mediada por proteasas como pepsina, tripsina o quimotripsina, y que va a producir la liberación de aminoácidos y

pequeños péptidos que serán absorbidos por las células del endotelio digestivo. Sin embargo, la hidrólisis proteica también puede producirse durante el procesado de diversos tipos de alimentos, debido fundamentalmente a la acción de microorganismos implicados en procesos de fermentación o por proteasas endógenas del material original [144]. Por otro lado, los hidrolizados proteicos pueden obtenerse a través de digestión con ácidos o álcalis (hidrólisis química) o mediante el uso de enzimas (hidrólisis biológica) [145]. Hoy día, apenas se utiliza la hidrólisis química debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos, se forman D-aminoácidos y compuestos tóxicos como Lisinoalanina. En la hidrólisis biológica, los hidrolizados se producen mediante la acción de determinadas enzimas proteolíticas sobre proteínas completas en condiciones controladas de pH y temperatura, seguido de un procesamiento posterior para aislar los péptidos bioactivos deseados de una mezcla compleja de péptidos activos e inactivos. Estas condiciones controladas reducen la formación de compuestos indeseables y mantienen el valor nutricional de la proteína de origen, ya que no se produce degradación de los componentes hidrolizados. El resultado de esta hidrólisis muestra ventajas tecnológicas como la mejora en la solubilidad de los productos y en la estabilidad al calor [146].

La capacidad de las enzimas para hidrolizar una proteína es muy variable, por lo que es fundamental la elección de una enzima adecuada para poder obtener compuestos que tengan unas determinadas características fisicoquímicas y nutricionales. Según

sus mecanismos de hidrólisis, puede darse una hidrólisis endopeptídica o exopeptídica. Las endopeptidasas, son enzimas que hidrolizan las proteínas rompiendo al azar los enlaces peptídicos que se encuentran dentro de la secuencia de la proteína, mientras que las exopeptidasas son enzimas que sistemáticamente eliminan aminoácidos del extremo N o C terminal [145]. Algunos ejemplos de enzimas de grado alimentario son la Alcalasa 2.4L, también conocida como subtilisina A, que es una serina endopeptidasa que se obtiene de *Bacillus licheniformis* con un pH óptimo alcalino y una amplia especificidad de sustrato, que se ha mostrado útil para obtener péptidos con actividad antioxidante a partir de diferentes fuentes proteicas [147], la Izyme AL, que actúa de forma similar a la tripsina, es decir, es una serina proteasa que hidroliza proteínas en el lado carboxilo de los aminoácidos lisina o arginina [148] y la Bioproteasa LA660, una endopeptidasa de grado alimentario, que se obtiene a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus* y que por sus características de estabilidad y resistencia al pH y la temperatura, resulta idónea para procesos de hidrólisis enérgicos [74].

La naturaleza de las proteínas alimentarias, la especificidad de las enzimas proteolíticas utilizadas para la hidrólisis, las condiciones de procesamiento (tiempo, pH, temperatura), así como la proporción enzima/sustrato, determinan el peso molecular, la composición de aminoácidos y secuencias de los péptidos y, por lo tanto, sus actividades biológicas [149]. En general, los hidrolizados de proteínas obtenidos mediante tratamientos biológicos, están compuestos por una mezcla de diversos péptidos inactivos y activos que tienen varios tamaños y diferentes secuencias de aminoácidos [150].



Debido a la hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros fenómenos [151, 152]. A su vez, las propiedades nutricionales de la hidrólisis reflejan un aumento de su solubilidad, digestibilidad y una disminución de la alergenicidad de los hidrolizados cuando se las compara con las proteínas parentales [152].

### **Péptidos bioactivos**

El desarrollo de compuestos bioactivos y seguros (como péptidos antioxidantes, antimicrobianos, antihipertensivos, etc.) procedentes de diversas fuentes naturales, que pueden ser utilizados para la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades degenerativas como hipertensión, obesidad y cáncer, ha atraído una atención cada vez mayor [150].

La actividad biológica de los péptidos se basa principalmente en su composición y secuencias de aminoácidos [153]. De esta forma, se ha descrito que las propiedades multifuncionales observadas en distintos péptidos dependen de su estructura, así como de su hidrofobicidad y carga [154], conteniendo la mayoría de estos péptidos bioactivos de 2 a 20 aminoácidos y siendo generalmente ricos en aminoácidos hidrófobos [155, 156].

Los péptidos bioactivos ofrecen ventajas sobre los fármacos convencionales debido a su amplio espectro de acción terapéutica, los bajos niveles de toxicidad que presentan y la diversidad

estructural. Además, al igual que ocurre con los hidrolizados de proteínas, los péptidos con pesos moleculares bajos son menos alergénicos que sus proteínas originales y presentan un aumento de su solubilidad y digestibilidad [150, 152].

Por esta razón, en los últimos años ha habido un gran interés con respecto a la producción, caracterización y aplicaciones de péptidos bioactivos derivados de alimentos debido a sus numerosos efectos beneficiosos para la salud. Los estudios más recientes se centran principalmente en investigar el potencial terapéutico de estos compuestos naturales en base a su composición en aminoácidos, hidrofobicidad, secuencias y longitud de las mismas. Como se ha descrito en apartados anteriores, los péptidos liberados de las proteínas alimentarias, más allá de sus propiedades nutricionales, pueden exhibir diversas actividades biológicas que incluyen actividades antihipertensivas, antioxidantes, antitrombóticas, hipoglucemiantes, hipocolesterolémicas y antibacterianas, entre otras [157].

Los péptidos que muestran algún tipo de función biológica suelen estar presentes en concentraciones bajas. Por tanto, es necesario a su vez el fraccionamiento y concentración de estos por métodos como ultrafiltración o técnicas específicas de cromatografía [150].

Para ejercer actividades biológicas después de la administración oral, los péptidos activos deben ser en primer lugar resistentes a la degradación por las enzimas digestivas y una vez absorbidos, deben ser resistentes a la degradación por las peptidasas plasmáticas hasta alcanzar sus tejidos diana y ejercer sus

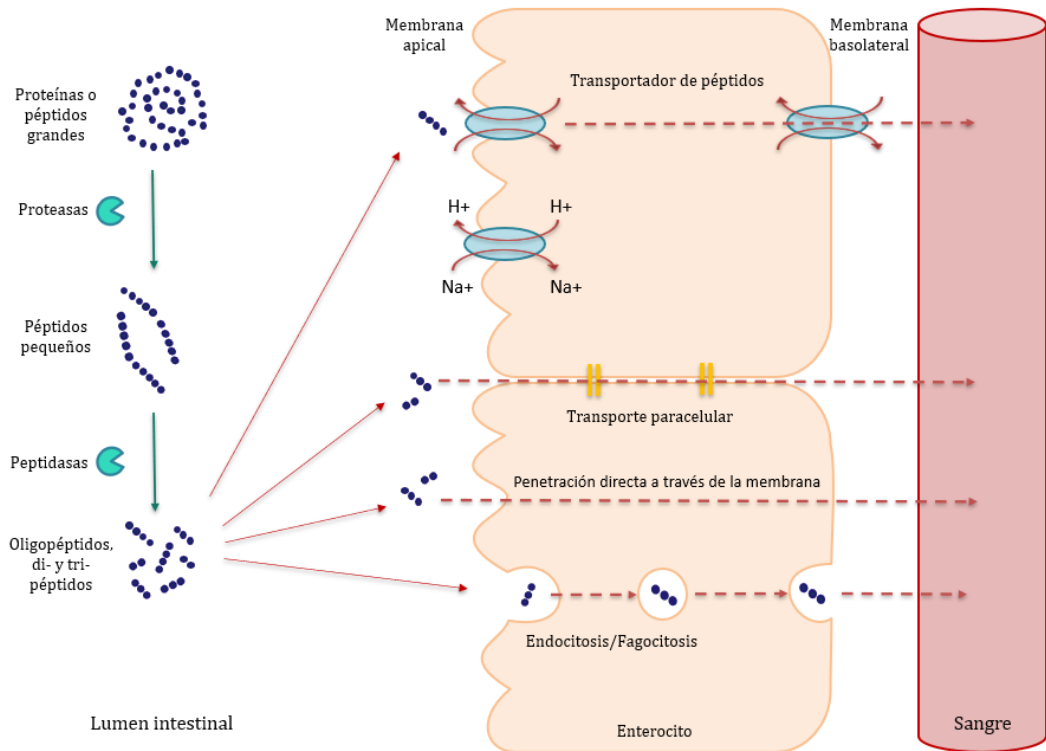
actividades biológicas [158]. En el tracto gastrointestinal, las proteasas digestivas pueden hidrolizar péptidos grandes, lo que lleva a la liberación de nuevos péptidos más pequeños con más o menos actividad (**Figura 5**). Por tanto, debe evaluarse la estabilidad *in vivo* de los biopéptidos frente a las proteasas digestivas para predecir sus efectos biológicos. Esta estabilidad depende de su composición y longitud. Varios estudios observaron que los péptidos pequeños son más resistentes a la degradación por proteasas gastrointestinales y peptidasas plasmáticas que los péptidos de alto peso molecular, lo que lleva a pensar que los péptidos pequeños, que muestran actividad *in vitro*, puedan conservar estas propiedades al ser consumidos y por lo tanto mostrar efectos *in vivo* [150].

En cuanto a la composición de aminoácidos, es bien sabido que los péptidos que contienen prolina son generalmente resistentes a la degradación digestiva y, por lo tanto, podrían ser absorbidos en su forma intacta a través del intestino [159, 160], lo cual ha sido observado en el caso de péptidos pequeños, particularmente, en estos dipéptidos y tripéptidos [161, 162]. En conjunto, es importante evaluar no solo su digestión y absorción, sino también la distribución, el metabolismo y la excreción [163].

Con relación a su absorción, se han postulado distintos mecanismos para explicar la captación intestinal de péptidos desde la luz del tracto gastrointestinal. De forma muy resumida, los principales mecanismos son el transporte paracelular a través de uniones estrechas intercelulares; el transporte directo a través de las membranas de las células epiteliales; endocitosis/fagocitosis por las células; y por último, el transporte activo mediante proteínas

transportadoras específicas. Cada uno de estos mecanismos puede ocurrir solo o en asociación con otros, y a su vez, un mismo péptido puede utilizar uno o más mecanismos diferentes, lo que aumenta la complejidad del proceso [139, 164] (**Figura 5**).

Por tanto, el uso oral de péptidos bioactivos e hidrolizados de proteínas ofrece una serie de ventajas y desafíos específicos que requieren de más investigación y desarrollo dirigidos a diferentes aspectos como la palatabilidad, la digestión y los sitios de acción. El desarrollo de estos péptidos con fines terapéuticos y de promoción de la salud debería tener en cuenta estos factores a la hora de diseñar estrategias para el uso oral [139]. Estos péptidos pueden ejercer diferentes propiedades biológicas como actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antihipertensivas y antibacterianas. Esto ha dado lugar a una intensa investigación sobre las posibles aplicaciones de los péptidos multifuncionales derivados de los alimentos en la prevención o el tratamiento de diferentes enfermedades [165].



**Figura 5.** Esquema de los procesos de digestión y absorción intestinal de proteínas y péptidos. Figura creada con Microsoft Power Point.

Debido a su potencial para la salud humana y que su consumo es seguro para la salud y no comporta ningún riesgo para esta, los hidrolizados de proteínas y los péptidos bioactivos, y en concreto los procedentes de *A. caudatus*, pueden usarse como ingredientes en alimentos funcionales y productos farmacéuticos para mejorar la salud y prevenir enfermedades [150], ya que como se ha descrito, distintos estudios realizados en las últimas décadas muestran que los péptidos bioactivos procedentes de diversas fuentes alimenticias, además de sus propiedades nutricionales, exhiben varias funciones biológicas que incluyen propiedades antioxidantes [166], antimicrobianas [167], actividad hipotensiva [168],

anticoagulante [169], capacidad para reducir el colesterol [170, 171], efecto hipoglucemiante [172], actividad antitumoral [173], etc.

Se han identificado varios péptidos bioactivos en *A. caudatus* [68, 70], por ejemplo, se ha descrito que los péptidos de bajo peso molecular procedentes de *A. caudatus* son los principales responsables de la actividad captadora de radicales libres y de promover la actividad de enzimas antioxidantes, mientras que los péptidos de mayor tamaño son el principal determinante de los efectos citotóxicos contra las células de cáncer de colon [68]. Distintos estudios han identificado diferentes péptidos con propiedades biológicas. Se identificaron 9 secuencias de proteínas en dos fracciones de hidrolizados de proteínas de *A. caudatus* como por ejemplo YESGSQ, GGEDE y NRPET, en la fracción uno, y FLISCLL, TALEPT, HVIKPPS, SVFDEELS, ASANEPDEN y DFIILE en la fracción dos. Estas 9 secuencias de péptidos contenían los residuos de aminoácidos implicados en la unión de la enzima en el N-terminal y C-terminal. La relación entre la estructura y la actividad biológica hizo que se identificara a estos péptidos como antioxidantes y con capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la  $\alpha$ -amilasa y DPP-IV [68].

De igual forma, otros 4 péptidos procedentes de hidrolizados de globulinas de amaranto, revelaron una actividad inhibidora de la DPP-IV similar en los puntos de dimerización de esta enzima. Estos péptidos tienen más de 13 residuos (**Tabla 8**) [174].

Además, se han detectado otros péptidos pequeños como YP, LPP, LRP, VPP e IKP en hidrolizados de proteínas de semillas de amaranto. El péptido IKP ha sido descrito como uno de los

inhibidores más potentes de la actividad de la ECA, mostrando acción antihipertensiva [90].

Se han identificado y caracterizado otros péptidos en proteínas de semillas de amaranto inhibidores de la actividad de la DPP-IV y la ECA [108, 174]. Los inhibidores naturales de DPP-IV son de gran interés como terapia para promover una vida saludable [175]. Los fármacos inhibidores de la ECA se utilizan para controlar la presión arterial alta en sujetos hipertensos. Estudios previos, identificaron a la leche fermentada como la principal fuente de péptidos inhibidores de la ECA, con valores de IC50 que varían de 0,47 a 1,70mg/ml. El valor de IC50 del amaranto es de 0,6mg/ml, encontrándose dentro del rango de los péptidos de la leche [176].

Se ha demostrado el efecto inmunomodulador *in vitro* del amaranto por el péptido SSEDIKE, que posee una capacidad moduladora de activación en las células CACO-2 para suprimir la expresión de genes inflamatorios [177]. No solo los péptidos pequeños mostraron efectos saludables, también la fracción de lectina de *A. caudatus* podría ejercer un efecto citotóxico que promovería la apoptosis en la célula cancerosa, además de inhibir la adhesión celular [178].

Es bien sabido que la función inmunológica juega un papel importante en la prevención y el control de enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares causadas por un estado inflamatorio crónico subyacente, siendo a su vez las principales causas de mortalidad en todo el mundo [179]. Sin embargo, existen pocas estrategias eficaces para modular la respuesta inmune, por lo que es esencial encontrar

inmunomoduladores nuevos y más eficaces que mejoren la función inmunitaria, como pueden ser los péptidos derivados de proteínas alimentarias [150]. De esta forma, las proteínas de *A. caudatus* podrían empezar a cobrar importancia como ingredientes de alimentos funcionales para la prevención y manejo de enfermedades crónicas relacionadas con estrés oxidativo, hipertensión, diabetes [180] y/o inflamación [177]. En la **Tabla 8** se recogen los péptidos bioactivos identificados en amarantos.



**Tabla 8.** Péptidos bioactivos del amaranto.

<b>Péptido bioactivo</b>	<b>Función</b>	<b>Tipo de amaranto</b>
<b>YESGSQ, GGEDE, NRPET, FLISCLL, TALEPT, HVIKPPS, SVFDEELS, ASANEPDEN, DFIILE</b>	Antioxidante y antihipertensivo (inhibición de ACE, $\alpha$ -amilasa y DPP-IV)	<i>A. caudatus</i> [68]
<b>STHASGFFFFHPT, STNYFLISCLLFLVFNCGMGEG, GLTEVWDSNEQEF, TIEPHGLLLPSFTSAPELIYIEQNGITGMMIP G-CPETYESGSQQFQGGEDE</b>	Antihipertensivo (inhibición de DPP-IV)	<i>A. hypochondriacus</i> [174]
<b>YP, LPP, LRP, VPP, IKP</b>	Antihipertensivo (inhibición de ACE)	Diferentes especies de <i>Amaranthus</i> [90]
<b>PÉPTIDOS DE LAS FRACCIONES GBSSI, ALB1H48, GLOBH48, GLUH24, DIPROTINA A Y SITAGLIPTINA</b>	Antihipertensivo (inhibición de ACE y DPP-IV)	<i>A. hypochondriacus</i> [108, 133]
<b>SSEDIKE</b>	Inmunomodulador	<i>A. hypochondriacus</i> [177]
<b>NEAAALFR, SIFQFPK, RYVTFK, ILDPLAQFEVEPSK, TYDGLVHIK, LSTDDWILVDGNDPR</b>	Antitumoral	<i>A. caudatus</i> y <i>A. mantegazzianus</i> [178]
<b>PÉPTIDOS DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS TOTALES, FRACCIONES DE ALBÚMINA, GLOBULINA Y GLUTELINA</b>	Antihipertensivo, antioxidante, antitumoral, hipocolesterolémico, antimicrobiano y antidiabético	<i>A. hypochondriacus</i> [180]

## INFLAMACIÓN

El sistema inmunitario es una compleja red de moléculas, células, tejidos y órganos que actúa para eliminar elementos potencialmente dañinos como bacterias, virus, hongos, protozoos y previene el crecimiento de células cancerosas. El sistema inmunitario se clasifica en dos categorías funcionales principales, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa [181].

La inmunidad innata es inespecífica y proporciona la primera línea de defensa a través de medios anatómicos (piel, membranas mucosas), fisiológicos (pH bajo, temperatura y mediadores químicos), celulares (macrófagos, células polimorfonucleares y células dendríticas), células NK y componentes inflamatorios (citoquinas, interferones, moléculas del complemento, defensinas, leucotrienos, proteínas de fase aguda y prostaglandinas) [181].

La inmunidad adaptativa, también llamada inmunidad específica o inmunidad adquirida, es muy específica. Se divide, a su vez, en dos tipos, inmunidad mediada por células e inmunidad mediada por anticuerpos o humoral. Los linfocitos T y B son las células más importantes en la inmunidad adaptativa. La inmunidad mediada por células implica a los linfocitos T efectores, que secretan moléculas como citoquinas y median la respuesta inmunitaria tras la interacción con células presentadoras de antígenos. La inmunidad humoral involucra a los linfocitos B, responsables de la producción de anticuerpos tras la interacción con antígenos específicos. Los anticuerpos pueden unirse a antígenos de patógenos invasores y marcarlos para su destrucción por macrófagos.

Los monocitos son componentes fundamentales de la inmunidad innata, mediando diversas funciones biológicas determinadas por sus estados de activación. Responden a la infección microbiana o cambios fisiológicos en el microambiente, diferenciándose en macrófagos M1 o M2. La activación clásica por LPS o señales inflamatorias conduce a la generación de macrófagos M1, productores de factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), mientras que la activación alternativa conduce a la generación de macrófagos M2, que son antiinflamatorios y producen citoquinas inmunosupresoras, como el factor de crecimiento transformante beta ( $\text{TGF}\beta$ ). Aunque la activación generalmente surge después de la exposición a patógenos o lesión tisular, varios péptidos cortos, como los péptidos de defensa natural del huésped (HDP, por sus siglas en inglés), también pueden estimular su diferenciación a macrófagos [181, 182].

La inflamación es una respuesta inmune que conduce al reclutamiento celular y producción de mediadores proinflamatorios como  $\text{TNF}\alpha$ , las interleuquinas  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$ ,  $\text{IL-8}$  e interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ), en el lugar de la infección o daño tisular. Estos mediadores pueden amplificar la respuesta inflamatoria al interactuar con diferentes tipos de células. Sin embargo, su producción excesiva y descontrolada conduce a daño tisular y pérdida de la función inmunitaria. La respuesta inflamatoria puede ser aguda (efectos momentáneos seguidos de curación) o crónica (efectos continuos). Se ha demostrado que las respuestas inflamatorias crónicas a menudo se asocian con la patogénesis de enfermedades como la diabetes tipo 2, la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la

artritis, la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares [179, 183].

Otro de los componentes fundamentales de la inmunidad innata son los inflamasomas, complejos multiproteicos citoplasmáticos que comprenden una proteína sensor, caspasas inflamatorias y, en algunos casos, una proteína adaptadora que conecta los dos componentes anteriores. Pueden activarse mediante estímulos endógenos y exógenos, lo que lleva a la activación enzimática de la caspasa-1 canónica, la caspasa-4 y caspasa-5 no canónicas o caspasa-8, resultando en la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18, y finalmente en la muerte celular por apoptosis o piroptosis [184].

De forma muy resumida, el ensamblaje de un complejo heterooligomérico basado en una proteína de “andamio”, como las NLRP y en algunos casos el reclutamiento adicional de adaptadores, como la proteína ASC, provocan la activación de la caspasa. A su vez, la activación de ésta, da como resultado la activación proteolítica de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18. Esta activación inflamatoria dará lugar en última instancia a muerte celular por piroptosis o apoptosis. La activación apropiada del inflamasoma es vital para que el organismo pueda hacer frente a patógenos o daño tisular, mientras que su activación aberrante puede provocar respuestas inmunes incontroladas que pueden contribuir a diversas enfermedades, incluidos distintos trastornos autoinflamatorios, enfermedades cardiometabólicas, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, es esencial mantener un adecuado equilibrio entre la activación y la inhibición del inflamasoma, lo que

requiere una regulación precisa tanto del ensamblaje de sus componente como de su función efectora [184].

Según estudios epidemiológicos y clínicos, el 15-20% de las neoplasias malignas en todo el mundo se desarrollan debido a la inflamación crónica y se ha convertido en una amenaza pública tanto en países desarrollados como en desarrollo [179]. Las respuestas inflamatorias podrían tratarse con fármacos antiinflamatorios. Sin embargo, la mayoría de las intervenciones farmacológicas actuales son inadecuadas para controlar las respuestas inflamatorias crónicas y su consumo prolongado se asocia con efectos secundarios adversos [185, 186]. Por tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar opciones terapéuticas alternativas y más seguras a partir de productos o alimentos naturales [179].

## **Inflamación Intestinal**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que incluye la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), es una inflamación crónica recurrente del tracto gastrointestinal [187]. Sobre la patogenia aún se conoce poco, pero la EII es multifactorial y se caracteriza por la pérdida de la integridad de la barrera epitelial debido a respuestas inflamatorias excesivas. El epitelio intestinal es una barrera crítica que controla el paso de agua y electrolitos e inhibe el paso de bacterias y otros agentes patógenos. Este epitelio es una monocapa celular en la que los contactos celulares están sellados, controlando la permeabilidad, que aumenta durante las fases activas de la EII. Algunos tratamientos incluyen fármacos antiinflamatorios, anticuerpos contra el TNF $\alpha$ , esteroides o

inmunomoduladores que inhiben la proliferación de células del sistema inmune. Sin embargo, estos fármacos solo consiguen aliviar los síntomas y en los casos más graves, se requiere cirugía. Por tanto, actualmente, no existe ningún tratamiento para reducir la inflamación y restaurar la función de barrera intestinal. Además, la mayoría de los medicamentos pueden tener efectos secundarios graves. Esto hace necesarios enfoques de tratamiento alternativos. Los suplementos nutricionales se han estudiado ampliamente en cultivos celulares y modelos animales, y algunos de ellos han mostrado resultados prometedores en estudios clínicos [187, 188].

### **Inmunomodulación**

Un inmunomodulador es cualquier sustancia que pueda aumentar, disminuir o modificar la respuesta inmune al influir en cualquier punto del sistema inmunitario, ya sea en la respuesta innata o adaptativa. Existen fármacos para modular la respuesta inmunitaria en humanos. Sin embargo, los efectos secundarios dañinos y el alto costo de los fármacos han restringido su uso en pacientes y la mayoría de los fármacos inmunomoduladores no son apropiados para usos crónicos o preventivos. En los últimos años, se ha demostrado que la modulación de la función inmunológica a través de los componentes de la dieta es una estrategia eficaz y eficiente; mientras tanto, el descubrimiento de nuevos péptidos inmunomoduladores a partir de proteínas alimentarias podría proporcionar una ventaja adicional al tratamiento [181].

El consumo de hidrolizados de proteínas inmunomoduladores puede contribuir a retrasar o prevenir

enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico. Con el fin de desarrollar estos hidrolizados con efecto inmunomodulador, es necesario conocer qué péptidos contenidos en ellos son responsables de estos efectos inmunológicos, así como los mecanismos subyacentes. Se han empleado con éxito tanto métodos *in vitro*, cultivos de líneas celulares, como *in vivo*, modelos animales, para evaluar los efectos inmunomoduladores de péptidos o hidrolizados de proteínas de origen alimentario [181, 189], demostrándose el efecto inmunomodulador de estos hidrolizados tanto en monocitos, macrófagos y células mononucleares de sangre periférica humana [148, 190-192].

Por otro lado, también se han demostrado los efectos inmunomoduladores de los hidrolizados de proteínas en ensayos clínicos [193].

Además de la capacidad moduladora de la inmunidad innata y adaptativa de los péptidos o hidrolizados de proteínas, el potencial inmunomodulador relacionado con la inflamación se ha convertido en un área activa de investigación, ya que la inflamación se ha asociado durante mucho tiempo con la fisiopatología de muchas enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, diabetes, etc. Se ha demostrado que varios péptidos o hidrolizados de proteínas tienen un potencial inmunomodulador relacionado con la inflamación al inhibir la producción de NO, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) y citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ ) en modelos de cultivo celular *in vitro* inducidos por LPS [181].

Para comprender los efectos inmunitarios que pueden inducir los hidrolizados de proteínas y, en última instancia, utilizarlos para fines específicos, es de crucial importancia comprender exactamente cómo se producen estos efectos. Hasta ahora, solo unos pocos estudios se han centrado en elucidar los mecanismos subyacentes de los efectos inmunomoduladores de los hidrolizados de proteínas. Investigaciones recientes sugieren que los péptidos podrían unirse directamente a inmunoreceptores de la superficie celular implicados en señalización pro o antiinflamatoria; entrar en la célula a través de un transportador de péptidos e interferir con estas vías de señalización; o bien ser absorbido por la célula mediante endocitosis y actuar de forma similar [189].

## **Neuroinflamación**

La neuroinflamación, de manera genérica, es la compleja respuesta inmune innata del tejido neural para contener la infección, eliminar patógenos, restos celulares y proteínas mal plegadas. Sin embargo, en las enfermedades neurológicas crónicas la neuroinflamación se vuelve persistente y perjudicial para las células neuronales. La evidencia emergente sugiere que la neuroinflamación es un factor clave en varios trastornos neurológicos, incluidas las enfermedades neurodegenerativas y las lesiones del Sistema Nervioso Central (SNC). Se trata de un arduo proceso orquestado por varios grupos de células gliales en el SNC y células inmunitarias periféricas. La comunicación entre los distintos tipos celulares en la neuroinflamación del SNC es un proceso extremadamente complejo y dinámico. Sin embargo, la comprensión



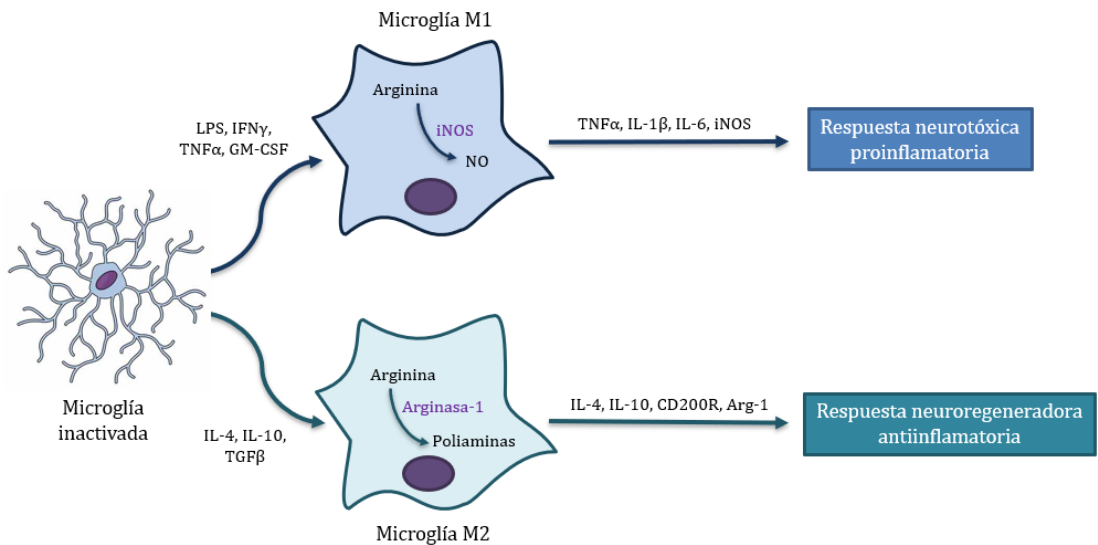
de cómo las células gliales interactúan entre sí para dar forma a la respuesta inmunitaria del SNC sigue siendo limitada [194].

Las células gliales son las células más abundantes y ampliamente distribuidas en el SNC; interactúan con neuronas y células inmunes, así como con vasos sanguíneos. Algunas de éstas funcionan como células inmunitarias innatas residentes en el SNC, contribuyendo a la vigilancia del medio fisiológico y actuando como primera línea de defensa. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares de las células gliales en la neuroinflamación siguen siendo poco conocidos [194]. Las células gliales incluyen astrocitos, microglía y oligodendrocitos, así como las células precursoras de oligodendrocitos (OPC), consideradas el cuarto tipo de células gliales en el SNC [195].

La microglía es el principal elemento celular con función inmunitaria dentro del SNC. Al igual que los macrófagos, la microglía puede alterar sus fenotipos y funciones en respuesta a alteraciones del microambiente. Dependiendo del balance de factores secretados, la microglía puede desarrollar un fenotipo de activación clásico M1 o proinflamatorio, o bien un fenotipo de activación alternativo M2 o antiinflamatorio [196], similar a lo que ocurre con los monocitos/macrófagos. El estado M1 provoca la liberación de citoquinas y moléculas proinflamatorias como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), mientras que en el estado M2 se da la expresión de citoquinas y moléculas antiinflamatorias, como la arginasa-1 (Arg-1) [197] (**Figura 6**).

La evidencia de la polarización de la microglía en modelos de enfermedades relacionadas con la neuroinflamación llevó a la idea

de que la inhibición de la polarización de la microglía M1 junto con la promoción de la polarización de la microglía M2 podría ser una estrategia viable para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación [198, 199].



**Figura 6.** Representación de la polarización de microglía a fenotipos M1 y M2 por las dos posibles rutas de activación. Figura creada con Microsoft Power Point.

Con toda la información y evidencias disponibles sobre el efecto beneficioso de distintos hidrolizados proteicos sobre la salud, en una amplia gama de patologías, y debido más concretamente a los efectos sobre parámetros oxidativos y el sistema inmune que han demostrado los hidrolizados proteicos en ensayos previos realizados en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*, la hipótesis de partida de la presente tesis doctoral plantea que la optimización de la obtención y aislamiento y posterior administración *in vitro* de hidrolizados proteicos procedentes de semillas de *A. caudatus* o

kiwicha (HPK) a sistemas libres de células, así como a cultivos celulares, permitirá observar su modulación tanto del estado redox como de la respuesta inmune.





## 2. OBJETIVOS



## OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es la obtención y evaluación de compuestos proteicos de alto valor añadido a partir de semillas de *A. caudatus* (kiwicha), los cuales puedan usarse como suplemento dietético o en dietas médicas por su actividad antioxidante y antiinflamatoria, y con ello neuroprotectora.

De este objetivo general, se derivan una serie de objetivos específicos, de carácter más técnico y que garantizan la consecución del objetivo general con suficientes garantías, demostrando la seguridad, eficacia y bioactividad de los productos generados. De este modo, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Obtener, caracterizar y optimizar aislados e hidrolizados proteicos seguros, eficaces y tecnofuncionales a partir de harina desengrasada de semillas de kiwicha a nivel de planta piloto.
2. Estudiar *in vitro* la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos obtenidos de la semilla de kiwicha.
3. Estudiar *in vitro* el efecto antiinflamatorio de los hidrolizados proteicos obtenidos de la semilla de kiwicha en modelos estandarizados de células epiteliales intestinales.
4. Estudiar *in vitro* el efecto antiinflamatorio de los hidrolizados proteicos obtenidos de la semilla de kiwicha en modelos estandarizados de inflamación sistémica.
5. Estudiar *in vitro* el efecto antiinflamatorio y neuroprotector de los hidrolizados proteicos obtenidos de la semilla de kiwicha en modelos estandarizados de microglía.







### 3. MATERIAL Y MÉTODOS



## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Reactivos y muestras**

La harina de semilla de *Amaranthus caudatus* fue proporcionada por STURLA, S.R.L. (Buenos Aires, Argentina). La enzima Bioproteasa LA-660 fue comprada a BIOCON (Barcelona, España). Todos los productos químicos (reactivos y disolventes) fueron de grado analítico y proporcionados por Sigma-Aldrich, Bachem AG y Gibco.

### **Curva de solubilidad de proteínas**

Se disolvió harina desengrasada de kiwicha (HDK, 2 g) en H<sub>2</sub>O (100 mL) y se ajustó el pH a 12 con NaOH. Seguidamente, el pH se fue disminuyendo sucesivamente a 10, 8, 6, 4 y 2 hasta pH constante utilizando HCl. En cada punto de pH se tomó una alícuota, por duplicado, que se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g y se midió el contenido en nitrógeno de los sobrenadantes recuperados. Para obtener la curva de solubilidad se representa el porcentaje de nitrógeno soluble en los sobrenadantes (respecto al nitrógeno total) frente a las diferentes unidades de pH.

### **Obtención del aislado de proteína de kiwicha**

El aislado proteico de kiwicha (APK) se obtuvo mediante el método de Lqari et al. [200]. En resumen, se solubilizó la harina desengrasada de kiwicha (HDK) con Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> al 0,25% (p/v) a pH 11 durante 1 hora. Después de centrifugar el extracto a 7500 rpm

durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y el pellet se sometió de nuevo al mismo proceso de extracción. Ambos sobrenadantes se ajustaron al punto isoeléctrico de las proteínas de la kiwicha, previamente determinado mediante la curva de solubilidad, (pH 4 durante 30 minutos), siendo este el pH donde se produce la menor solubilidad de las proteínas. La dispersión obtenida se centrifugó a 7500 rpm durante 15 minutos, y el precipitado se lavó con agua destilada ajustada a pH 4 y se centrifugó de nuevo, en las mismas condiciones, para eliminar las sales residuales y otros compuestos no proteicos. Finalmente, las proteínas precipitadas se liofilizaron y almacenaron a temperatura ambiente.

### **Hidrólisis del aislado de proteína de kiwicha**

La hidrólisis del APK se realizó en un biorreactor LAMBDA MINIFOR (LAMBDA Laboratory Instruments Sihlbruggstrasse, Switzerland) con agitación continua a pH y temperatura controlados. El APK se resuspendió en agua destilada (10% p/v), la temperatura se ajustó a 50°C y el pH se ajustó a 8. Tras 30 minutos se añadió Bioproteasa en una relación enzima/sustrato de 0,3AU/g de proteína. Manteniendo el pH 8 se tomaron alícuotas a 5, 10, 15, 30 y 60 minutos, que se incubaron a 85°C durante 20 minutos en baño de agua para inactivar la enzima. El sobrenadante obtenido por centrifugación a 7500 rpm durante 15 minutos constituyó cada hidrolizado proteico de kiwicha (HPK). Los HPK obtenidos mediante este método se designaron como HPK5, HPK10, HPK15, HPK30 y

HPK60, correspondiendo el número al tiempo de hidrólisis en minutos.

### **Evaluación del grado de hidrólisis**

El grado de hidrólisis (GH), definido como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos, se calculó mediante el método TNBS (ácido trinitrobenceno sulfónico) que determina los grupos aminos libres [201]. El número total de grupos aminos se determinó en una muestra que había sido hidrolizada al 100% en HCl 6 N a 110°C durante 24 horas.

### **Composición química de los productos proteicos obtenidos**

La concentración de proteína se determinó mediante microanálisis elemental, usando un analizador LECO TRUSPEC MICRO (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EEUU) y expresándose como porcentaje tras multiplicar el contenido de nitrógeno por un factor de conversión de 6,25 (factor de conversión para vegetales). La fibra dietética total se determinó mediante el método gravimétrico [202]. El contenido de cenizas se determinó según el método de ignición directa (550°C durante 36 horas). Los polifenoles y los azúcares solubles se midieron utilizando curvas estándar de ácido clorogénico y glucosa, respectivamente [203, 204].

## **Determinación de la composición de aminoácidos mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución**

La composición de aminoácidos se determinó según el método de Alaiz et al. [205] con ligeras modificaciones. Para ello, las muestras (4-6 mg de proteína) se hidrolizaron mediante incubación con HCl 6 N a 110°C durante 24 h en tubos cerrados y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez finalizada la hidrólisis, las muestras se llevaron a sequedad en rotavapor y se redisolviéron en tampón borato sódico 1 M pH 9, llevándolas a un volumen final de 10 mL. Tras su derivatización con etoximetilenmalonato de dietilo, los aminoácidos se determinaron en el hidrolizado ácido mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) (Acquity Arc, Waters, EE. UU.), utilizando ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico como patrón interno, y una columna de fase inversa de 3mm x 150mm (XSelect HSS T3 XP, 2,5  $\mu$ m; Waters). Se utilizó un sistema de gradiente binario con los disolventes (A) acetato de sodio 25 mM, azida de sodio al 0,02% (pH 6,0) y (B) acetonitrilo. El flujo fue de 0.8 mL/min y el gradiente de elución usado fue: tiempo 0-1 min, elución con A:B 92:8, tiempo 1-4.33, gradiente lineal desde A:B 92:8 hasta A:B 86:14; tiempo 4.33-7.32 min, elución con A:B 86:14; tiempo 7.32-11.65 min, gradiente lineal desde A:B 86:14 hasta A:B 72:28; tiempo 11.65-13.31 min gradiente lineal desde A:B 72:28 hasta A:B 65:35, tiempo 13.31-15.64 gradiente lineal desde A:B 65:35 hasta A:B 8:92, tiempo 15.64-16 elución con A:B 8:92. Las curvas de calibración para cada aminoácido se realizaron utilizando una mezcla de estándar de aminoácidos (Merck, España) en las mismas condiciones de hidrólisis de las muestras y los picos resultantes se analizaron con el

software EMPOWER (Waters, EE. UU.). Además, el contenido de triptófano se evaluó según el método de Yust et al. [206]. Brevemente, las muestras (aprox. 20 mg de proteína) se hidrolizaron con 3 mL de NaOH 4 N a 110 °C durante 4 h, en tubos con cierre y bajo atmósfera de nitrógeno. Tras la hidrólisis, las muestras fueron enfriadas en hielo y neutralizadas a pH 7 usando HCl 6 N. Posteriormente, fueron diluidas hasta un volumen de 10 mL con tampón borato sódico 1 M a pH 9. El análisis se llevó a cabo mediante UHPLC con una columna de fase inversa de 3mm x 150mm (XSelect HSS T3 XP, 2,5 µm; Waters), usándose un sistema isocrático binario con tampón acetato sódico 25 mM, azida sódica 0.02% (p/v) pH 6 y acetonitrilo como disolventes en relación 91:9, siendo el flujo de 0.8 mL/min. El contenido en triptófano se determinó a partir de una recta de calibrado preparada con L-triptófano.

### **Digestibilidad proteica**

Para determinar la digestibilidad proteica *in vitro* se usó el método establecido por Sindayikengera y Xia [207] con ligeras modificaciones. La muestra (0,1g) se añadió a un tubo de 50 mL, con 7,5 mL de HCl 0,1 N conteniendo 1,5 mg de pepsina y luego se incubó a 37°C durante 2 h. Seguidamente, la suspensión se neutralizó con NaOH 0,5 N, y se trató con pancreatina (1,875 mg) en 7,5 mL de tampón fosfato 0,2 M (pH 8,0). La mezcla se agitó suavemente y se incubó durante 2 horas más a 37°C. Posteriormente, la muestra se trató con 5 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 10% y se centrifugó a 10000 g durante 20 min a temperatura ambiente. El contenido en proteínas en el sobrenadante se estimó como % de contenido de

nitrógeno  $\times 6,25$  mediante microanálisis elemental en un analizador LECO TRUSPEC MICRO. La digestibilidad proteica se calculó como porcentaje de la relación entre la proteína en el sobrenadante y la proteína total en la muestra.

### **Perfil molecular por Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas**

El perfil molecular de las muestras se determinó usando la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, por sus siglas en inglés) Akta purifier 10 (GE Healthcare Bio-sciences). Se utilizó una columna pre-empaquetada Superose 12 10/300 GL, para cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento con un amplio rango de fraccionamiento para moléculas con pesos moleculares entre 1 y 300 kDa. Se utilizaron proteínas con pesos moleculares conocidos (GE Healthcare, Reino Unido) para calibrar la columna: dextrano azul (2000kDa), aldolasa (158kDa), conalbúmina (75kDa), albúmina de suero bovino (67kDa), ribonucleasa A (13,7kDa) y bacitracina (1423kDa). La recta de calibrado se realizó a partir de los logaritmos de los pesos moleculares de estas proteínas y sus volúmenes de elución. La elución se realizó con 50 mL de tampón fosfato sódico 0,05 M, cloruro sódico 0,15 M y azida sódica al 0,02% (p/v) a pH 7,5, con un flujo de 1 mL/min. El volumen inyectado de las muestras y sus concentraciones fueron de 500  $\mu$ L y 30 mg/mL de proteína, respectivamente. La elución de las proteínas se registró midiendo su absorbancia a 280 nm.



## Actividad antioxidante

- **Actividad captadora del radical DPPH**

El efecto de captación de radicales de las muestras sobre el radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se midió según Wu et al. [208]. Brevemente, se agregaron 1,5 mL de cada muestra (a una concentración de 10 mg de proteína/mL) a 1,5 mL de DPPH 0,1 mM en etanol. La mezcla se agitó y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro modelo DU-640 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE.UU.). Se llevó a cabo un experimento de control de la misma manera, utilizando como control negativo agua destilada en lugar de la muestra y BHT (butilhidroxitolueno) a 0,08 mg/mL como estándar positivo. La actividad de eliminación de radicales de DPPH se expresó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad captadora de radicales DPPH (\%)} = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100,$$

donde Ac y Am representan la absorbancia del control y de la muestra, respectivamente.

- **Poder antioxidante de reducción del hierro (FRAP)**

La capacidad de las muestras para reducir el hierro (III) se midió según Oyaizu [209]. Brevemente, se añadieron 0,1 mL de muestra (a una concentración de 10 mg de proteína/mL) a 0,25 mL de tampón fosfato de sodio 0,2 M (pH 6,6) y 0,25 mL de ferricianuro potásico 0,03 M. La mezcla se incubó a 50°C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 0,25 mL de 0,6 M de ácido tricloroacético y la mezcla se centrifugó a 1300 g durante 10 minutos. Se mezclaron

500  $\mu$ L del sobrenadante con 0,5 mL de agua destilada y 0,1 mL de 3,7 mM de cloruro férrico. Después de 10 minutos, se midió la absorbancia de las soluciones resultantes a 700 nm en un espectrofotómetro modelo DU-640, indicando a mayor absorbancia, mayor poder reductor de la muestra analizada. Se utilizó nuevamente agua destilada como control negativo y BHT a 0,08 mg/mL como estándar positivo.

### **Cultivo y tratamiento de células Caco-2**

La línea celular Caco-2, un modelo de células epiteliales intestinales humanas derivado de un carcinoma de colon, es un modelo bien establecido de absorción intestinal *in vitro*. Las células Caco-2 se obtuvieron de la Unidad de Biología Celular del Instituto de la Grasa (Sevilla, España). Se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con alto contenido de glucosa, suplementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Se incubaron en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Los experimentos se realizaron en placas de doce pocillos, sembrando las células Caco-2 a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células por pocillo. Se utilizaron diferentes condiciones: células no tratadas (control negativo), células expuestas a LPS a 1  $\mu$ g/mL (control positivo) y células expuestas a LPS a 1  $\mu$ g/mL junto con los diferentes tratamientos (HPK15 y HPK30) a 50 y 100  $\mu$ g/mL. Para ello, primero se añadió LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) durante 1 hora y luego se añadió el hidrolizado de kiwicha. Después de la incubación durante un período adicional de 24 horas, se recogieron las células para realizar el conjunto de determinaciones.

## **Cultivo y tratamiento de monocitos**

Las células polimorfonucleares de sangre periférica o PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) fueron obtenidas de *buffy coat* cedido por el Biobanco del Centro Regional de Transfusiones de Sevilla y Huelva y Banco de Tejidos y aisladas por centrifugación mediante gradiente de Ficoll™. Los monocitos fueron obtenidos mediante separación inmunomagnética usando microbeads CD14<sup>+</sup> y columnas LS en un sistema midiMACS (MiltenyiBiotec, Madrid, España). Seguidamente los monocitos aislados fueron suspendidos en medio de cultivo RPMI suplementado con L-glutamina, penicilina, estreptomina y FBS inactivado por calor al 10%. Para los tratamientos se usó una densidad celular de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Se utilizaron diferentes condiciones: células no tratadas (control negativo), células expuestas a LPS a 1 µg/mL (control positivo) y células expuestas a LPS a 1 µg/mL junto con los diferentes tratamientos (HPK15 y HPK30) a 50 y 100 µg/mL. Para ello, primero se añadió LPS durante 1 hora y luego se añadió el hidrolizado de kiwicha. Después de la incubación durante un período adicional de 24 horas, se recogieron las células para realizar el conjunto de determinaciones.

## **Diferenciación y polarización de monocitos en macrófagos M1 y M2**

La diferenciación de monocitos se indujo durante 6 días en presencia de M-CSF humano recombinante (25 ng/mL) para obtener macrófagos M0. A continuación, estas células se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, penicilina, estreptomina y

FBS inactivado por calor al 10%. Para la polarización M1 y M2, los macrófagos M0 se expusieron a LPS (1 µg/mL) junto con IFNγ (20 ng/mL) e IL-4 (20 ng/mL) respectivamente, durante 24 h. Para evaluar el efecto de los HPK en la polarización de los macrófagos, se expusieron estos macrófagos M0 tratados durante 24h a HPK15 y HPK30 a 50 y 100 µg/mL 24h adicionales.

### **Cultivo y tratamiento de células BV-2**

La línea BV-2, un modelo de células de microglía de ratón, se utilizó para estudiar la neuroinflamación *in vitro*. Se obtuvieron de la Unidad de Biología Celular del Instituto de la Grasa (Sevilla, España). Estas se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) con alto contenido de glucosa, suplementado con FBS inactivado por calor al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Se incubaron en una atmósfera con CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Los experimentos se realizaron en placas de doce pocillos, sembrando las células BV-2 a una densidad de 5x10<sup>5</sup> células por pocillo. Se utilizaron diferentes condiciones: células no tratadas (control negativo), células expuestas a LPS a 1 µg/mL (control positivo) y células expuestas a LPS a 1 µg/mL junto con los diferentes tratamientos (HPK15 y HPK30) a 50 y 100 µg/mL. Después de la incubación durante un período adicional de 24 horas, se recogieron las células para realizar el conjunto de determinaciones.

## **Ensayo de viabilidad celular**

Las células se incubaron, en este caso, con diferentes concentraciones de hidrolizados de kiwicha en placas de 96 pocillos ( $1 \times 10^5$  células por pocillo) durante 24 horas. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A continuación, se añadió la solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, Sigma-Aldrich) a los pocillos y se incubó entre 3 y 5 horas hasta que se hizo visible un precipitado púrpura. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT, llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color púrpura (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Los cristales de MTT-formazán se solubilizaron con DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich) y se midieron con un lector de microplacas Fluoroskan Ascent® de Thermo Scientific a 570 nm corregido a 650 nm. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de absorbancia en comparación con la obtenida en el control, es decir, en las células no tratadas (datos no mostrados).

## **Extracción de ARN y Retrotranscripción**

Se extrajo ARN de las células Caco-2, monocitos y BV-2 utilizando el reactivo TRIsure (Bioline), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron recogidas y lisadas con 0,8 mL de TRIsure incubándolas 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 0,2 mL de cloroformo y se agitaron durante 15

segundos. A continuación, se incubaron 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 g durante 15 minutos a 4°C para obtener la separación de las fases (proteínas-ADN-ARN). La fase acuosa con el ARN se pasó a un nuevo microtubo al cual se le añadió 500 µL de isopropanol y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C para llevar a cabo la precipitación del ARN. Una vez obtenido el pellet de ARN, se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Por último, el pellet, una vez secado, se resuspendió en agua libre de RNasa. La cantidad y pureza del ARN se evaluó calculando la relación de absorbancias entre las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm, mediante la ratio  $(A_{260}/A_{280})$  y  $(A_{260}/A_{230})$  utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

El ARN (1 µg) se sometió a transcripción inversa utilizando el kit iScript (Bio-Rad, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real cuantitativa (qRT-PCR)**

Se usó una cantidad de 10 ng del ADNc resultante de la retrotranscripción como molde para las amplificaciones por PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm para genes específicos se determinaron en un sistema CFX96 (Bio-Rad). Para cada reacción de PCR, se agregó al cDNA la mezcla del reactivo Brilliant SYBR green QPCR Supermix (Bio-Rad) y los pares de primers o cebadores correspondientes para los genes de interés. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado y se utilizó la media del ciclo umbral (Ct) del triplicado para calcular la expresión relativa de

ARNm de los genes seleccionados. La magnitud del cambio de expresión de ARNm se calculó utilizando el método estándar  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Todos los datos se normalizaron con respecto al gen de referencia y se expresaron como un cambio relativo a este control.

Se utilizaron cebadores para evaluar la expresión génica de citoquinas pro y antiinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10), de genes relacionados con el inflammasoma (NLRP3, ASC, CASP1, IL-18), quimiotaxis de monocitos (CCR2, CCL2, CCR1, CCR5, CX3CR1) y marcadores de polarización de monocitos y microglía BV-2 (CCR7, iNOS, MRC1, CD200R, ARG1, YM1), así como cebadores para la HPRT (Hipoxantina Fosforribosiltransferasa) y GAPDH (Gliceraldehído 3-fosfatodeshidrogenasa) utilizados como genes de referencia o housekeeping (Eurofins Genomics, Luxemburgo). Las secuencias de estos oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 9**.

### **Cuantificación extracelular de citoquinas**

Los niveles de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo se determinaron mediante un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), siguiendo las indicaciones del fabricante (Diacclone, Besançon, Francia). Las concentraciones de estas citoquinas se expresaron en pg/mL, calculadas a partir de las curvas de calibración de la dilución en serie de estándares recombinantes de humano y ratón en cada ensayo.

**Tabla 9.** Secuencias de cebadores para los genes de estudio.

Gen	Accession Number	Foward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
h TNF $\alpha$	NM_001270782.1	GTGGGAGCTTCTCACTCTGG	TAGGGCTTTTTCTCCTGCAA
h IL-1 $\beta$	NM_000576	AAGGAGAGCTCTTTCCACC	GCCTCTGGTCTCCTTGGATT
h IL-6	NM_000600	TAACCATCCCTGTCCCAACC	AGTTACATGCCCAGTGGACA
h IL-10	NM_000572	CTGACATCAAGGAGCACGTG	GGCTTTGTAGACACCCCTCT
h NLRP3	NM_004895.5	GTCTGGGTGAGAGTGTGAGC	TCATCGGGGTCAAACAGCAA
h ASC	NM_013258.5	TCTACCTGGAGACCTACGGC	ATAAAGTGCAGGCCTGGCTT
h CASP1	NM_001257119.3	CAAGACCTCTGACAGCACGT	GCAGGCCTGGATGATGATCA
h IL-18	NM_001386420.1	GATAATGCACCCCGGACCAT	CCTCCGGAGTGCAAGTGATT
h CCR2	NM_001123396.1	TGCCTGACTCACACTCAAGG	GGCTTCTCAGCAACTGAACC
h CCL2	NM_002982.3	CCCCAGTCACCTGCTGTTAT	ACGAAGCCATTTGGTAAACG
h CCR1	NM_001295	AATGGGGAACTACTGCTGGC	AGTCCCTCCCTTTATGGCT
h CCR5	NM_000579.4	GTTTGCCTCTCTCCAGGAA	TCCCAGTAGCAGATGACCA
h CX3CR1	NM_001171172.2	TGTATCAGGTGCCATCCCT	AATCAGGGGAGAGGCTGGAT
h CCR7	NM_007719.2	GTGTGCTTCTGCCAAGATGA	CCACGAAGCAGATGACAGAA
h iNOS	NM_000625	ACCCAGACTTACCCCTTTGG	GCCTGGGGTCTAGGAGAGAC
h MRC1	NM_138806	GGCGGTGACCTACAAGTAT	ACGAAGCCATTTGGTAAACG
h CD200R	NM_138940.2	GTTGCCCTCCTATCGCATT	TGGAAATTCCCATCAGGTGT
h HPRT	NM_001289746	ACCCACGAAGTGTGGATA	AAGCAGATGGCCACAGAACT
h GAPDH	NM_001289746	CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG	CCAGCAGTGAGGGGTCTCTCT
m TNF $\alpha$	NM_001278601	AGCCCCAGTCTGTATCCTT	CTCCCTTTCGAGAACTCAGG
m IL-1 $\beta$	NM_008361	GCCCATCCTCTGTGACTCAT	AGGCCACAGGTATTTTGGCG
m IL-6	NM_031168	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TCCACGATTTCCAGAGAAC
m IL-10	NM_010548	CCAAGCCTTATCGGAAATGA	TTTTACAGGGGAGAAATCG
m CCR7	NM_001301713	CCAGGCACGCAACTTTGAG	ACTACCACCACGGCAATGATG
m iNOS	NM_010927	CACCTTGAGTTACCCAGT	ACCACTCGTACTTGGGATGC
m ARG1	NM_007482	GTGAAGAACCACGGTCTGT	CTGGTTGTCAGGGGAGTGTT
m YM1	NM_009892.3	ACTTTGATGGCCTCAACCTG	AATGATTCCTGCTCCTGTGG
m HPRT	NM_013556.2	TATGTCCCCGTTGACTGAT	TGCTCGAGATGTCATGAAGG
m GAPDH	NM_001289726	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

h, humano; m, mouse (ratón)

### **Análisis por citometría de flujo**

Se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de marcadores de monocitos CD14 (APC-Cy7 anti-human CD14, Miltenyi), CD16 (PE antihuman CD16, Miltenyi) y CCR2 (APC anti-human CCR2, Vitro). Se incubaron  $5 \times 10^5$  células con la cantidad de anticuerpos recomendada por el fabricante a temperatura ambiente,



en oscuridad, durante 15 minutos. Para la citometría se utilizó el analizador multiparamétrico de células BD FACSCanto II y se analizó con el software BD FACSDiva (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). En cada muestra se midió la intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células. Los monocitos se clasificaron en 3 subconjuntos: monocitos clásicos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, monocitos intermedios CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> y monocitos no clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. Los niveles de expresión se presentaron como MFI corregido para la unión inespecífica de anticuerpos utilizando un control de isotipo. Así mismo se estudió la expresión de CCR2 en la población completa de monocitos para evaluar la expresión de este mediador de quimiotaxis.

### **Análisis estadístico**

Todos los valores se expresan como media aritmética  $\pm$  desviación estándar (DE). Los datos se evaluaron con el software GraphPad Prism versión 5.01. La significación estadística de cualquier diferencia en cada parámetro entre los grupos se evaluó mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), siguiendo la prueba de comparaciones múltiples de Tukey como prueba post hoc. Los valores de  $p$  inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.





## 4. RESULTADOS

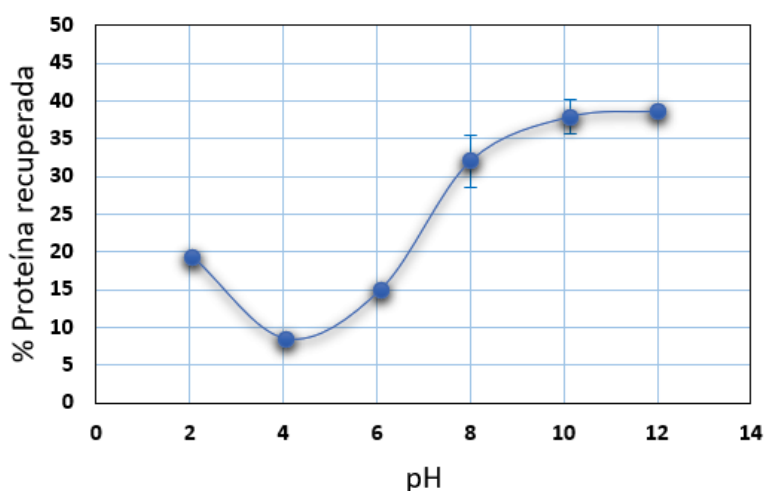


## RESULTADOS

### 1. Caracterización química de productos proteicos de alto valor añadido de kiwicha

#### Obtención del aislado de proteína de kiwicha

Para obtener el aislado proteico de kiwicha a partir del cual obtener los hidrolizados tal y como se describe anteriormente, se determinó el punto isoeléctrico y la solubilidad de las proteínas de kiwicha contenidas en el aislado proteico procedente de la harina desengrasada. Como se observa en la **Figura 7**, el menor porcentaje de proteína solubilizada se cuantificó a un pH de 4, considerándose este, por tanto, el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de kiwicha, siendo utilizado para la optimización del proceso del aislado proteico [68, 210].



**Figura 7.** Curva de solubilidad de las proteínas de kiwicha a distintos pH. Los datos, representados como porcentaje de proteína solubilizada (eje y), son la Media $\pm$ DE de dos determinaciones realizadas a los distintos valores de pH (eje x).

El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH en el que una proteína no posee carga eléctrica y, por lo tanto, se considera neutra. El pI de los péptidos depende en gran medida de la constante de disociación de los grupos ionizables de los aminoácidos, presentes principalmente en arginina, aspartato, cisteína, histidina, lisina y glutamato. Sin embargo, la exposición de los residuos cargados a los solventes, los enlaces de hidrógeno y la deshidratación también influyen en el pI de una proteína. El pI de una proteína es crucial para comprender su función bioquímica y, por lo tanto, determinar este valor es un aspecto esencial de los estudios proteómicos [211].

### **Caracterización química de productos de kiwicha**

La harina de semilla de kiwicha se desengrasó obteniendo HDK con un contenido de proteína de 15,88%. El APK se aisló partiendo de la harina de semilla de kiwicha desengrasada con un 30,87% de rendimiento por extracción básica seguida de precipitación ácida, obteniendo un APK con un 84,52% de proteína. La composición química de los HPK fue similar a la del APK. La principal diferencia entre APK y HPK fue un mayor contenido de cenizas en los hidrolizados debido a la adición de álcali para mantener el pH constante durante la hidrólisis (**Tabla 10**).

**Tabla 10.** Composición química de los productos de kiwicha. Los datos, expresados como porcentaje sobre la base de materia seca, muestran la Media±DE de tres determinaciones.

% Grasa (harina de semilla)		5,73±0,12						
	HDK	APK	HPK5	HPK10	HPK15	HPK30	HPK60	
<b>Proteínas</b>	15,88±0,13	84,52±0,55	80,93±0,57	80,77±0,12	80,30±0,36	76,89±0,01	78,50±0,17	
<b>Humedad</b>	7,01±0,17	0,96±0,10	2,86±0,13	1,59±0,27	1,29±0,09	4,54±0,04	1,93±0,19	
<b>Cenizas</b>	2,18±0,09	1,75±0,05	7,17±0,25	7,54±0,36	8,40±0,16	9,13±0,59	9,31±0,05	
<b>Fibra</b>	10,63±0,16	7,86±0,08	6,58±0,02	7,37±0,09	8,31±0,31	8,09±0,24	8,04±0,18	
<b>Azúcares</b>	1,73±0,22	0,78±0,12	0,37±0,01	0,52±0,06	0,46±0,02	0,30±0,04	0,29±0,02	
<b>Polifenoles</b>	0,01±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	
<b>Otros<sup>1</sup></b>	62,56	4,1	2,05	2,16	1,2	1,01	1,89	
<b>Digestibilidad proteica In vitro<sup>2</sup></b>	60,74±0,04	77,97±2,93	79,18±0,66	67,00±3,23	69,58±0,63	71,74±1,66	73,28±0,51	

1: Otros: 100- (proteínas + humedad + cenizas + fibra + azúcar + polifenoles)

2: gramos de proteína digerida/100 g de proteína

### Composición en aminoácidos de los productos de kiwicha

El perfil de aminoácidos podría influir en la actividad peptídica de los productos de kiwicha. Por lo tanto, se analizó el perfil de aminoácidos en HDK, APK y los cinco HPK (**Tabla 11**). Todos estos productos tenían perfiles de aminoácidos similares y se identificaron como una gran fuente de aminoácidos esenciales. En resumen, los productos de kiwicha eran ricos en aminoácidos cargados negativamente como ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu), y también ricos en arginina (Arg).

**Tabla 11.** Composición de aminoácidos de los productos de kiwicha. Los datos, expresados como porcentaje de aminoácidos sobre el contenido total de aminoácidos, son la Media±DE (n=3).

AA (mg/g prot)	HDK	APK	HPK5	HPK10	HPK15	HPK30	HPK60	FAO <sup>1,2</sup>
<b>Aminoácidos esenciales</b>								
<b>His</b>	24,3±0,0	27,6±0,0	30,8±0,1	30,8±0,1	31,2±0,1	31,1±0,0	31,5±0,0	15
<b>Ile</b>	30,8±0,3	43,8±0,0	42,7±0,1	44,6±0,1	44,9±0,2	44,9±0,2	45,2±0,1	30
<b>Leu</b>	61,2±0,0	72,±0,1	71,9±0,2	73,9±0,1	74±0,1	74,3±0,1	75,6±0,0	59
<b>Lys</b>	62,3±0,1	53,1±0,1	55±0,1	55,2±0,1	55±0,1	55±0,0	55,9±0,0	45
<b>Met+Cys</b>	32,5±0,1	34,6±0,1	28,2±0,1	35,7±0,1	34,5±0,1	37,1±0,1	36,6±0,1	22
<b>Met</b>	13,1±0,1	20,9±0,2	13,3±0,1	21,5±0,1	20±0,2	22,7±0,2	20,5±0,2	
<b>Cys</b>	19,4±0,1	13,7±0,0	14,9±0,1	14,2±0,1	14,5±0,1	14,4±0,1	15,1±0,1	
<b>Phe+Tyr</b>	77,9±0,1	92,6±0,1	93,1±0,2	94,8±0,1	93,7±0,1	95,5±0,0	95,4±0,2	38
<b>Thr</b>	39,8±0,1	41±0,0	42,9±0,1	43,1±0,1	43±0,0	43±0,0	43,7±0,0	23
<b>Trp</b>	9,2±0,0	11,5±0,0	16,7±0,0	16±0,0	15,2±0,0	12,6±0,1	8,7±0,0	60
<b>Val</b>	35,3±0,3	46,1±0,1	45,2±0,2	47,4±0,1	48,1±0,2	47,3±0,2	48,2±0,2	39
<b>Total</b>	405,8	456,9	454,7	477,2	474,1	477,9	476,4	
<b>Aminoácidos no esenciales</b>								
<b>Asp+Asn</b>	94,3±0,4	92,6±0,2	99,7±0,2	97,7±0,2	97,1±0,1	96,8±0,0	98,3±0,0	
<b>Glu+Gln</b>	183±0,6	155,1±0,1	168,4±0,3	163,3±0,4	162,4±0,2	160,8±0,0	162,7±0,1	
<b>Ser</b>	79,1±0,4	55,4±0,1	60,3±0,1	59±0,1	58,5±0,1	58,4±0,1	59,4±0,1	
<b>Gly</b>	83,1±0,4	49,3±0,1	52,8±0,1	51,6±0,1	52,5±0,1	51,4±0,0	53 ±0,1	
<b>Arg</b>	87,3±0,2	89,4±0,1	95,2±0,2	94,2±0,2	93,8±0,1	93,7±0,1	94,8±0,1	
<b>Ala</b>	41,4±0,2	41,1±0,0	43±0,1	43,1±0,1	43,3±0,1	43±0,0	43,6±0,0	
<b>Pro</b>	58,5±0,7	94,9±0,6	54,4±1,9	49,7±1,4	52,7±0,5	54,8±0,6	48,3±1,0	
<b>Tyr</b>	34,9±0,1	40,8±0,2	41±0,2	41,5±0,1	40,4±0,2	42,3±0,0	41,1±0,3	

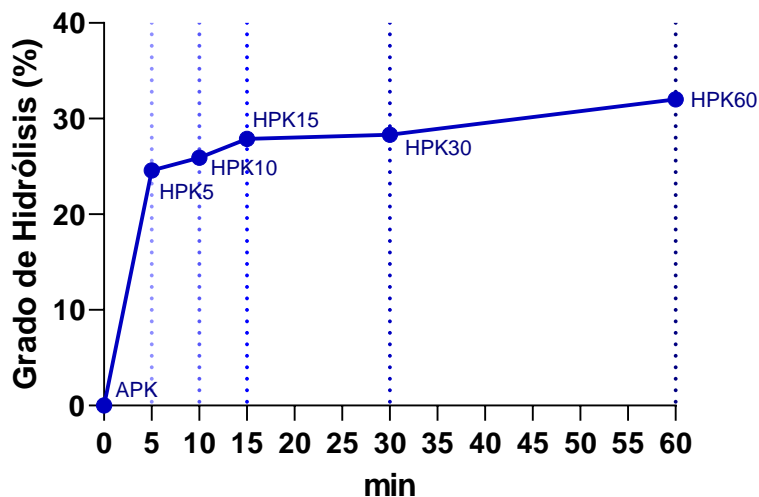
1 FAO/OMS/UNU. Patrón de puntuación mg/g de las necesidades de proteínas en adultos.

2 FAO y FINUT, 2017. Evaluación de la calidad de las proteínas alimentarias en la nutrición humana. Documento de alimentación y nutrición de la FAO NO. 92.



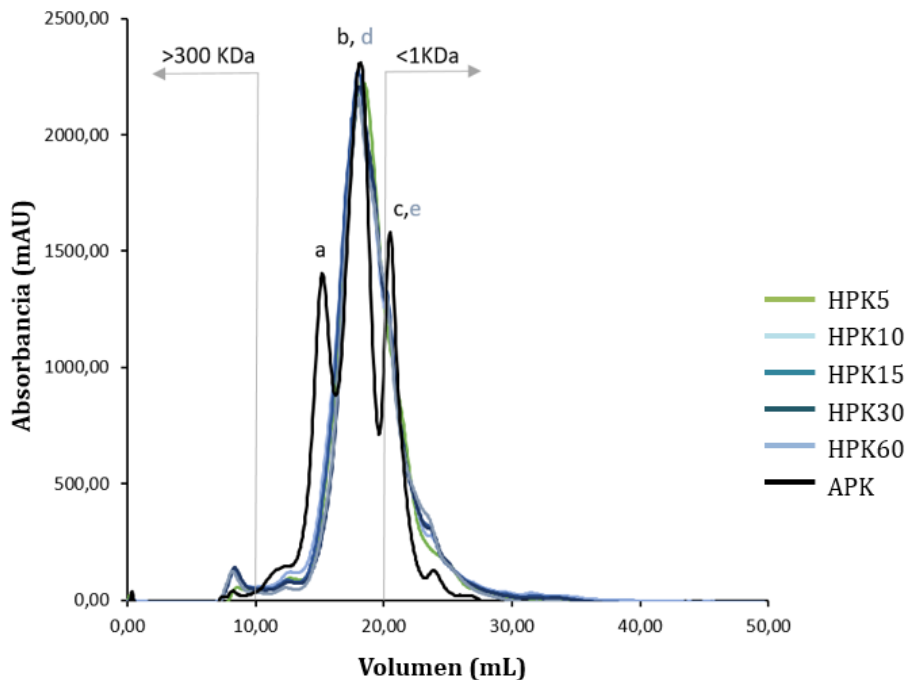
## Grado de hidrólisis y perfil molecular de los productos de kiwicha

El grado de hidrólisis puede utilizarse como una indicación de la longitud de la cadena del péptido resultante; un valor alto indica longitudes medias más cortas, mientras que un valor bajo indica longitudes medias más largas. La hidrólisis extensiva de APK se realizó en la forma que se muestra en la **Figura 8**. El APK se hidrolizó durante 1 hora con Bioproteasa. La velocidad de hidrólisis fue rápida durante los primeros 5 minutos de hidrólisis y aumentó más lentamente en los siguientes 55 minutos, hasta alcanzar un 32,02% de grado de hidrólisis final.



**Figura 8.** Evolución temporal del grado de hidrólisis del APK durante la hidrólisis enzimática con Bioproteasa a 5 (HPK5), 10 (HPK10), 15 (HPK15), 30 (HPK30) y 60 (HPK60) minutos. Los datos, expresados como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos (eje y), son la Media de las tres determinaciones realizadas a cada tiempo (eje x).

Como se muestra a continuación, en la **Figura 9**, los perfiles de pesos moleculares de los péptidos obtenidos en los productos de kiwicha fueron evaluados por FPLC. En el perfil molecular de proteínas de los HPK se observó que el tamaño de los péptidos era de alrededor de 3,11-0,16 kDa (picos d y e respectivamente). Este resultado mostró que la hidrólisis enzimática usando Bioproteasa redujo significativamente el peso molecular de la proteína de APK (15,95 kDa, pico a).



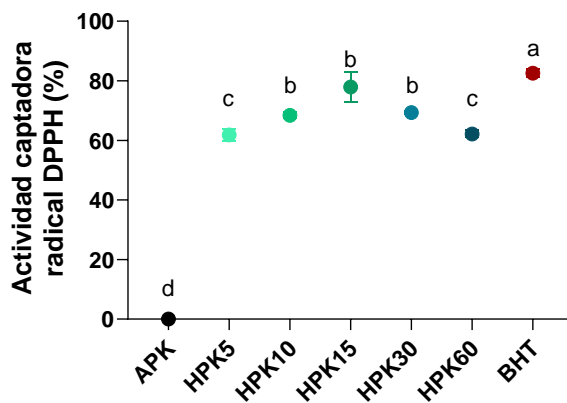
**Figura 9.** Perfiles de peso molecular por FPLC de exclusión por tamaño de APK, HPK5, HPK10, HPK15, HPK30 y HPK60. El rango total de pesos moleculares abarca de 1 hasta 300 kDa.

## **Evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante de los hidrolizados de kiwicha**

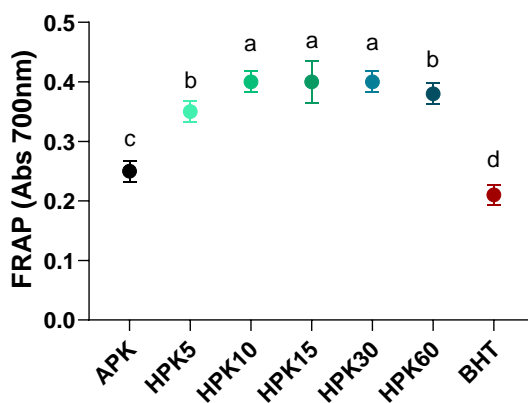
Se evaluó la actividad antioxidante potencial del APK y los cinco HPKs (**Figura 10**) en experimentos *in vitro*. Los radicales DPPH se han utilizado ampliamente para investigar la actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas. Como se muestra en la **Figura 10A**, todos los HPKs estudiados mostraron actividad captadora de radicales DPPH. Además, todos los hidrolizados mostraron significativamente mayor actividad que el APK ( $p < 0,001$ ), por lo que se puede concluir que la hidrólisis generó péptidos que podrían reaccionar frente a radicales libres para convertirlos en productos más estables. La hidrólisis con Bioproteasa mejoró el efecto de eliminación de DPPH entre un 61,86 y un 77,91%, obteniéndose los mayores valores con los hidrolizados HPK15 (77,91%) y HPK30 (69,36%).

La evaluación del poder antioxidante mediante reducción del hierro se utilizó para encontrar una correlación directa entre la actividad antioxidante y el potencial de donación de electrones de los compuestos bioactivos del APK y los HPKs. Los resultados (**Figura 10B**) mostraron que con los HPKs se obtuvieron valores significativamente más altos en comparación con el APK ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ), al igual que ocurría en el caso de la actividad captadora de radicales DPPH, obteniéndose los mayores valores con los hidrolizados HPK10, HPK15 y HPK30, por lo que se puede concluir que la hidrólisis generó péptidos con mayor poder reductor del hierro.

**A.**



**B.**



**Figura 10.** Actividad captadora de radicales DPPH (A) y poder antioxidante reductor férrico (FRAP) (B) por APK y HPKs obtenidos usando Bioproteasa en experimentos *in vitro*. Los valores se presentan como Medias $\pm$ DE (n=3). Las diferencias estadísticas se marcan con letras diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 2. Evaluación de las propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados proteicos de kiwicha a nivel intestinal

Tras analizar los resultados anteriores, considerando el grado de hidrólisis, el tiempo de la misma y la actividad antioxidante de los hidrolizados, se seleccionaron dos de ellos para continuar con los siguientes ensayos. Los HPK seleccionados fueron HPK15 y HPK30. Como primera aproximación, para evaluar los efectos citotóxicos de los productos de kiwicha sobre la viabilidad de las células Caco-2, estas fueron tratadas con APK, HPK15 y HPK30 hasta 200µg/mL durante 24 h. La viabilidad celular evaluada por el método MTT no se vio afectada por ninguna de las concentraciones seleccionadas de los productos de kiwicha (datos no mostrados).

Con el fin de evaluar las propiedades antiinflamatorias de los HPKs a nivel intestinal, se midió en primer lugar, la expresión génica de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 mediante qRT-PCR en células Caco-2, utilizando LPS como estímulo proinflamatorio, y como tratamiento, los dos hidrolizados seleccionados (HPK15 y HPK30) a 50 y 100µg/mL durante 24h.

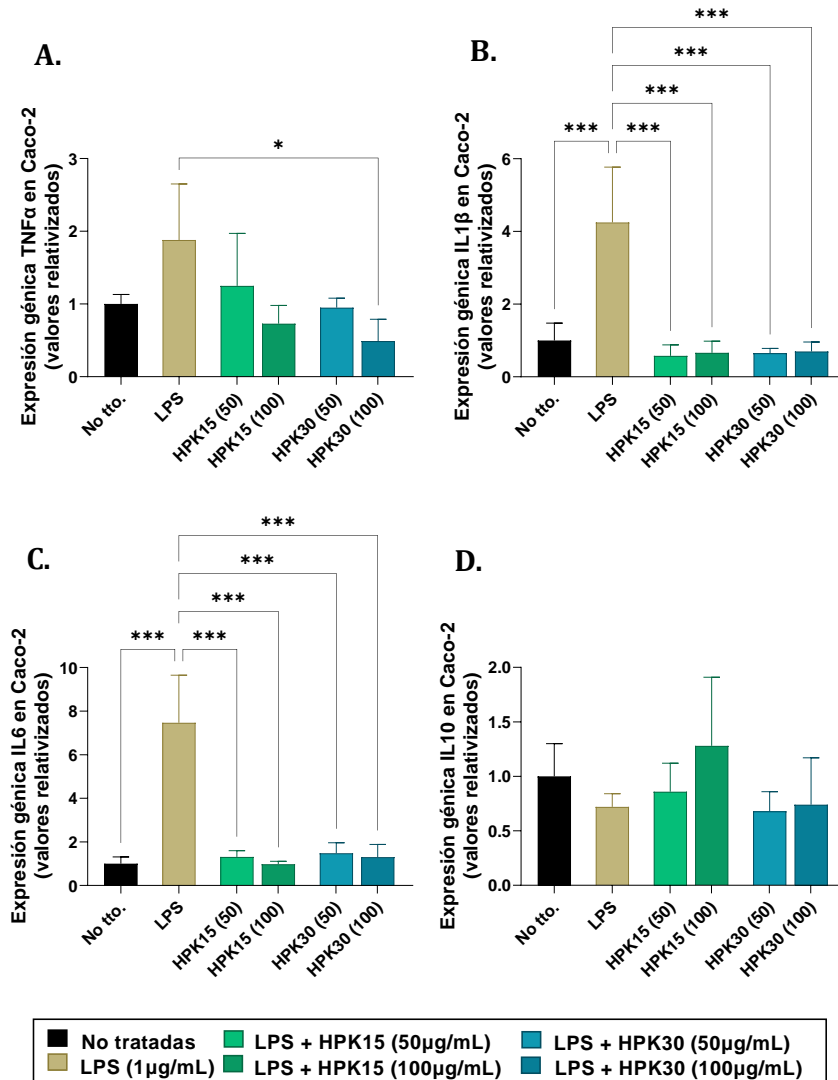
En cuanto a la expresión de TNF $\alpha$ , como puede observarse en la **Figura 11A**, el LPS mostró una tendencia al aumento de los niveles de ARNm de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento con HPK30 a 100µg/mL contrarrestó significativamente ( $p < 0,05$ ) los cambios inducidos por LPS, bloqueando el aumento de expresión de TNF $\alpha$ . En este caso, no se observaron efectos significativos del tratamiento con HPK15 a 50 y 100µg/mL, ni del HPK30 a 50 µg/mL, aunque si una tendencia a la disminución de los niveles de expresión de TNF $\alpha$ .

Por otro lado, en el caso de la IL-1 $\beta$ , **Figura 11B**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de expresión génica de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento con HPK15 y HPK30 tanto a 50 como a 100 $\mu$ g/mL contrarrestó significativamente ( $p < 0,001$ ) el aumento inducido por LPS, disminuyendo la expresión génica de IL-1 $\beta$ . Por tanto, en este caso, el tratamiento con ambos hidrolizados a las dos concentraciones testadas mostró efectos en los niveles de IL-1 $\beta$ , disminuyendo significativamente la expresión de esta citoquina proinflamatoria inducida por LPS.

En cuanto a la expresión génica de IL-6, se observaron unos efectos similares a los anteriormente descritos para la IL-1 $\beta$ . Como puede observarse en la **Figura 11C**, el LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de expresión génica de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento tanto con HPK15 y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL contrarrestó este aumento inducido por LPS, disminuyendo muy significativamente ( $p < 0,001$ ) la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-6. Por tanto, al igual que ocurría en el caso anterior, el tratamiento con los dos hidrolizados, a ambas concentraciones, mostraron un efecto antiinflamatorio al disminuir significativamente la expresión de IL-6 inducida por LPS.

Sin embargo, en el caso de los niveles de expresión génica de la citoquina antiinflamatoria IL-10, **Figura 11D**, no se observaron cambios estadísticamente significativos ni con la exposición a LPS con respecto al control negativo sin tratar, ni con ninguno de los tratamientos ensayados. Por tanto, ni HPK15 ni HPK30, a 50 y

100µg/mL, parecen tener efectos sobre la expresión génica de IL-10 en este modelo celular.



**Figura 11.** Expresión génica de TNFα (A), IL-1β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en células Caco-2 tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

En segundo lugar, para evaluar no solo la expresión génica de estas citoquinas, sino también como influían los hidrolizados de kiwicha seleccionados en su expresión y secreción proteica, se midieron los niveles de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 en el medio, es decir, fueron determinadas mediante ELISA en los sobrenadantes de los cultivos de las células Caco-2. De forma similar, se utilizó LPS como estímulo proinflamatorio, y como tratamiento HPK15 y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL durante 24h.

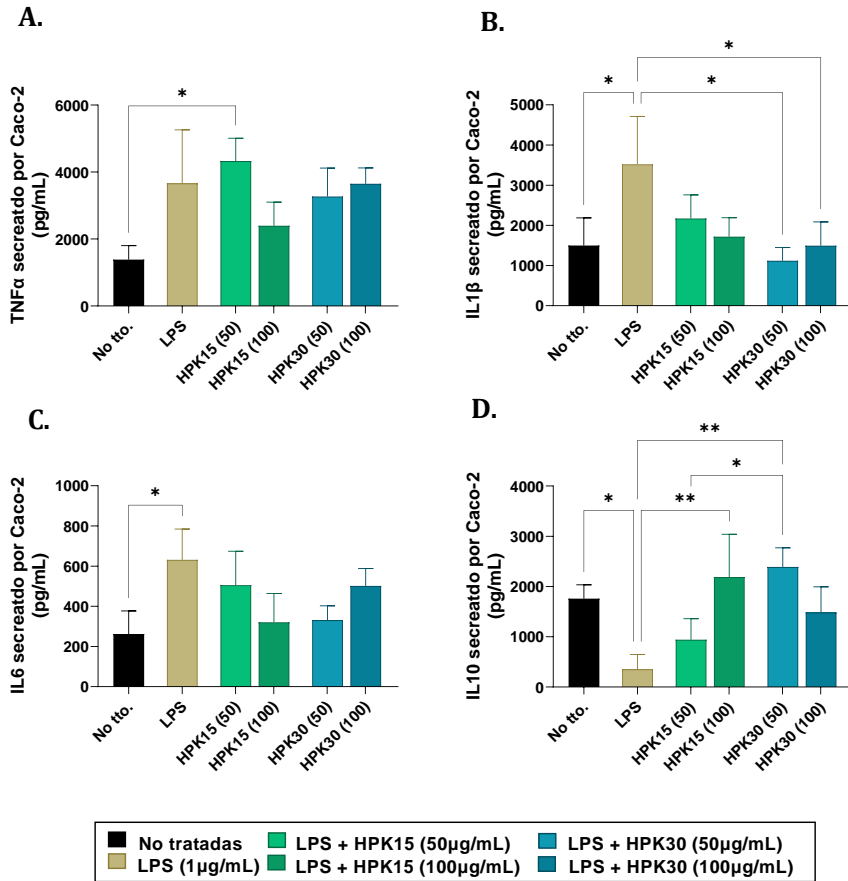
En el caso de los niveles de TNF $\alpha$ , **Figura 12A**, el LPS mostró una tendencia al aumento de la secreción de esta citoquina con respecto al control no tratado, de forma similar a lo observado con respecto a su expresión génica. Curiosamente, el tratamiento con HPK15 a 50 $\mu$ g/mL provocó un aumento similar al provocado por el LPS, pero en este caso si fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en comparación con el control no tratado. Sin embargo, no se observaron efectos significativos en la secreción de TNF $\alpha$  con el tratamiento de este HPK15 a 100 $\mu$ g/mL, ni del HPK30 a 50 o 100 $\mu$ g/mL.

En cuanto a la secreción de la IL-1 $\beta$ , **Figura 12B**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento HPK30 tanto a 50 como a 100 $\mu$ g/mL contrarrestó significativamente ( $p < 0,05$ ) este aumento inducido por LPS, disminuyendo los niveles de IL-1 $\beta$ . En el caso de HPK15 a 50 y 100 $\mu$ g/mL no se observaron cambios significativos, pero si una tendencia a disminuir la secreción al sobrenadante de esta citoquina proinflamatoria.



Al evaluar los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6 en los sobrenadantes, **Figura 12C**, únicamente se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) provocado por el LPS respecto al control no tratado, mientras que, tanto en el caso del tratamiento con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no se observaron cambios significativos en la secreción de IL-6, aunque si una tendencia a disminuir sus niveles.

Por último, en el caso de la citoquina antiinflamatoria IL-10, **Figura 12D**, el LPS provocó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de los niveles de secreción de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento con HPK15 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y HPK30 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contrarrestaron esta disminución inducida por LPS, aumentando significativamente ( $p < 0,01$ ) los niveles de IL-10. Por tanto, el tratamiento con ambos hidrolizados mostró un efecto antiinflamatorio a través de esta citoquina.



**Figura 12.** Niveles de TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en sobrenadantes de cultivos de células Caco-2 tras 24h de incubación con LPS (1 $\mu$ g/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL. Los valores se muestran pg/mL y se presentan como Medias $\pm$ DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

A continuación, con el fin de completar la evaluación de la potencial modulación inflamatoria de los HPK, se examinó también la expresión génica tanto de componentes del inflamasoma, NLRP3 y ASC, como de moléculas cuya expresión o funcionalidad está regulada por la activación de este inflamasoma, en este caso, Caspasa-1 e IL-18.

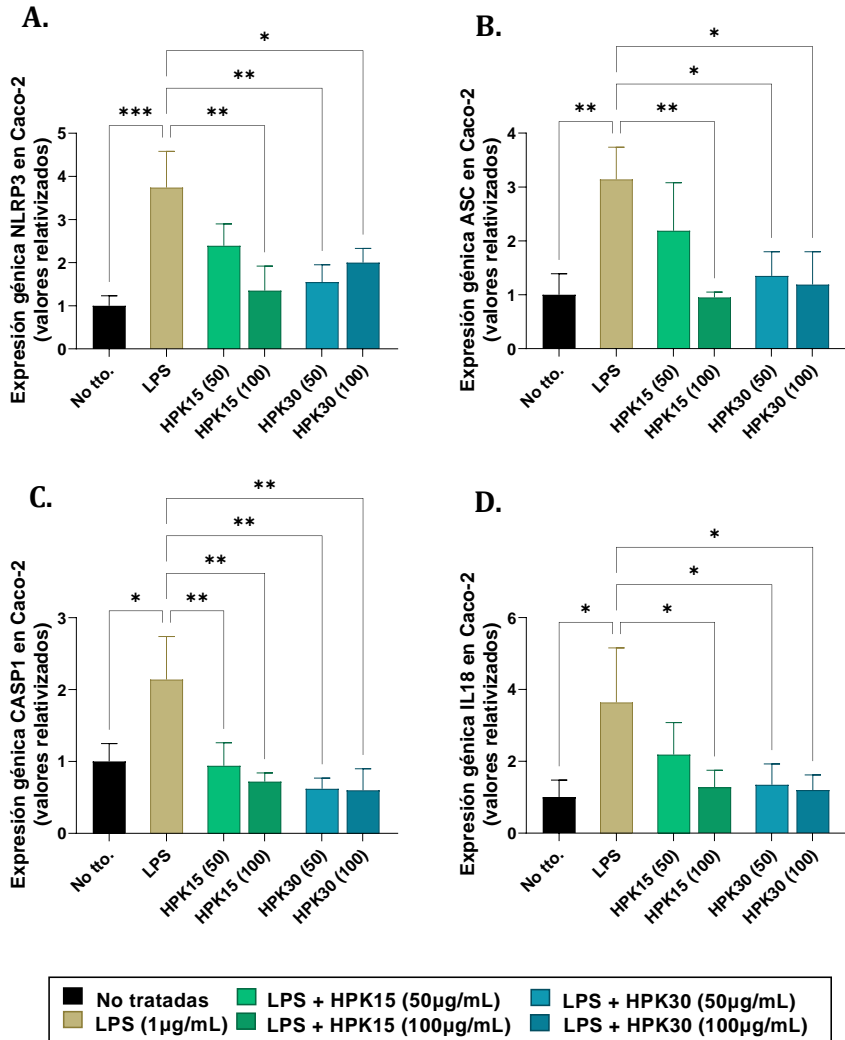
En cuanto a la expresión de NLRP3, como puede observarse en la **Figura 13A**, la exposición a LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de la expresión de su ARNm con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento tanto con HPK15 a  $100\mu\text{g/mL}$  como con HPK30 a  $50\mu\text{g/mL}$  contrarrestaron significativamente ( $p < 0,01$ ) este cambio inducido por LPS. De forma similar, el tratamiento con HPK30 a  $100\mu\text{g/mL}$ , también contrarrestó significativamente ( $p < 0,05$ ) este aumento, bloqueando por tanto ambos hidrolizados el aumento de expresión de NLRP3.

En el caso del otro componente del inflamasoma estudiado, el ASC, **Figura 13B**, la exposición a LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la expresión de su ARNm con respecto al control no tratado. Sin embargo, tratamiento tanto con HPK15 a  $100\mu\text{g/mL}$  contrarrestó significativamente ( $p < 0,01$ ) este aumento. En el caso del HPK30, tanto a 50 como a  $100\mu\text{g/mL}$ , también contrarrestó significativamente ( $p < 0,05$ ) el cambio inducido por LPS. Por tanto, de forma similar a lo que se observó para NLRP3, ambos hidrolizados regularon el aumento de expresión de ASC.

Para evaluar los efectos de la modulación de este inflamasoma, se determinaron los niveles de Caspasa-1 y IL-18. En el caso de la Caspasa-1, **Figura 13C**, como era de esperar dados los

resultados en NLRP3 y ASC, la exposición a LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la expresión de Caspasa-1 con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento tanto con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contrarrestaron significativamente ( $p < 0,01$ ) este aumento.

Para la citoquina proinflamatoria IL-18, **Figura 13D**, de forma similar a la Caspasa-1, la exposición a LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la expresión de su ARNm con respecto al control no tratado. En el caso de los tratamientos con hidrolizados de la kiwicha, tanto con HPK15 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de este aumento de la expresión desencadenada por LPS.



**Figura 13.** Expresión génica de NLRP3 (A), ASC (B), Caspasa-1 (C) e IL-18 (D) en células Caco-2 tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

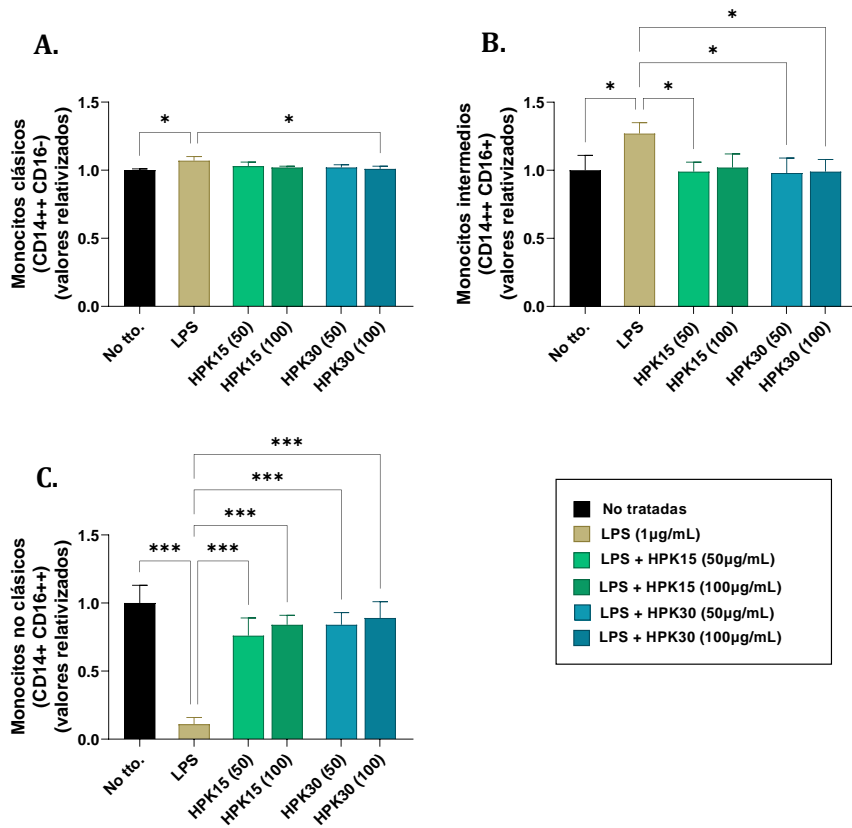
### **3. Evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de los hidrolizados proteicos de kiwicha a nivel de inflamación sistémica**

Una vez observada la capacidad de los HPKs para modular la respuesta inflamatoria en los ensayos con células Caco-2, se utilizaron monocitos como modelo celular específico para estudiar la inflamación *in vitro* más allá de la inflamación intestinal, por su implicación en inmunidad innata y capacidad de polarización hacia fenotipo M1 o M2.

#### **Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha en la quimiotaxis de monocitos**

En primer lugar, se midió mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los monocitos, clasificándolos, en 3 subconjuntos: CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (monocitos clásicos), CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> (monocitos intermedios) y CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> (monocitos no clásicos). Por un lado, se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de monocitos clásicos con respecto al control provocado por LPS, que solo fue contrarrestado, significativamente ( $p < 0,05$ ) en el caso del tratamiento con HPK30 a 100µg/mL (**Figura 14A**). Este aumento significativo ( $p < 0,05$ ) provocado por LPS también se observó para los monocitos intermedios, pero en este caso, tanto el tratamiento con HPK15 a 50µg/mL como con HPK30 a 50 y 100µg/mL, disminuyeron significativamente ( $p < 0,05$ ) este aumento, aproximándolo a valores similares al control (**Figura 14B**).

Sin embargo, para los monocitos no clásicos, se observó un efecto totalmente inverso, provocando el LPS una disminución muy significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto al control no tratado de esta población celular CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, que fue contrarrestada con el tratamiento con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de forma muy significativa ( $p < 0,001$ ). Por tanto, ambos hidrolizados, a las dos concentraciones testadas, produjeron un aumento considerable de los niveles de esta población (**Figura 14C**).



**Figura 14.** Análisis de monocitos clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>(A), monocitos intermedios CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>(B) y monocitos no clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>(C) tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

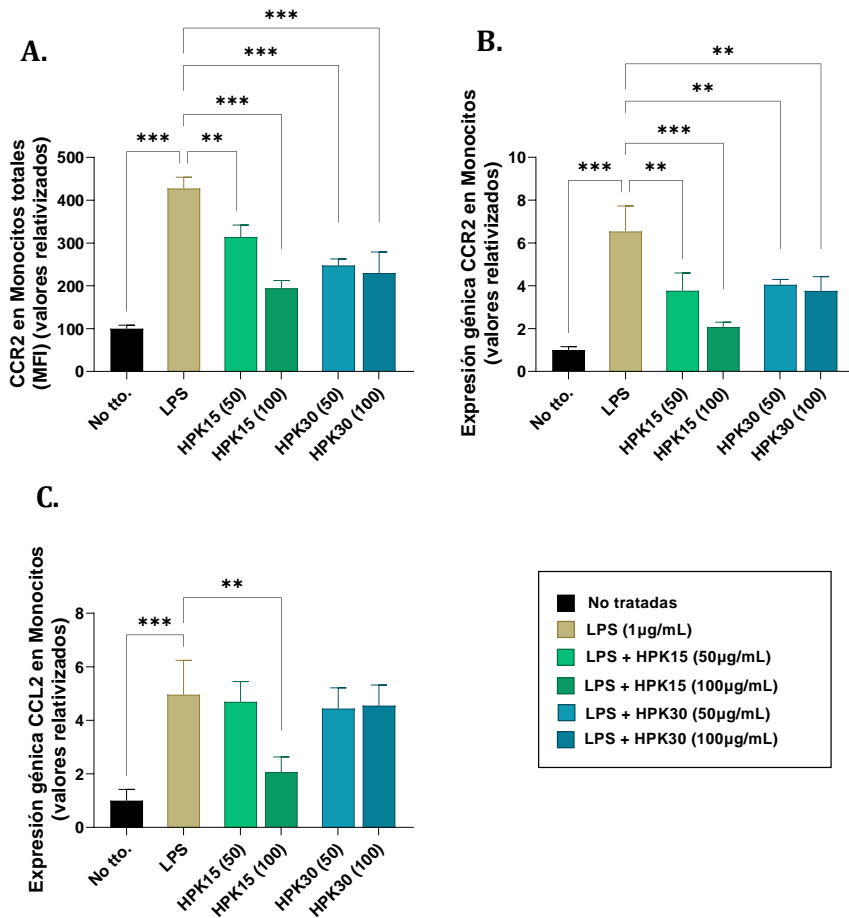


A su vez, se estudió la expresión de CCR2 en la población completa de monocitos como mediador de quimiotaxis tanto por citometría, como a nivel de expresión génica mediante qRT-PCR. De forma similar, también se evaluó la expresión génica de su ligando CCL2.

En el análisis por citometría, se pudo observar como el LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de CCR2 en monocitos, con respecto al control sin tratar, mientras que el tratamiento con HPK15 a  $50\mu\text{g/mL}$  disminuyó significativamente los niveles de CCR2 ( $p < 0,01$ ) y el tratamiento con HPK15 a  $100\mu\text{g/mL}$  y con HPK30 a 50 y  $100\mu\text{g/mL}$  los redujo de forma aún más significativa ( $p < 0,001$ ) (**Figura 15A**).

En cuanto a la expresión génica de esta molécula quimiotáctica, los resultados observados fueron muy similares a los obtenidos por citometría, ya que el LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de la expresión de CCR2 con respecto al control no tratado, que fue contrarrestado con los hidrolizados, puesto que mostraron una disminución significativa de los niveles de expresión génica de CCR2 tanto HPK15 a  $50\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ), como a  $100\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ) y HPK30 a 50 y  $100\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ) (**Figura 15B**).

Para su ligando CCL2, también se dio un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de su expresión génica provocado por LPS, pero en este caso, solo el tratamiento con HPK15 a  $100\mu\text{g/mL}$  consiguió disminuir este aumento de forma significativa ( $p < 0,01$ ) (**Figura 15C**).



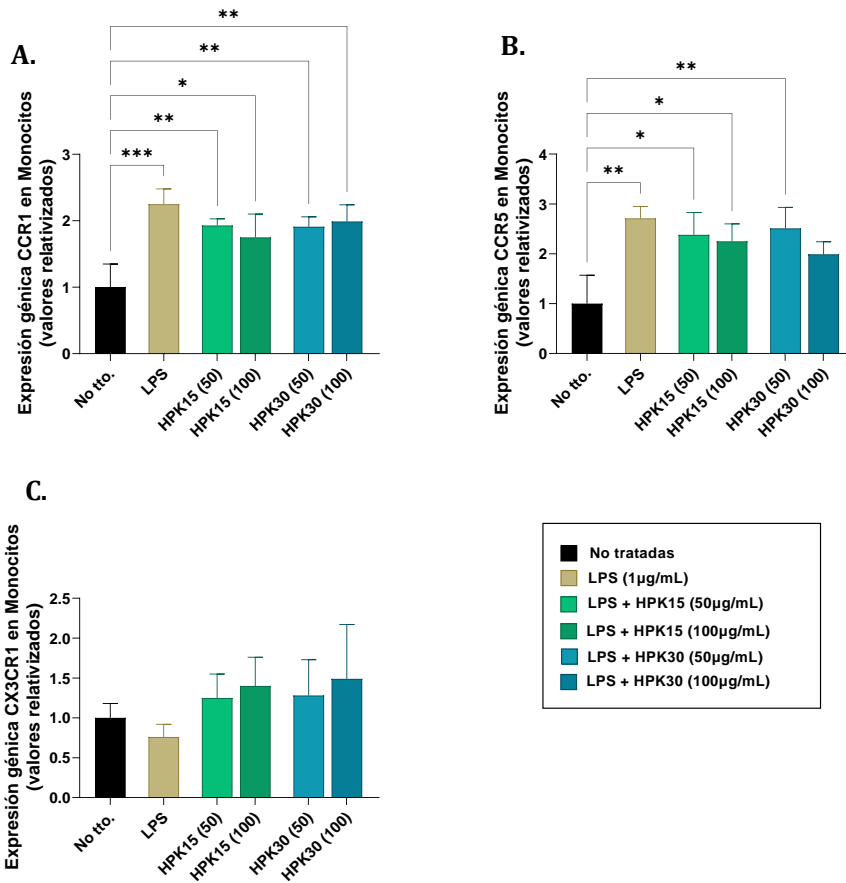
**Figura 15.** Análisis por citometría y qRT-PCR de mediadores de quimiotaxis en monocitos humanos primarios tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. MFI de CCR2 en toda la población de monocitos (A). Expresión génica de CCR2 (B) y CCL2 (C). Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Para completar el estudio sobre la modulación de la quimiotaxis en monocitos, se midió la expresión génica de CCR1, CCR5 y CX3CR1 mediante qRT-PCR.

En cuanto a la expresión de CCR1, como puede observarse en la **Figura 16A**, se produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm con respecto al control no tratado, tanto por la exposición a LPS ( $p < 0,001$ ) como por el tratamiento con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente) y con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$ ).

Para CCR5 se observó un efecto muy similar, **Figura 16B**, obteniendo un aumento significativo de los niveles de expresión génica con respecto al control no tratado, tanto por la exposición a LPS ( $p < 0,01$ ) como por el tratamiento en este caso con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,05$ ) y con HPK30 a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$ ).

En el caso de CX3CR1 no se observaron efectos significativos con respecto al control no tratado, ni para la exposición a LPS ni para los distintos tratamientos (**Figura 16C**).



**Figura 16.** Expresión génica de CCR1 (A), CCR5 (B) y CX3CR1(C) en monocitos tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## **Propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados de proteína de kiwicha en monocitos**

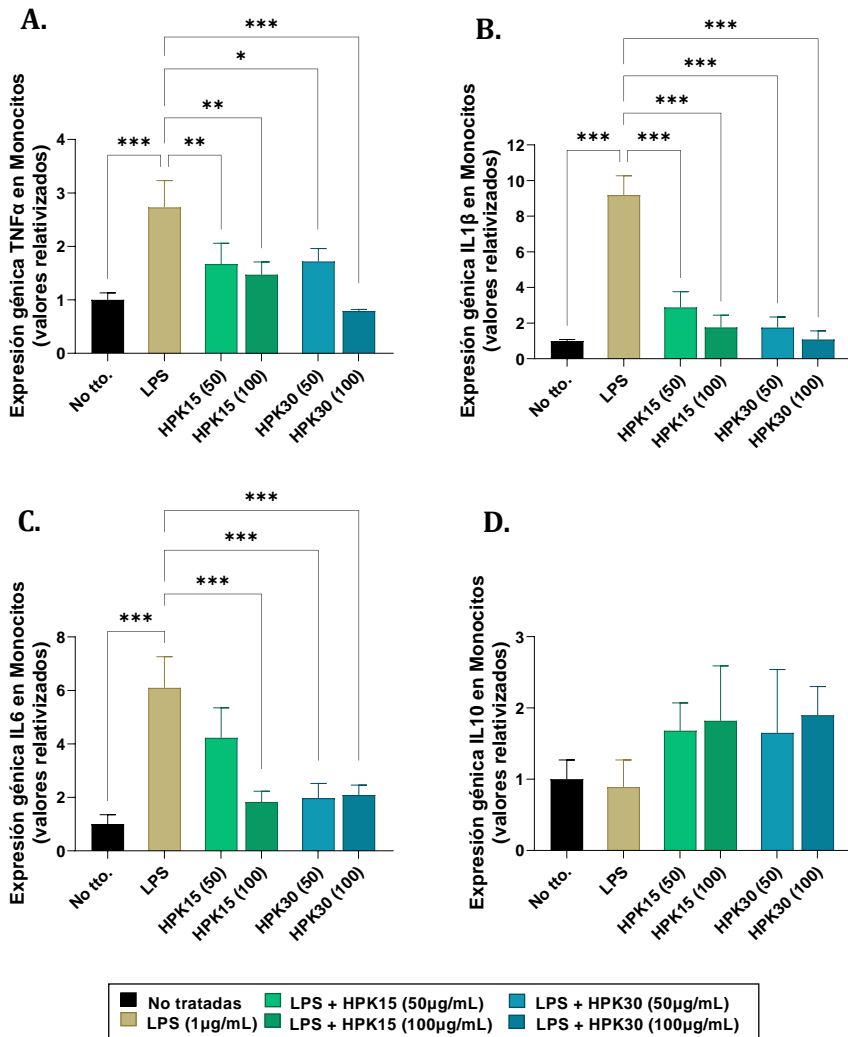
Con el objetivo de evaluar las propiedades antiinflamatorias de los HPKs en monocitos, se evaluó tanto la expresión génica, mediante qRT-PCR, como los niveles de proteína mediante inmunoensayo ELISA, de las citoquinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 en estas células.

En cuanto a la expresión génica de TNF $\alpha$ , como puede observarse en la **Figura 17A**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de ARNm de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que se produjo una disminución significativa de sus niveles de expresión por el tratamiento con HPK15 a 50 y 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,01$ ) y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$  respectivamente).

En el caso de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , **Figura 17B**, el LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de la expresión génica de esta con respecto al control no tratado. A su vez, tanto el tratamiento con HPK15 a 50 y 100 $\mu$ g/mL, como con HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL produjeron una disminución muy significativa ( $p < 0,001$ ) de estos niveles de expresión.

Este aumento tan significativo de la expresión inducida por LPS ( $p < 0,001$ ) con respecto al control no tratado, también se observó para la IL-6, **Figura 17C**, mientras que, en este caso, fueron los tratamientos con HPK15 a 100 $\mu$ g/mL, y con HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL los que produjeron una disminución muy significativa ( $p < 0,001$ ) de los niveles de ARNm de esta citoquina.

Para la citoquina antiinflamatoria IL-10, **Figura 17D**, no se observaron cambios significativos en su expresión génica. Sin embargo, pareció haber una tendencia al aumento en el caso de los tratamientos con los hidrolizados.



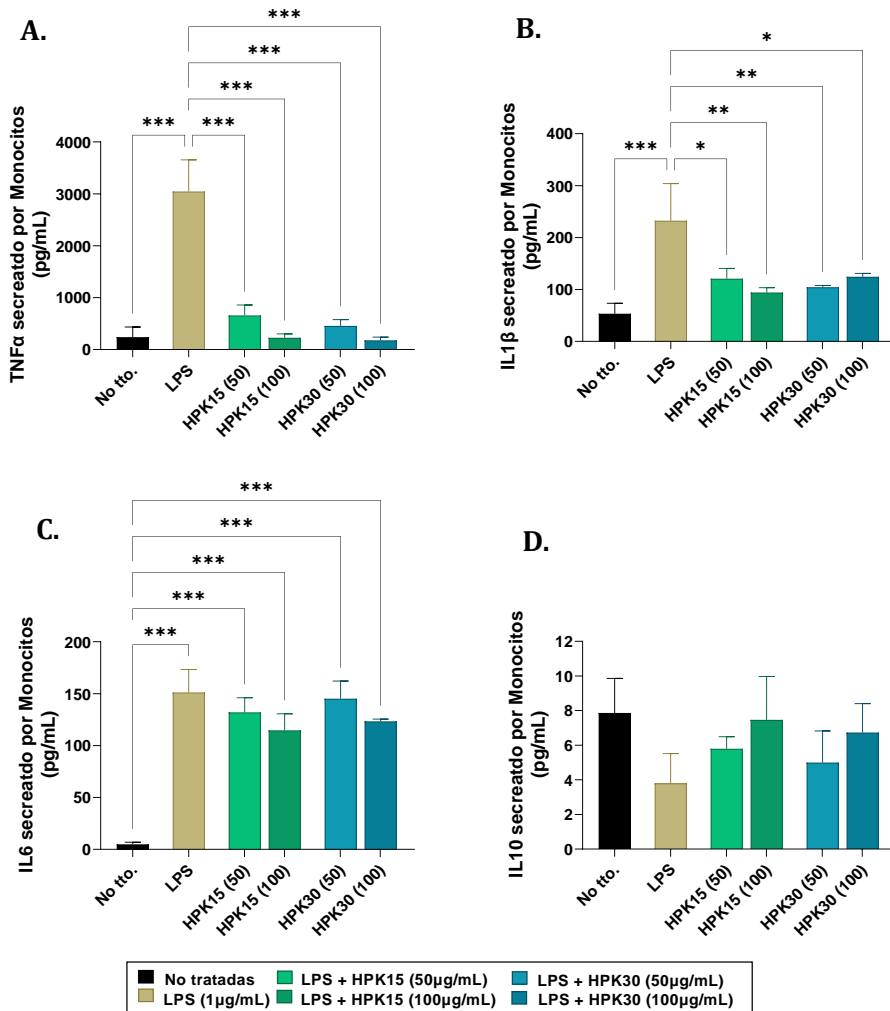
**Figura 17.** Expresión génica de TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en monocitos tras 24h de incubación con LPS (1 $\mu$ g/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias $\pm$ DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).

En el caso de los niveles proteicos de TNF $\alpha$ , **Figura 18A**, el LPS provocó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) de la secreción de esta citoquina con respecto al control no tratado. Mientras que, tanto el tratamiento con HPK15 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , como con HPK30 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  produjeron una disminución muy significativa ( $p < 0,001$ ) de estos niveles de TNF $\alpha$ .

En cuanto a la secreción de la IL-1 $\beta$ , **Figura 18B**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que se produjo una disminución significativa por el tratamiento con HPK15 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente) y con HPK30 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  respectivamente).

Al evaluar los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-6 en los sobrenadantes, **Figura 18C**, se observó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) provocado por el LPS respecto al control no tratado, pero curiosamente, tanto en el caso del tratamiento con HPK15 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  como con HPK30 a 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se observó también, de forma similar, un aumento muy significativo en la secreción de IL-6 ( $p < 0,001$ ).

Por último, en el caso de la citoquina antiinflamatoria IL-10, **Figura 18D**, al igual que ocurría a nivel de expresión génica, no se observaron cambios significativos ni con la exposición a LPS ni con los tratamientos testados. Sin embargo, pareció haber una tendencia similar al aumento de la expresión de IL-10 en el caso de los tratamientos con los hidrolizados.



**Figura 18.** Niveles de TNF $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en sobrenadantes de cultivos de monocitos tras 24h de incubación con LPS (1 $\mu$ g/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL. Los valores se muestran en pg/mL y se presentan como Medias $\pm$ DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01; \*\*\* $p$ <0,001).



## **Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha sobre la polarización de monocitos**

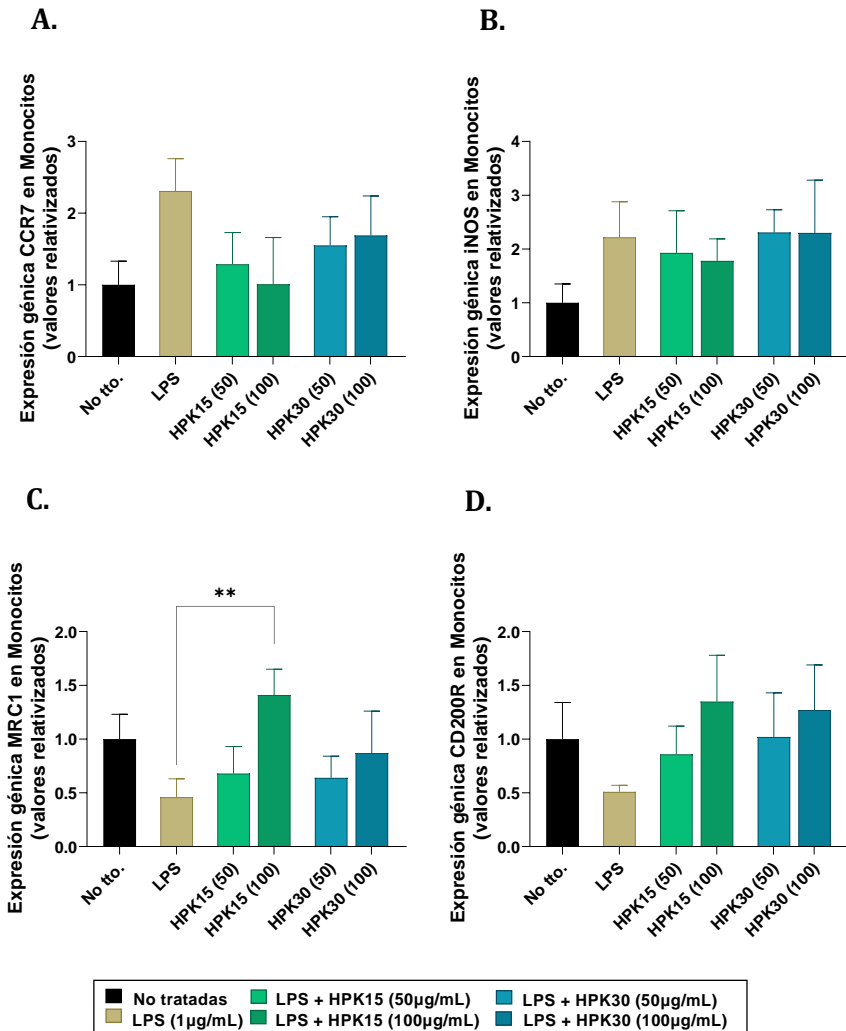
Para completar el estudio en monocitos, se determinó el efecto de los hidrolizados seleccionados sobre la expresión génica de distintos marcadores de polarización hacia fenotipo M1 o M2 como son CCR7 e iNOS, y MRC1 y CD200R respectivamente.

En cuanto a la expresión de CCR7, **Figura 19A**, no se observaron cambios significativos en su expresión génica con respecto al control no tratado, ni tras la exposición a LPS ni con los hidrolizados, aunque se aprecia una tendencia al aumento de expresión con LPS y hacia una disminución de ésta con los distintos tratamientos.

En el caso de iNOS, **Figura 19B**, se observó algo muy similar a lo observado para CCR7, es decir, no se apreció ningún cambio significativo en su expresión génica con respecto al control no tratado, ni tras la exposición a LPS ni con los hidrolizados, y en este caso solo se observó una tendencia al aumento de expresión por efecto del LPS.

Para MCR1, **Figura 19C**, se observó una tendencia a la disminución de su expresión génica con respecto al control no tratado inducida por la exposición a LPS, y se produjo un aumento significativo de su expresión por el tratamiento con HPK15 a 100µg/mL ( $p<0,01$ ), siendo este el único cambio significativo observado en marcadores de polarización de monocitos, ya que para CD200R, **Figura 19D**, aunque se observó la misma tendencia a la disminución de su expresión génica por exposición a LPS con

respecto al control no tratado y una tendencia al aumento por efecto de los hidrolizados, estos cambios no fueron significativos.



**Figura 19.** Expresión génica de CCR7 (A), iNOS (B), MRC1 (C) y CD200R (D) en M1 y M2 tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### **4. Evaluación de las propiedades neuroprotectoras de los hidrolizados proteicos de kiwicha**

Como modelo para estudiar el efecto *in vitro* de los hidrolizados de kiwicha sobre la microglía, se utilizó la línea celular BV-2. En concreto, se buscó evaluar el efecto en neuroinflamación y polarización de la microglía hacia fenotipo M1 o M2, de forma similar a la aproximación llevada a cabo con monocitos. Para ello, se estudió el efecto sobre la expresión génica, mediante qRT-PCR, de las citoquinas pro y antiinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 y de CCR7 e iNOS, y ARG1 y YM1 para evaluar la polarización M1 y M2 respectivamente.

#### **Propiedades antiinflamatorias de los hidrolizados de proteína de kiwicha en microglía**

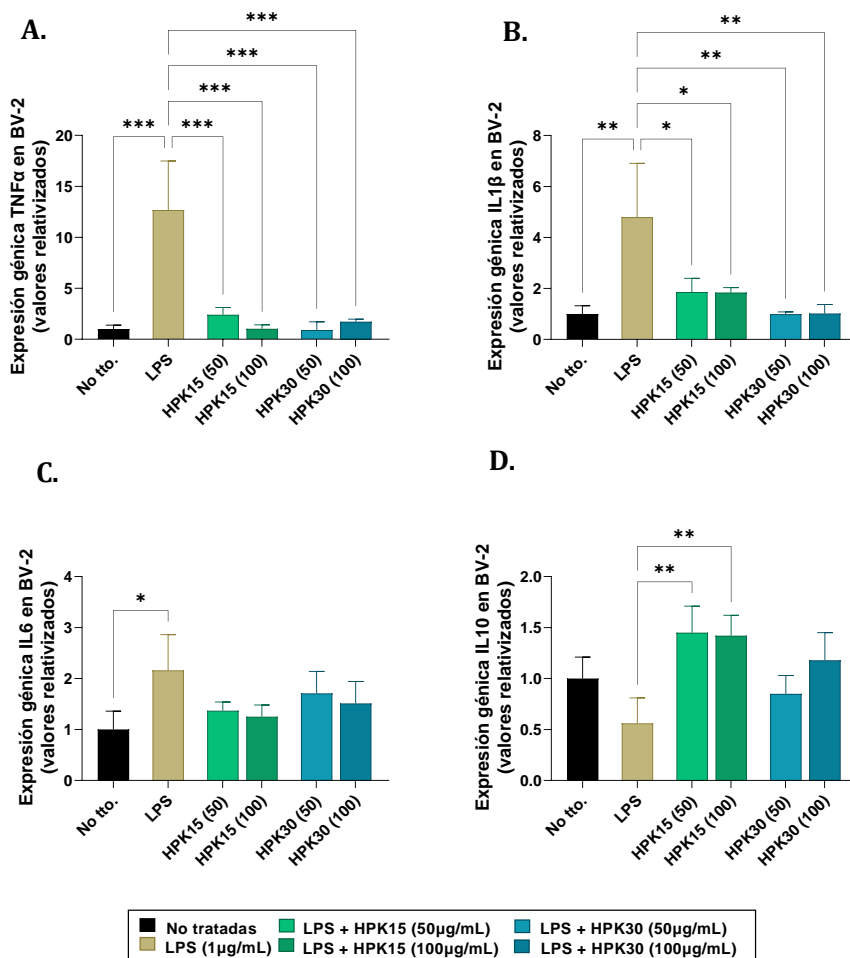
En cuanto a la expresión génica de TNF $\alpha$ , como puede observarse en la **Figura 20A**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de los niveles de ARNm de esta citoquina con respecto al control no tratado, mientras que se produjo una disminución significativa de sus niveles de expresión por el tratamiento tanto con HPK15 a 50 y 100 $\mu$ g/mL, como con HPK30 a 50 y 100 $\mu$ g/mL ( $p < 0,001$ ).

En el caso de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , **Figura 20B**, el LPS provocó un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la expresión génica de esta con respecto al control no tratado. A su vez, se produjo una disminución significativa de estos niveles de expresión tanto

por el tratamiento con HPK15 a 50 y 100µg/mL ( $p<0,05$ ), como con HPK30 a 50 y 100µg/mL ( $p<0,01$ ).

Para la IL-6, **Figura 20C**, se observó un aumento significativo de la expresión inducida por LPS ( $p<0,05$ ) con respecto al control no tratado, pero aunque se observó una tendencia a la disminución, no se produjo ningún efecto significativo sobre la expresión de esta citoquina por los tratamientos con HPK15 o HPK30.

De forma similar a los efectos observados en experimentos anteriores, para la citoquina antiinflamatoria IL-10, **Figura 20D**, aunque el LPS no provocó un cambio significativo de su expresión, se observó una tendencia a la disminución de los niveles de ARNm con respecto al control no tratado, mientras que el tratamiento con HPK15 a 50 y 100µg/mL contrarrestaron esta tendencia inducida por LPS, aumentando significativamente ( $p<0,01$ ) la expresión de IL-10.



**Figura 20.** Expresión génica de TNFα (A), IL-1β (B), IL-6 (C) e IL-10 (D) en células BV-2 tras 24h de incubación con LPS (1 μg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100 μg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias ± DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

## **Propiedades de los hidrolizados de proteína de kiwicha sobre la polarización de microglía**

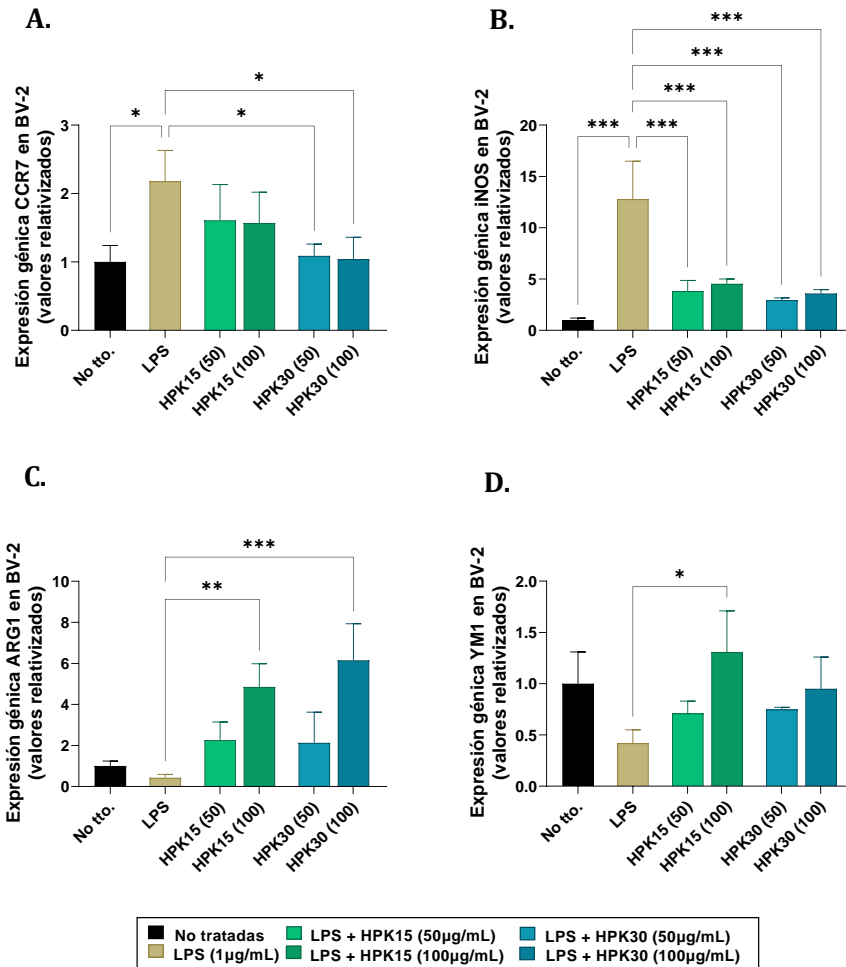
Al igual que se evaluó en monocitos, se determinó el efecto de los hidrolizados seleccionados sobre la expresión génica de distintos marcadores de polarización hacia fenotipo M1 o M2 de la microglía, en este caso de CCR7 e iNOS, y ARG1 y YM1 respectivamente.

En este caso, la expresión génica de CCR7, **Figura 21A**, aumentó significativamente por efecto del LPS con respecto al control no tratado ( $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento tanto con HPK30 a 50 como a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disminuyó significativamente su expresión ( $p < 0,05$ ).

Para iNOS, **Figura 21B**, se observó un aumento muy significativo en su expresión génica con respecto al control no tratado por la exposición a LPS ( $p < 0,001$ ), el cual fue contrarrestado por el tratamiento con los hidrolizados, disminuyendo muy significativamente la expresión de iNOS tanto con HPK15 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,001$ ), como con HPK30 a 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,001$ ).

En el caso de los marcadores de polarización M2 de la microglía, la expresión génica de ARG1, **Figura 21C**, no disminuyó de forma significativa por efecto del LPS con respecto al control no tratado, pero sí se produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm de ARG1 por el tratamiento con HPK15 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,01$ ) y HPK30 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, para YM1, **Figura 21D**, se observó una tendencia a la disminución de su expresión génica por exposición a LPS con respecto al control no tratado, y un

aumento significativo de ésta provocado por el tratamiento con HPK15 a 100µg/mL ( $p<0,05$ ).



**Figura 21.** Expresión génica de CCR7 (A), iNOS (B), ARG1 (C) y YM1 (D) en células BV-2 tras 24h de incubación con LPS (1µg/mL) y HPK15 y HPK30 a 50 y 100µg/mL. Los valores se muestran relativizados al control no tratado y se presentan como Medias±DE (n=3). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ).







## 5. DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La evidencia científica de los últimos años sugiere que la utilidad de las proteínas alimentarias va más allá de sus propiedades como nutrientes, pudiendo modular distintas funciones fisiológicas del organismo. Estas funciones fisiológicas están reguladas principalmente por ciertos péptidos contenidos en las secuencias y estructuras nativas de las proteínas. Estos péptidos bioactivos pueden ejercer propiedades beneficiosas para la salud y, por lo tanto, podrían utilizarse para el desarrollo de nutracéuticos o alimentos funcionales. En las últimas décadas, se ha identificado una amplia gama de secuencias de péptidos bioactivos derivados de alimentos, con múltiples actividades beneficiosas para la salud [139].

La mayoría de los péptidos que se han descrito como bioactivos son oligopéptidos que constan de 2 a 20 aminoácidos que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana. Se han descrito hidrolizados o péptidos de proteínas con actividades inmunomoduladoras a partir de una gran variedad de fuentes alimentarias de origen animal y vegetal como pueden ser leche, huevo, pescado, arroz, soja, guisantes, etc. [181].

En el caso de la kiwicha, como se describe anteriormente en la introducción, se le han atribuido propiedades antioxidantes, cardioprotectoras, antidiabéticas, antitumorales, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas, principalmente por su contenido en compuestos fenólicos, flavonoides, escualeno y algunos péptidos. Sin embargo, la presente tesis, es el primer estudio que se centra en la obtención de péptidos presentes en hidrolizados proteicos de *A.*

*caudatus* y la evaluación de su actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro*, con especial atención a sus efectos locales en tres puntos básicos relacionados con la inmunidad y la inflamación, como son las células Caco-2 como modelo concreto de células epiteliales intestinales humanas, monocitos como modelo celular de inmunidad innata para estudiar la inflamación a nivel sistémico y el modelo de microglía, donde las células BV-2 se utilizan para estudiar específicamente la neuroinflamación.

Además de contener  $\beta$ -caroteno, vitaminas, minerales y fibra dietética, la kiwicha es una fuente rica en proteínas, como se ha observado con la caracterización química de los productos de kiwicha, con valores superiores al 80%.

En cuanto a los perfiles de aminoácidos tanto la Harina Desengrasada de Kiwicha (HDK), como el Aislado Proteico de Kiwicha (APK) y los cinco Hidrolizados Proteicos de Kiwicha (HPK) obtenidos tras la hidrólisis enzimática con Bioproteasa, tienen similitudes con el perfil de aminoácidos descrito en la literatura [157], siendo ricos en aminoácidos cargados negativamente como ácido aspártico (9%), ácido glutámico (15-18%) y arginina (8-9%). También cabe destacar el contenido en lisina (5,5%), aminoácido esencial, limitante en otros alimentos como en los cereales. La importancia de estos aminoácidos radica en que el ácido aspártico (Asp), interviene en la correcta circulación sanguínea, la desintoxicación de toxinas en hígado y riñones y en diferentes etapas del metabolismo celular, el ácido glutámico (Glu) interviene en la neurotransmisión, energía, transporte y absorción de nutrientes. Ambos están involucrados en los mecanismos de

donación de electrones entre especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, la arginina (Arg) participa en distintos procesos como son la regulación de la síntesis de óxido nítrico, regulación del sistema inmune y cicatrización de heridas, liberación de hormona del crecimiento, insulina, glucagón y prolactina. En el caso de la lisina (Lys), es un aminoácido esencial, implicado en distintos procesos biológicos como son el entrecruzamiento de las fibras de colágeno, la absorción y homeostasis del calcio, la producción de carnitina, clave en el metabolismo de los ácidos grasos y está involucrada en las modificaciones de las histonas y, por lo tanto, en epigenética [212].

La mayoría de los péptidos bioactivos descritos hasta la fecha tienen un peso molecular inferior a 1 kDa. La hidrólisis con la Bioproteasa liberó péptidos con un peso molecular que varía entre 0,16 y 3,11 kDa. La interrelación entre los pesos moleculares de los hidrolizados y sus actividades biológicas con aplicación en salud humana es esencial en los alimentos funcionales. Se ha demostrado que la presencia de péptidos de bajo peso molecular mejora la absorción de aminoácidos y su capacidad para tener efectos bioactivos [213]. La actividad biológica de los péptidos está relacionada con la longitud de la secuencia, grado de hidrólisis, composición de aminoácidos, secuencia y conformación [214].

Como se ha indicado anteriormente, este estudio muestra los potenciales efectos beneficiosos de los HPKs obtenidos mediante hidrólisis de proteínas aisladas de harina desengrasada de kiwicha (*A. caudatus*) con la enzima Bioproteasa, sobre el estado oxidativo en sistemas *in vitro* libre de células y sobre el estado inflamatorio e

inmunológico de modelos de barrera intestinal con células Caco-2, modelos de inmunidad innata como son los monocitos y modelos de microglía como es la línea BV-2. En conjunto y de forma generalizada, los HPKs presentaron dos tipos de propiedades, es decir, por un lado, mostraron actividad antioxidante y por otro, modularon la expresión de citoquinas pro y antiinflamatorias hacia un estado antiinflamatorio tanto a nivel del modelo de células Caco-2, como monocitos y BV-2.

Los radicales libres y las especies reactivas del oxígeno son productos del metabolismo celular que en condiciones normales desempeñan funciones vitales en la transducción de señales y la homeostasis. Sin embargo, en situaciones en las que se produce un desequilibrio pro-oxidante puede causar estrés oxidativo, desencadenando una acumulación de estas especies reactivas y provocando daño celular y enfermedades relacionadas con estos como cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos, hipertensión, artritis reumatoide, inflamación, trastornos degenerativos asociados al envejecimiento y diabetes mellitus, entre otros [215]. Por tanto, el consumo de antioxidantes ayudaría a reducir el daño oxidativo *in vivo*, reduciendo así la incidencia de este tipo de enfermedades.

Al igual que ha sido descrito para otros hidrolizados procedentes por ejemplo de proteínas de soja [216], de vísceras de tilapia roja [215], de cáñamo [217] y más recientemente de chía [218], los hidrolizados de kiwicha presentan actividad tanto captadora de radicales DPPH como poder antioxidante reductor férrico, como puede observarse en los resultados obtenidos.

Como se ha descrito anteriormente, se consideraron los resultados obtenidos tanto en la determinación del grado y tiempo de hidrólisis, como de la actividad antioxidante para seleccionar los hidrolizados proteicos HPK15 y HPK30, con la intención, además de centrarnos en los más activos desde un punto de vista biológico, de lograr optimizar el proceso en un futuro escalado de la obtención de estos hidrolizados a nivel de planta piloto, ya que al aumentar el tiempo de hidrólisis a 60 minutos no se observó un aumento significativo del grado de hidrólisis ni presentaba ninguna ventaja adicional, mejorando el coste de producción al disminuir el tiempo de hidrólisis y logrando un proceso más económico y sostenible.

La ausencia de efectos sobre la viabilidad celular tras el tratamiento con los HPKs indica que sus efectos y actividades observadas sobre la producción de citoquinas y otras moléculas no están relacionadas con efectos citotóxicos a ninguna de las dosis probadas.

Una de las aproximaciones más utilizadas para desarrollar estrategias de tratamiento para pacientes con algún tipo de enfermedad inflamatoria intestinal, ha sido intentar bloquear la inducción de mediadores proinflamatorios y el estrés oxidativo para prevenir la disfunción de la barrera epitelial [188]. La desregulación del sistema inmunológico de las mucosas es uno de los principales contribuyentes a la inflamación intestinal. Una vez iniciada la respuesta inmune, tanto las células inmunes innatas como las células epiteliales intestinales producen mediadores proinflamatorios entre los que se incluyen  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , que a su vez desencadenan respuestas inmunes adaptativas exageradas

mediadas por linfocitos T y B [219]. Además de ser un modelo útil para el estudio del transporte intestinal, se han desarrollado modelos que utilizan células Caco-2 para probar los efectos antiinflamatorios de varios compuestos *in vitro* [220], como se ha hecho en este trabajo, donde observamos que los hidrolizados de kiwicha, son capaces de disminuir los niveles de expresión génica de estas tres citoquinas proinflamatorias, TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , tras haber inducido su producción con LPS. Esto sugiere que los hidrolizados obtenidos y seleccionados son capaces de regular la respuesta inmune inflamatoria a nivel intestinal y conseguir estabilizarla, recuperando en la mayoría de los casos niveles de expresión génica muy similares al estado basal representados por el control no tratado. En el caso de la citoquina antiinflamatoria IL-10, y de forma contraria a lo que ocurre para TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , los efectos de estos hidrolizados sobre su expresión se observan a nivel de proteína, aumentando su secreción. Por tanto, ante una situación de inflamación intestinal, estos hidrolizados estarían actuando como reguladores de la respuesta inmune, no solo a nivel de expresión génica, disminuyendo la expresión de citoquinas proinflamatorias, sino también a nivel de producción de proteínas, aumentando la secreción de citoquinas antiinflamatorias.

Por otro lado, se ha propuesto modular la actividad NLRP3 para regular la respuesta inmunitaria innata durante la inflamación intestinal [221]. En condiciones normales, la actividad del inflamasoma NLRP3 está estrictamente regulada para evitar su activación incontrolada, ya que la señalización inadecuada se asocia con diversas patologías autoinmunes y metabólicas, incluida artritis,



obesidad, diabetes tipo 2, enfermedad de Alzheimer y enfermedades inflamatorias intestinales [184, 222].

Por tanto, la regulación de este sistema puede tener un potencial terapéutico en el tratamiento de estas enfermedades a través de la inhibición de NLRP3. Tanto es así, que existen numerosos estudios en los que se fija esta molécula como posible diana terapéutica, utilizando distintos abordajes tanto a nivel de regulación pos-traducciona como pos-transcripcional, así como interviniendo en el ensamblaje del sistema NLRP3-ASC-Caspasa-1 [184]. Dada la íntima asociación entre la desregulación del inflamasoma y distintas enfermedades, desentrañar los complejos mecanismos que subyacen a su activación y regulación, y su importancia para la salud y la enfermedad humanas, suponen actualmente un reto.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran como los hidrolizados obtenidos de la kiwicha son capaces de disminuir de forma significativa los niveles de expresión génica de todo el complejo del inflamasoma en células Caco-2, actuando de forma similar sobre NLRP3, ASC, la Caspasa-1 y la citoquina proinflamatoria IL-18, observándose una disminución a nivel transcripcional de cada una de estas moléculas, aproximando los valores de expresión a los de la condición basal. Estos resultados sugieren que este podría ser otro punto desde el que los hidrolizados permitieran regular la respuesta inmune a nivel intestinal, con la repercusión que esto tendría para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.

Por otro lado, los monocitos representan un buen modelo como primera aproximación para el estudio de las respuestas inmunes, con numerosos estudios que lo avalan [181]. Al igual que ocurre con otras células del sistema inmune, uno de los factores que condicionan la actividad inmunológica de monocitos son las quimioquinas, mediando la inflamación aguda e impulsando su migración hacia tejidos dañados o infectados. Sin embargo, la expresión elevada de estas moléculas y sus receptores puede contribuir a la inflamación crónica [223].

Se han identificado tres poblaciones diferentes de monocitos, conocidas como monocitos clásicos ( $CD14^{++}CD16^{-}$ ), intermedios ( $CD14^{++}CD16^{+}$ ) y no clásicos ( $CD14^{+}CD16^{++}$ ), siendo fenotípica y funcionalmente diferentes. Sin embargo, la función de la población intermedia aún no está bien definida, ya que algunos estudios sugieren que están relacionados con el subconjunto clásico y otros con el subconjunto no clásico. Los monocitos clásicos suponen alrededor del 80 a 95% de los monocitos circulantes, siendo células fagocíticas caracterizadas por la expresión de marcadores proinflamatorios. Los monocitos intermedios comprenden entre el 2 y el 8% del total de monocitos, y entre sus funciones descritas se incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno, presentación de antígenos, participación en la proliferación y estimulación de las células T, respuestas inflamatorias y angiogénesis. Por último, los monocitos no clásicos comprenden aproximadamente del 2 al 11% de los monocitos y se les atribuye la función de revisión del endotelio en busca de lesiones, aunque también se ha descrito que podrían secretar citoquinas

inflamatorias en respuesta a infecciones y participar en la presentación de antígenos y la estimulación de las células T [224].

En este trabajo se observa como los hidrolizados de kiwicha, son capaces de contrarrestar el efecto producido por LPS en los tres subgrupos de monocitos, disminuyendo el aumento en monocitos clásicos e intermedios y aumentando los monocitos no clásicos, tendiendo a normalizar los valores a niveles similares a los del control en los tres casos. Esta última población, los monocitos no clásicos, parecen ser la que se ve más influenciada por el efecto de estos hidrolizados. En conjunto, esto podría significar que al disminuir los monocitos clásicos e intermedios, y con ello disminuir las funciones proinflamatorias que se les atribuyen, y aumentar la población de monocitos no clásicos, los hidrolizados de kiwicha estarían favoreciendo la regulación de la inflamación por parte de este último subtipo celular, ya que se cree que los monocitos no clásicos están involucrados tanto en la resolución de la inflamación como en la homeostasis del endotelio vascular, recorriendo activamente la vasculatura, fagocitando micropartículas y eliminando las células endoteliales dañadas [225].

Los monocitos, las células dendríticas inmaduras y las subpoblaciones de células T tienen una alta expresión de CCR2 que media su migración hacia quimioquinas como CCL2. El eje de señalización CCL2-CCR2 está implicado en muchas enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas como la aterosclerosis, la esclerosis múltiple, el asma, el dolor neuropático, la nefropatía diabética y el cáncer y, por lo tanto, se explora como una diana potencial para el tratamiento de estas enfermedades [226]. En

cuanto a CCR5, también está implicado en el reclutamiento de leucocitos a los lugares de inflamación y en la regulación de su activación, por lo que, al igual que CCR2 y CCL2, representa un factor importante en la respuesta inflamatoria. De hecho, las terapias dirigidas de forma dual a CCR5/CCR2 están surgiendo como una estrategia más eficaz que las que lo hacen de forma individual a cualquiera de estos dos receptores [223].

El receptor CCR1 se expresa en numerosas células del sistema inmune, entre ellas los monocitos, pudiendo unirse a distintas quimioquinas. El papel de CCR1 se ha caracterizado bien para distintas afecciones inflamatorias y está implicado la migración transendotelial, ya que desempeña un papel importante en la adhesión de monocitos/macrófagos y células T al endotelio vascular activado, el paso inicial crítico para la transmigración de leucocitos y al reclutamiento a sitios extravasculares de lesión, habiéndose demostrado esta función en varios modelos de enfermedades inflamatorias [227, 228].

Como otras quimioquinas, el eje CX3CR1-CX3CL1 está implicado en muchos trastornos inflamatorios. Sin embargo, existen conclusiones contradictorias con respecto al efecto de la sobreexpresión o deficiencia de CX3CR1. Por un lado, ha sido descrito que los macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> son los principales responsables de la eliminación de microorganismos patógenos a nivel intestinal y que juegan un papel importante en el control de la inflamación intestinal anormal que puede provocar daño tisular. De hecho, esta función antiinflamatoria de monocitos/macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> depende en gran medida de la IL-10, aunque también

pueden actuar de manera autónoma y/o dependiente de células Treg. En contraposición, también se ha observado que los monocitos CX3CR1<sup>+</sup> que migran hacia el intestino, promueven la activación de células T amplificando la respuesta inflamatoria. Por estas razones, entre otras, se considera que el resultado funcional de los macrófagos CX3CR1<sup>+</sup> va a depender en gran medida del microambiente de citoquinas circundante [229].

Para el conjunto de los receptores de quimioquinas, el presente trabajo muestra como todos los hidrolizados de kiwicha testados estarían dando lugar a una disminución de la expresión del receptor CCR2, tanto a nivel de transcripción como de traducción, y a su vez, en este caso en una de las condiciones ensayadas, también estaría disminuyendo la expresión génica de su ligando CCL2. Sin embargo, para los receptores CCR1 y CCR5, aunque se observe una leve tendencia, la presencia de los hidrolizados en el medio parece no ser suficiente para contrarrestar la sobreexpresión provocada por LPS. Además, en el caso de CX3CR1, se observa una tendencia de los hidrolizados a aumentar los niveles de expresión en monocitos, por encima incluso de los valores basales del control, pero sin llegar a ser significativo. Por todo ello, se podría suponer que el efecto de los hidrolizados a nivel de quimioquinas se vería reflejado principalmente en su acción sobre el eje CCR2/CCL2, apoyando una vez más el efecto regulador de estos en mecanismos de inflamación.

Asimismo, se ha descrito que los monocitos clásicos expresan altos niveles del receptor CCR2 y pueden migrar a sitios de lesión e infección donde se diferencian en macrófagos inflamatorios, que por el contrario, los monocitos no clásicos expresan altos niveles del

receptor relacionado con la adhesión CX3CR1 y exhiben una capacidad única para patrullar la vasculatura en reposo y eliminar los desechos [225]. Estos resultados sobre receptores, sumados a los observados en las distintas poblaciones de monocitos, sugieren que los hidrolizados podrían ejercer sus propiedades antiinflamatorias y de regulación del sistema inmune innato teniendo efecto también a nivel de monocitos, ya que a grandes rasgos se muestra como los hidrolizados de kiwicha disminuyen monocitos clásicos y CCR2/CCL2 y aumentan monocitos no clásicos, así como la tendencia observada al aumento de los niveles de CX3CR1. No obstante, para demostrar esta hipótesis se podrían diseñar nuevos experimentos con los que verificar este efecto de los hidrolizados en los subtipos concretos de monocitos.

Es bien sabido que los monocitos/macrófagos son factores clave durante las respuestas inflamatorias y su fenotipo determina el perfil de secreción de citoquinas, de forma que los macrófagos M1 contribuyen al desarrollo de los procesos inflamatorios y están asociados con la actividad de las células Th1, dando lugar a una producción elevada de citoquinas proinflamatorias, como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , óxido nítrico y ROS. Sin embargo, la activación de macrófagos a fenotipo M2 se desencadena en respuesta a IL-4 o IL-13 y se asocia con remodelación tisular e inmunorregulación, produciendo citoquinas antiinflamatorias como IL-10, asociándose así a procesos antiinflamatorios. Los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  se elevan en situaciones de inflamación crónica y actualmente numerosos estudios evidencian que los péptidos biológicamente activos derivados de las plantas

pueden prevenir muchos de estos trastornos debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios [148], como podría suceder en el caso de los hidrolizados de kiwicha, ya que este trabajo muestra como en presencia de estos, los niveles tanto de TNF $\alpha$  como de IL-6 e IL-1 $\beta$  disminuyen hasta niveles muy similares al estado basal en monocitos y como se tiende al aumento en el caso de la IL-10, lo que apoyaría fehacientemente el efecto antiinflamatorio que se sugiere anteriormente con los primeros datos observados de los hidrolizados sobre en esta población.

Por otro lado, dada esta capacidad de polarización a diferentes fenotipos M1 y M2, y promover a su vez, respuestas proinflamatorias en el caso de macrófagos M1 y respuestas antiinflamatorias en macrófagos M2 [230], observando los resultados obtenidos en el presente trabajo en los que se muestran como hidrolizados de kiwicha son capaces de aumentar significativamente los niveles de expresión génica de MRC1, y una tendencia al aumento en el caso de CD200R, ambos marcadores característicos de monocitos M2 [231], se podría hipotetizar que los hidrolizados estarían dando lugar a un microambiente antiinflamatorio que implicase a su vez la polarización de monocitos/macrófagos hacia fenotipo M2.

Así mismo, dados los resultados observados en monocitos y el paralelismo de sus funciones con la microglía, se pretendió profundizar en los posibles efectos de los hidrolizados no solo sobre la inmunidad a nivel periférico, sino a nivel de neuroinflamación, utilizando la línea BV-2 como modelo bien establecido en numerosos estudios [232].

La microglía es el principal elemento celular con función inmune dentro del sistema nervioso central. La neuroinflamación es un sello distintivo de las enfermedades neurodegenerativas y se considera que la neuroinflamación mediada por microglía juega un papel importante en la patogénesis y progresión de estas enfermedades. Al igual que ocurre con los macrófagos de la periferia, la microglía puede alterar sus fenotipos y funciones en respuesta a cambios del microambiente. Dependiendo del predominio de factores secretados, la microglía se caracteriza por polarizarse hacia fenotipo M1 o proinflamatorio, o hacia fenotipo M2 o antiinflamatorio. A su vez, el estado M1 provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico mientras que el estado M2 provoca la expresión de citoquinas antiinflamatorias, así como arginasa-1 (Arg-1), MRC1 e YM1. Las alteraciones en la polarización de la microglía M1/M2 se han asociado con enfermedades neurodegenerativas, evaluándose como estrategia para el tratamiento de enfermedades relacionadas con inflamación la inhibición de la polarización M1 junto con la estimulación de la polarización de la microglía M2. Sin embargo, la mayoría de los compuestos estudiados muestran capacidad para suprimir la microglía M1, pero muy pocos promueven la polarización hacia el fenotipo M2 [233].

En este trabajo encontramos que los hidrolizados de kiwicha tienen efectos antiinflamatorios significativos al bloquear la expresión génica de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en células microgliales BV-2 tratadas con LPS. Dado el papel de estas citoquinas proinflamatorias sobre el estado de la microglía, estos resultados sugieren que los



hidrolizados proteicos de kiwicha podrían proteger contra la activación proinflamatoria de la microglía. Este efecto inmunomodulador y antiinflamatorio es apoyado por el aumento de la expresión de IL-10 en presencia de los hidrolizados. Además, se ha demostrado que la IL-10 tiene la propiedad de inhibir la liberación o los efectos de citocinas proinflamatorias y promover la supervivencia de las neuronas y la homeostasis neuronal [234].

La microglía M2 está involucrada en la reconstrucción de redes neuronales dañadas mediante la eliminación de agregados tóxicos, la regulación positiva de factores neurotróficos y citoquinas antiinflamatorias y la regulación negativa de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, en situaciones de neuroinflamación, la promoción de la microglía hacia un fenotipo M2 podría proteger al SNC [235]. La presente tesis muestra que los hidrolizados de kiwicha, no solo disminuyen los niveles de expresión génica de los marcadores M1 como son CCR7 e iNOS, sino que además promueven la expresión génica de los marcadores M2 como Arg-1 e YM1 en células BV-2 tratadas con LPS.

En conjunto, los resultados del presente trabajo relativos a las células BV-2, sugieren que los hidrolizados de kiwicha podrían mejorar el estado inflamatorio y la relación de población de células de microglía M1/M2 en condiciones de neuroinflamación, protegiendo así de enfermedades desencadenadas por un estado inflamatorio crónico mediante el manteniendo de la homeostasis del SNC.

Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en demostrar *in vitro* que los hidrolizados de kiwicha obtenidos

presentan propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras, reduciendo las respuestas proinflamatorias y aumentando las respuestas antiinflamatorias en modelos representativos de células epiteliales intestinales, así como de modelos celulares representativos del sistema inmune tanto a nivel periférico innato como a nivel de sistema nervioso central. Por tanto, esta investigación muestra que los hidrolizados de kiwicha pueden representar una opción eficaz en la generación de alimentos funcionales, brindando así nuevas oportunidades para desarrollar productos proteicos de alto valor añadido con *Amaranthus caudatus* como fuente dietética de proteína vegetal.



## 6. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. La optimización del proceso de obtención de un hidrolizado proteico de alto valor, partiendo de harina de kiwicha, dio lugar a un producto final con alto contenido proteico compuesto por péptidos de bajo peso molecular y enriquecido en aminoácidos esenciales y aminoácidos con carga negativa.
2. Los HPKs obtenidos a partir del APK mediante la enzima Bioproteasa LA-660 presentan actividad captadora del radical DPPH y poder antioxidante de reducción del hierro en sistemas *in vitro* libres de células.
3. La administración *in vitro* de los HPKs no presenta efectos citotóxicos.
4. La administración *in vitro* de HPKs disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias, aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias y disminuye la expresión génica de los principales componentes del inflamasoma en el modelo de células intestinales Caco-2.
5. La administración *in vitro* de HPKs regula la respuesta inmune en monocitos modulando las distintas subpoblaciones, disminuyendo la expresión de CCR2/CCL2 y la expresión de citoquinas proinflamatorias en este modelo.
6. La administración *in vitro* de HPKs promueve la polarización de monocitos hacia fenotipo M2.
7. La administración *in vitro* de HPKs disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias en el modelo de microglía BV-2.

8. La administración *in vitro* de HPKs promueve la polarización de células BV-2 hacia el fenotipo M2.

Con todo ello, se logra alcanzar el objetivo general de la presente tesis de obtener un compuesto proteico de alto valor añadido a partir de semillas de *A. caudatus* que puedan ser utilizados como un ingrediente funcional con actividad antioxidante, antiinflamatoria y neuroprotectora.



## 7. REFERENCIAS





## REFERENCIAS

1. Narwade S, Pinto S. Amaranth–A functional food. *Concepts Dairy & Veterinary Science*. 2018;1:72-7. DOI: 10.32474/CDVS.2018.01.000112.
2. Sauer JD. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1967;54(2):103-37. DOI: 10.2307/2394998.
3. Rastogi A, Shukla S. Amaranth: a new millennium crop of nutraceutical values. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2013;53(2):109-25. DOI: 10.1080/10408398.2010.517876.
4. Hutchinson J. *Evolutionary studies in world crops: Diversity and change in the Indian subcontinent*: CUP Archive; 1974.
5. Jain S, Hauptli H. *Grain amaranth: a new crop for California*. Agronomy Progress Report-California University Berkeley. 1980.
6. Saunders R, Becker R. Amaranthus: a potential food and feed resource. *Advances in Cereal Science and Technology (USA)*. 1984;6:357-96.
7. Irving DW, Betschart A, Saunders R. Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science*. 1981;46(4):1170-4. DOI: 10.111/j.365-2621.1981.tb03017.x.
8. Tindall H. *Underexploited tropical plants with promising economic value*. Washington, DC. National Academy of Sciences. *World Development*. 1977;5(3):273-.
9. Das S. *Amaranthus: A promising crop of future*: Springer; 2016.
10. Cheng A. Shaping a sustainable food future by rediscovering long-forgotten ancient grains. *Plant Science*. 2018;269:136-42. DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.01.018.
11. Coelho LM, Silva PM, Martins JT, Pinheiro AC, Vicente AA. Emerging opportunities in exploring the nutritional/functional value of amaranth. *Food & function*. 2018;9(11):5499-512. DOI: 10.1039/c8fo01422a.
12. Valcárcel-Yamani B, Lannes SdS. Applications of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and amaranth (*Amaranthus* spp.) and their influence in the nutritional value of cereal based foods. *Food and Public health*. 2012;2(6):265-75. DOI: 10.5923/j.fph.20120206.12.
13. Joshi DC, Sood S, Hosahatti R, Kant L, Pattanayak A, Kumar A, et al. From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131(9):1807-23. DOI: 10.007/s00122-018-3138-y.

14. Zheleznov A, Solonenko L, Zheleznova N. Seed proteins of the wild and the cultivated *Amaranthus* species. *Euphytica*. 1997;97(2):177-82. DOI: 10.1023/A:1003073804203.
15. Wong KV. Amaranth Grain and Greens for Health Benefits. *Nutrition & Food Science*. 2017;2:13-5. DOI: 0.19080/NFSIJ.2017.02.555584.
16. Alemayehu FR, Bendevis MA, Jacobsen SE. The potential for utilizing the seed crop amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an alternative crop to support food security and climate change mitigation. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2015;201(5):321-9. DOI: 10.1111/jac.12108.
17. Katiyar R, Sudhir S, Sanjay R. Varietal performance of grain amaranths (*A. hypochondriacus*) on sodic soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B, Biological Sciences*. 2000;70(2):185-7.
18. Sudhir S, Singh S. Studies on genetic parameters in vegetable amaranth. *Journal of Genetics & Breeding*. 2000;54(2):133-5. .
19. Barrio DA, Añón MC. Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of *Amaranthus mantegazzianus*. *European journal of nutrition*. 2010;49(2):73-82. DOI: 10.1007/s00394-009-0051-9.
20. Nsimba RY, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food chemistry*. 2008;106(2):760-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.06.004.
21. Calzetta Resio A, Tolaba M, Suarez C. Some physical and thermal characteristics of amaranth starch Algunas propiedades físicas y térmicas del almidón de amaranto. *Food science and technology international*. 2000;6(5):371-8. DOI: 10.1177/108201320000600503.
22. Venskutonis PR, Kraujalis P. Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013;12(4):381-412. DOI: 10.1111/541-4337.12021.
23. Kauffman C, Haas P. Grain amaranth: A crop with low water requirements and high nutritional value. 1983.
24. RS S, PR K. Composition of the seeds of some *Amaranthus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1988;42(4):325-31. DOI: 10.1002/jsfa.2740420406.
25. Singhal RS KP. Amaranths—an underutilized resource. *International Journal of Food Science & Technology*. 1988;23(2):125-39. DOI: 10.1111/j.365-2621.1988.tb00559.x.

26. Alencar NMM SC, Alvim ID, de Moraes EC, Bolini HMA. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;62(2):1011-8. DOI: 10.6/j.lwt.2015.02.029.
27. Alvarez-Jubete L, Arendt E, Gallagher E. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2009;60(sup4):240-57. DOI: 10.1080/09637480902950597.
28. Alvarez-Jubete L, Wijngaard H, Arendt E, Gallagher E. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food chemistry*. 2010;119(2):770-8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.07.032.
29. Escudero N, De Arellano M, Luco J, Gimenez M, Mucciarelli S. Comparison of the chemical composition and nutritional value of *Amaranthus cruentus* flour and its protein concentrate. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004;59(1):15-21. DOI: 10.1007/s11130-004-0033-3.
30. Bodroža-Solarov MFB, Kevrešan Ž, Mandić A, Šimurina O. Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain. *Journal of Food Process Engineering*. 2008;31(5):602-18. DOI: Quality of bread supplemented with popped *Amaranthus cruentus* grain.
31. Paško P BH, Fołta M, Gwiżdż J. Evaluation of antioxidant activity of amaranth (*Amaranthus cruentus*) grain and by-products (flour, popping, cereal). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2007;58:35-40.
32. Shukla S, Bhargava A, Chatterjee A, Srivastava J, Singh N, Singh S. Mineral profile and variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*). *Plant Foods for Human Nutrition*. 2006;61(1):21-6. DOI: 10.1007/s11130-006-0004-x.
33. Rojas-Rivas E, Espinoza-Ortega, A., Thomé-Ortiz, H., Moctezuma-Pérez, S. . Consumers' perception of amaranth in Mexico: a traditional food with characteristics of functional foods. *British Food Journal*. 2019;121:1190-202. DOI: 10.08/BFJ-05-2018-0334.
34. Rojas-Rivas E, Espinoza-Ortega A, Thomé-Ortíz H, Moctezuma-Pérez S, Cuffia F. Understanding consumers' perception and consumption motives towards amaranth in Mexico using the Pierre Bourdieu's theoretical concept of Habitus. *Appetite*. 2019;139:180-8. DOI: 10.1016/j.appet.2019.04.021.
35. Hotz C, Gibson RS. Traditional Food-Processing and Preparation Practices to Enhance the Bioavailability of Micronutrients in Plant-Based Diets. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(4):1097-100. DOI:10.3/jn/137.4.

36. Yáñez E, Zacarías I, Granger D, Vásquez M, Estevez AM. Chemical and nutritional characterization of amaranthus (*Amaranthus cruentus*). *Archivos latinoamericanos de nutricion*. 1994;44(1):57-62.
37. Achigan-Dako EG, Sogbohossou OE, Maundu P. Current knowledge on *Amaranthus* spp.: research avenues for improved nutritional value and yield in leafy amaranths in sub-Saharan Africa. *Euphytica*. 2014;197(3):303-17. DOI: 10.1007/s10681-014-1081-9.
38. Sánchez Marroquín A. Two forgotten crops of agroindustrial importance: amaranth and quinoa [Mexican amaranth, South American quinoa]. *Archivos latinoamericanos de nutricion*. 1983.
39. Sanchez-Marroquin ADV, F. R., Escobedo, M. Avitia, R. Maya, S. Vega, M. Evaluation of Whole Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Flour, Its Air-Classified Fractions, and Blends of These with Wheat and Oats as Possible Components for Infant Formulas. *Journal of Food Science*. 1986;51(5):1231-4. DOI: 10.1111/j.365-2621.1986.tb13092.x.
40. Vetter J. Minerals and amino acids in the grains of the recently cultivated "pseudo-cereal" species *Amaranthus hypochondriacus*. *Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung*. 1994;198(4):284-6. DOI: 10.1007/bf01193175
41. Condés MC, Añón MC, Mauri AN, Dufresne A. Amaranth protein films reinforced with maize starch nanocrystals. *Food Hydrocolloids*. 2015;47:146-57. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.01.026.
42. Diéguez MCV, Pelissari FM, do Amaral Sobral PJ, Menegalli FC. Effect of process conditions on the production of nanocomposite films based on amaranth flour and montmorillonite. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;61(1):70-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.11.017.
43. Tapia-Blácido D, Sobral PJ, Menegalli FC. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). *Journal of Food Engineering*. 2005;67(1-2):215-23. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.05.054.
44. Mayne ST, Playdon MC, Rock CL. Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nature reviews clinical oncology*. 2016;13(8):504–15. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.24.
45. Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review. *Circulation*. 2016;133(2):187-225. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018585.
46. Montoya-Rodríguez A, Gómez-Favela MA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, González de Mejía E. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role

in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015;14(2):139-58. DOI: 10.1111/541-4337.12125.

47. Micha R, Shulkin ML, Penalvo JL, Khatibzadeh S, Singh GM, Rao M, et al. Etiologic effects and optimal intakes of foods and nutrients for risk of cardiovascular diseases and diabetes: systematic reviews and meta-analyses from the Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (NutriCoDE). *PloS one*. 2017;12(4):e0175149. DOI: 10.1371/journal.pone.

48. Jew S, AbuMweis S, Jones P. Evolution of the Human Diet: Linking Our Ancestral Diet to Modern Functional Foods as a Means of Chronic Disease Prevention. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(5):925-34. DOI: 10.1089/jmf.2008.0268.

49. Kirtikar K, Basu B. *Indian Medicinal Plants*. International Book Distributors, Dehradun. Volume I-IV. 1987.

50. Madhava Chetty K, Sivaji K, Tulasi Rao K. Flowering plants of Chittoor district, Andhra Pradesh, India. Students Offset Printers, Tirupati, 61, 490pp. 2008.

51. Gowele VF, Kinabo J, Jumbe T, Kirschmann C, Frank J, Stuetz W. Provitamin A Carotenoids, Tocopherols, Ascorbic Acid and Minerals in Indigenous Leafy Vegetables from Tanzania. *Foods*. 2019;8(1):35. DOI: 10.3390/foods8010035.

52. Pedersen B, Kalinowski L, Eggum B. The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). *Plant foods for human nutrition*. 1987;36(4):309-24. DOI: 10.1007/BF01892352.

53. Prakash D, Pal M. Nutritional and antinutritional composition of vegetable and grain amaranth leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1991;57(4):573-83. DOI: 10.1002/jsfa.2740570410.

54. Sangameswaran B, Jayakar B. Anti-diabetic, anti-hyperlipidemic and spermatogenic effects of *Amaranthus spinosus* Linn. on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Natural Medicines*. 2007;62:79-82. DOI: 10.1007/s11418-007-0189-9.

55. Girija K, Lakshman K, Udaya C, Sachi GS, Divya T. Anti-diabetic and anti-cholesterolemic activity of methanol extracts of three species of *Amaranthus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011;1(2):133-8. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60011-7.

56. Girija K, Lakshman K. Anti-hyperlipidemic activity of methanol extracts of three plants of *Amaranthus* in triton-WR 1339 induced hyperlipidemic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2011;1(1):S62-S5. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60125-1.

57. Tironi VA, Añón MC. Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. *Food Research International*. 2010;43(1):315-22. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.10.001.
58. Maiyo Z, Ngure R, Matasyoh J, Chepkorir R. Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(21):3178-82.
59. Soriano-García M, Aguirre-Díaz IS. Nutritional Functional Value and Therapeutic Utilization of Amaranth. *Nutritional Value of Amaranth: IntechOpen*; 2019.
60. Loaiza MAPP, López-Malo A, Jiménez-Munguía MT. Nutraceutical properties of amaranth and chia seeds. *Functional properties of traditional foods: Springer*; 2016. p. 189-98.
61. Rivera G, Bocanegra-García V, Monge A. Traditional plants as source of functional foods: a review *Plantas tradicionales como fuente de alimentos funcionales: una revisión. CyTA-Journal of Food*. 2010;8(2):159-67. DOI: 10.1080/19476330903322978.
62. Chauhan A, Saxena D, Singh S. Total dietary fibre and antioxidant activity of gluten free cookies made from raw and germinated amaranth (*Amaranthus* spp.) flour. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;63(2):939-45. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.03.115.
63. Tapia-Blácido D, Mauri AN, Menegalli F, Sobral PJ, Añón MC. Contribution of the starch, protein, and lipid fractions to the physical, thermal, and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Science*. 2007;72(5):E293-E300. DOI: 10.1111/j.750-3841.2007.00359.x.
64. Becker R, Wheeler, E. L., Lorenz, K., Stafford, A. E., Grosjean, O. K., Betschart, A. A., Saunders, R. M. A Compositional Study of Amaranth Grain. *Journal of Food Science*. 1981;46(4):1175-80. DOI: 10.1111/j.365-2621.1981.tb03018.x.
65. Burgos VE, Armada M. Characterization and nutritional value of precooked products of kiwicha grains (*Amaranthus caudatus*). *Food Science and Technology*. 2015;35(3):531-8. DOI: 10.1590/678-457X.6767.
66. Maurya NK, Arya P. Amaranthus grain nutritional benefits: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2018;7(2):2258-62.
67. Marcone MF. Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed. *Food Chemistry*. 1999;65(4):533-42. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00221-0.
68. Vilcacundo R, Martínez-Villaluenga C, Miralles B, Hernández-Ledesma B. Release of multifunctional peptides from kiwicha (*Amaranthus caudatus*) protein

under in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(3):1225-32. DOI: 10.1002/jsfa.9294.

69. Mota C, Santos M, Mauro R, Samman N, Matos AS, Torres D, et al. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. *Food Chemistry*. 2016;193:55-61. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.043.

70. Janssen F, Pauly A, Rombouts I, Jansens KJ, Deleu LJ, Delcour JA. Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa (*Chenopodium* spp.): a food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2017;16(1):39-58. DOI: 10.1111/541-4337.12240.

71. Gorinstein S, Moshe R, Greene LJ, Arruda P. Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1991;39(5):851-4. DOI: 10.1021/jf00005a006.

72. Gorinstein S, Pawelzik E, Delgado-Licon E, Haruenkit R, Weisz M, Trakhtenberg S. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002;82(8):886-91. DOI: 10.1002/jsfa.120.

73. Mlakar SG, Turinek M, Jakop M, Bavec M, Bavec F. Grain amaranth as an alternative and perspective crop in temperate climate. *Journal for Geography*. 2010;5(1):135-45.

74. Paz SM-dl, Martinez-Lopez A, Villanueva-Lazo A, Pedroche J, Millan F, Millan-Linares MC. Identification and Characterization of Novel Antioxidant Protein Hydrolysates from Kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Antioxidants*. 2021;10(5):645. DOI: 10.3390/antiox10050645.

75. FAO F. Evaluación de la calidad de las proteínas de la dieta en nutrición humana. Consulta de expertos Granada, España: FAO y FINUT. 2017.

76. Gross R, Koch F, Malaga I, De Miranda A, Schoeneberger H, Trugo L. Chemical composition and protein quality of some local Andean food sources. *Food Chemistry*. 1989;34(1):25-34. DOI: 10.1016/0308-8146(89)90030-7.

77. Škrobot D, Milovanović I, Jovanov P, Pestorić M, Tomić J, Mandić A. Buckwheat, quinoa and amaranth: Good alternatives to nutritious food. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*. 2019;23(3):113-6. DOI: 10.5937/JPEA1903113Q.

78. Wright H. The glycaemic index and sports nutrition. *South African Journal of Clinical Nutrition*. 2005;18(3):222-8. DOI: 10.1080/16070658.2005.1734071.

79. Bruni R, Guerrini A, Scalia S, Romagnoli C, Sacchetti G. Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds:

ultrasonic and supercritical fluid extraction. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2002;13(5):257-61. DOI: 10.1002/pca.651.

80. Bruni R, Medici A, Guerrini A, Scalia S, Poli F, Muzzoli M, et al. Wild *Amaranthus caudatus* seed oil, a nutraceutical resource from Ecuadorian flora. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(11):5455-60. DOI: 10.1021/jf010385k.

81. Ayorinde FO, Ologunde MO, Nana EY, Bernard BN, Afolabi OA, Oke OL, et al. Determination of fatty acid composition of *Amaranthus* species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1989;66(12):1812-4. DOI: 10.007/BF02660754.

82. Gamel TH, Linssen JP, Mesallam AS, Damir AA, Shekib LA. Effect of seed treatments on the chemical composition of two amaranth species: oil, sugars, fibres, minerals and vitamins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86(1):82-9. DOI: 10.1002/jsfa.2318.

83. Özer NK, Azzi A. Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology*. 2000;148(2-3):179-85. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00209-2.

84. Nascimento AC, Mota C, Coelho I, Gueifão S, Santos M, Matos AS, et al. Characterisation of nutrient profile of quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and purple corn (*Zea mays* L.) consumed in the North of Argentina: Proximates, minerals and trace elements. *Food chemistry*. 2014;148:420-6. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.09.155.

85. Tang Y, Tsao R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017;61(7):1600767. DOI: 10.1002/mnfr.201600767.

86. Calleja CA, Hurtado MMC, Daschner Á, Escámez PSF, Abuín CMF, Pons RMG, et al. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Ingestas Nutricionales de Referencia para la población española. *Revista del Comité Científico de la AESAN*. 2019(29):43-68.

87. Repo-Carrasco-Valencia R, Hellström JK, Pihlava J-M, Mattila PH. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). *Food Chemistry*. 2010;120(1):128-33. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.09.087.

88. Schröter D, Neugart S, Schreiner M, Grune T, Rohn S, Ott C. Amaranth's 2-Caffeoylshikimic Acid—An Anti-Inflammatory Caffeic Acid Derivative That Impairs NF- $\kappa$ B Signaling in LPS-Challenged RAW 264.7 Macrophages. *Nutrients*. 2019;11(3):571. DOI: 10.3390/nu11030571.



89. Kabiri N, Asgary S, Setorki M. Lipid lowering by hydroalcoholic extracts of *Amaranthus caudatus* L. induces regression of rabbits atherosclerotic lesions. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10(1):89. DOI: 10.1186/476-511X-10-89.
90. Huerta-Ocampo JA, Paulina Barba de la Rosa A. Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Current Nutrition & Food Science*. 2011;7(1):1-9. DOI: 10.2174/157340111794941076.
91. Campos D, Chirinos R, Ranilla LG, Pedreschi R. Bioactive potential of andean fruits, seeds, and tubers. *Advances in food and nutrition research*. 84: Elsevier; 2018. p. 287-343.
92. Willett W, Skerrett PJ. *Eat, drink, and be healthy: the Harvard Medical School guide to healthy eating*: Simon and Schuster; 2017.
93. Schröter D, Baldermann S, Schreiner M, Witzel K, Maul R, Rohn S, et al. Natural diversity of hydroxycinnamic acid derivatives, flavonoid glycosides, carotenoids and chlorophylls in leaves of six different amaranth species. *Food chemistry*. 2018;267:376-86. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.043.
94. Katan MB. Functional foods. *The Lancet*. 1999;354(9181):794. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)80007-5.
95. Zeisel SH. Regulation of "Nutraceuticals". *Science*. 1999;285(5435):1853-5. DOI: 10.126/science.285.5435.1853.
96. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 2000;55(6):481-504. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00235-1.
97. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;79(5):727-47. DOI: 10.1093/ajcn/79.5.727.
98. Svobodová A, Psotová J, Walterová D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003;147(2):137-45. DOI: 10.5507/bp.2003.019.
99. Kalinova J, Dadakova E. Rutin and total quercetin content in amaranth (*Amaranthus* spp.). *Plant foods for human nutrition*. 2009;64(1):68. DOI: 10.1007/s11130-008-0104-x.
100. Conforti F, Statti G, Loizzo MR, Sacchetti G, Poli F, Menichini F. In vitro antioxidant effect and inhibition of  $\alpha$ -amylase of two varieties of *Amaranthus caudatus* seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(6):1098-102. DOI: 10.248/bpb.28.
101. Heinemann T, Axtmann G, Bergmann Kv. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *European journal of*

- clinical investigation. 1993;23(12):827-31. DOI: 10.1111/j.365-2362.1993.tb00737.x.
102. Cabral CE, Klein MRST. Phytosterols in the treatment of hypercholesterolemia and prevention of cardiovascular diseases. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2017;109(5):475-82. DOI: 10.5935/abc.20170158
103. Kumpulainen JT, Salonen JT. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease: Elsevier; 1999.
104. Khoo H-E, Prasad KN, Kong K-W, Jiang Y, Ismail A. Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*. 2011;16(2):1710-38. DOI: 10.3390/molecules16021710.
105. Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in nutrition*. 2011;2(1):1-7. DOI: 10.3945/an.110.000042.
106. Chan P, Tomlinson B, Lee CB, Lee YS. Effectiveness and safety of low-dose pravastatin and squalene, alone and in combination, in elderly patients with hypercholesterolemia. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 1996;36(5):422-7. DOI: 10.1002/j.552-4604.1996.tb05029.x.
107. Chaturvedi A, Sarojini G, Devi N. Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*). *Plant Foods for Human Nutrition*. 1993;44(1):63-70. DOI: 10.1007/BF01088483.
108. Bojórquez-Velázquez E, Velarde-Salcedo AJ, De León-Rodríguez A, Jimenez-Islas H, Pérez-Torres JL, Herrera-Estrella A, et al. Morphological, proximal composition, and bioactive compounds characterization of wild and cultivated amaranth (*Amaranthus* spp.) species. *Journal of Cereal Science*. 2018;83:222-8. DOI: 10.1016/j.jcs.2018.09.004.
109. D'Amico S, Schoenlechner R. Amaranth: its unique nutritional and health-promoting attributes. *Gluten-Free Ancient Grains*: Elsevier; 2017. p. 131-59. DOI: 10.1016/B978-0-08-100866-9.00006-6.
110. He H-P, Corke H. Oil and squalene in amaranthus grain and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(27):7913-20. DOI: 10.1021/jf030489q.
111. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):287-90. DOI: 10.1093/carcin/19.2.287.
112. Escrich E, Solanas M, Moral R, Escrich R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(8):813-30. DOI: 10.2174/138161211795428902.

113. Caselato-Sousa VM, Amaya-Farfán J. State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science*. 2012;77(4):R93-R104. DOI: 10.1111/j.750-3841.2012.02645.x.
114. Plate AY, Arêas JA. Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chemistry*. 2002;76(1):1-6. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00238-2.
115. Kabiri N, Asgary S, Madani H, Mahzouni P. Effects of *Amaranthus caudatus* L. extract and lovastatin on atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(5):354-61. DOI: 10.5897/JMPR09.198.
116. Kumar A, Lakshman K, Jayaveera K, Nandeesh R, Manoj B, Ranganayakulu D. Comparative in vitro anthelmintic activity of three plants from the Amaranthaceae family. *Archives of Biological Sciences*. 2010;62(1):185-9. DOI: 10.2298/ABS1001185K.
117. Kumar BSA, Lakshman K, Jayaveera KKN, Shekar DS, Muragan CS. Antinociceptive and antipyretic activities of methanol extract *Amaranthus caudatus* linn. *Latin American Journal of Pharmacy*. 2010;29(4):635-9.
118. Kumar A, Lakshman K, Jayaveera K, Sheshadri Shekar D, Narayan Swamy V, Khan S, et al. In vitro  $\alpha$ -amylase inhibition and antioxidant activities of methanolic extract of *Amaranthus Caudatus* Linn. *Oman medical journal*. 2011;26(3):166. DOI: 10.5001/omj.2011.40.
119. Kumar A, Lakshman K, Kumar P, Viswantha G, Veerapur VP, Thippeswamy BS, et al. Hepatoprotective activity of methanol extract of *Amaranthus caudatus* Linn. against paracetamol-induced hepatic injury in rats. *J Chinese Integrative Med*. 2011;9:194-200. DOI: 10.3736/jcim20110213.
120. Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Topham DK. *Phytochemicals as bioactive agents*: CRC press; 2000.
121. Nilsson J, Stegmark R, Åkesson B. Total antioxidant capacity in different pea (*Pisum sativum*) varieties after blanching and freezing. *Food Chemistry*. 2004;86(4):501-7. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.09.002.
122. Sharlin J, Edelstein S. *Essentials of life cycle nutrition*: Jones & Bartlett Publishers; 2010.
123. Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life— a review. *Plant foods for human nutrition*. 2010;65(3):299-308. DOI: 10.1007/s11130-010-0177-1.
124. Paško P, Bartoń H, Zagrodzki P, Chłopicka J, Izewska A, Gawlik M, et al. Effect of amaranth seeds in diet on oxidative status in plasma and selected tissues

of high fructose-fed rats. *Food Chemistry*. 2011;126(1):85-90. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.10.081.

125. Peiretti PG, Meineri G, Gai F, Longato E, Amarowicz R. Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural product research*. 2017;31(18):2178-82. DOI: 10.1080/14786419.2017.1278597.

126. Jo H-J, Chung K-H, Yoon JA, Lee K-J, Song BC, An JH. Radical scavenging activities of tannin extracted from amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of microbiology and biotechnology*. 2015;25(6):795-802. DOI: 10.4014/jmb.1409.09088.

127. Vilcacundo R, Barrio DA, Piñuel L, Boeri P, Tombari A, Pinto A, et al. Inhibition of lipid peroxidation of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) hydrolyzed protein using zebrafish larvae and embryos. *Plants*. 2018;7(3):69. DOI: 10.3390/plants7030069.

128. Jenkins DJ, Kendall CW, Mehling CC, Parker T, Rao AV, Agarwal S, et al. Combined effect of vegetable protein (soy) and soluble fiber added to a standard cholesterol-lowering diet. *Metabolism*. 1999;48(6):809-16. DOI: 10.1016/S0026-495(99)90184-1.

129. Chmelik Z, Kotolova H, Zavalova V, Bartosova L, Suchý P, Kollar P. The effect of amaranth flour on plasma cholesterol profile in mice with diet-induced dyslipidaemia. *Current Topics in Nutraceuticals Research*. 2013;11(3):67.

130. Czinner E, Hagymasi K, Blazovics A, Kery A, Szőke É, Lemberkovics E. In vitro antioxidant properties of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;73(3):437-43. DOI: 10.1016/S0378-8741(00)00304-4.

131. Jain S, Agrawal S. Herbal medication-an alternative curative system among Bhils in Udaipur District. *The Anthropologist*. 2003;5(3):141-7. DOI: 10.1080/09720073.2003.11890795.

132. Zambrana S, Lundqvist LC, Veliz V, Catrina S-B, Gonzales E, Östenson C-G. *Amaranthus caudatus* stimulates insulin secretion in goto-kakizaki rats, a model of diabetes mellitus type 2. *Nutrients*. 2018;10(1):94. DOI: 10.3390/nu10010094.

133. Jorge SS, Raúl RB, Isabel G-L, Edith P-A, Bernardo E-B, César A-P, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolyzates from *Amaranthus hypochondriacus* L. Grain and their influence on postprandial glycemia in Streptozotocin-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2015;12(1):90-8. DOI: 10.4314/ajtcam.v12i1.13.

134. Gómez-Cardona EE, Hernández-Domínguez EE, Huerta-Ocampo JÁ, Jiménez-Islas H, Díaz-Gois A, Velarde-Salcedo J, et al. Effect of amaranth

consumption on diabetes-related biomarkers in patients with diabetes. *Diabetes, Obesity & Metabolic Disorders*. 2017;3:5-10.

135. Escobedo-Moratilla A, Velarde Salcedo AJ, Magaña Hernández CV, Barrera Pacheco A, Espitia Rangel E, Barba de la Rosa AP, et al. Amaranth protein improves lipid profile and insulin resistance in a diet-induced obese mice model. *Journal of Food and Nutrition Research* 2017;5(12):914-24. DOI: 10.12691/jfnr-5-12-6.

136. Lampe JW. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. *The American journal of clinical nutrition*. 2003;78(3):579S-83S. DOI: 10.1093/ajcn/78.3.579S.

137. Broekaert WF, Marien W, Terras FR, De Bolle MF, Proost P, Van Damme J, et al. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. 1992;31(17):4308-14. DOI: 10.1021/bi00132a023.

138. Mohanty S, Zambrana S, Dieulouard S, Kamolvit W, Nilsén V, Gonzales E, et al. *Amaranthus caudatus* extract inhibits the invasion of *E. coli* into uroepithelial cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2018;220:155-8. DOI: 10.1016/j.jep.2018.04.003.

139. Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: Challenges and opportunities. *Nutrients*. 2018;10(11):1738. DOI: 10.3390/nu10111738.

140. Clare D, Swaisgood H. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of dairy science*. 2000;83(6):1187-95. DOI: 10.3168/jds.S0022-302(00)74983-6.

141. Vioque J, Clemente A, Pedroche J, Yust MdM, Millán F. Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*. 2001;52(2): 132-6. DOI: 10.3989/gya.2001.v52.i2.385.

142. Chen X, Yu J, Cui H, Xia S, Zhang X, Yang B. Effect of temperature on flavor compounds and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from mushroom hydrolysate. *Molecules*. 2018;23(2):247. DOI: 10.3390/molecules23020247.

143. Nakada H, Ohata M, Hosaka M, Ochi H, Abe F, Arihara K. Investigation of potent odorants generated during the production of whey protein hydrolysates. *Animal Science Journal*. 2018;89(9):1348-54. DOI: 10.1111/asj.13056.

144. Vioque J, Millán F. Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud. *Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación*. 2005;26:103-7.

145. Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(7):254-62. DOI: 10.1016/S0924-2244(01)00007-3.

146. Kumar R, Jaiswal A, Mann B. Chemical and enzymatic modification of food proteins. Dairy Chemistry Division, NDRI, Karnal.
147. Hou C, Wu L, Wang Z, Saguer E, Zhang D. Purification and identification of antioxidant alcalase-derived peptides from sheep plasma proteins. *Antioxidants*. 2019;8(12):592. DOI: 10.3390/antiox8120592.
148. Millán-Linares M, Bermúdez B, Yust M, Millán F, Pedroche J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *Journal of Functional Foods*. 2014;8:224-33. DOI: 10.1016/j.jff.2014.03.020.
149. Van der Ven C, Gruppen H, de Bont DB, Voragen AG. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *International Dairy Journal*. 2002;12(10):813-20. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00077-8.
150. Nasri M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities, and applications in foods and health benefits. A review. *Advances in food and nutrition research*. 81: Elsevier; 2017. p. 109-59. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.10.003.
151. Caessens PW, Daamen WF, Gruppen H, Visser S, Voragen AG.  $\beta$ -Lactoglobulin hydrolysis. 2. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1999;47(8):2980-90. DOI: 10.1021/jf981230o.
152. Benítez R, Ibarz A, Pagan J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 2008;42(2):227-36.
153. Saadi S, Saari N, Anwar F, Hamid AA, Ghazali HM. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology advances*. 2015;33(1):80-116. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.003.
154. Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*. 2004;21(1-4):55-61. DOI: 10.1002/biof.552210111.
155. Kitts DD, Weiler K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*. 2003;9(16):1309-23. DOI: 10.2174/1381612033454883.
156. Möller NP, Scholz-Ahrens KE, Roos N, Schrezenmeier J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*. 2008;47(4):171-82. DOI: 10.1007/s00394-008-0710-2.
157. Martínez-López A, Millán-Linares MC, Rodríguez-Martín NM, Millán F, Montserrat-de la Paz S. Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Functional Foods*. 2020;65:103735. DOI: 10.1016/j.jff.2019.

158. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ. Hypotensive peptides from milk proteins. *The Journal of nutrition*. 2004;134(4):980S-8S. DOI: 10.1093/jn/134.4.980S.
159. Gardner ML. Intestinal assimilation of intact peptides and proteins from the diet-a neglected field? *Biological Reviews*. 1984;59(3):289-331. DOI: 10.1111/j.469-185X.984.tb00708.x.
160. Gardner ML. Gastrointestinal absorption of intact proteins. *Annual review of nutrition*. 1988;8(1):329-50. DOI: 10.1146/annurev.nu.08.070188.01553.
161. Hara H, Funabiki R, Iwata M, Yamazaki K-I. Portal absorption of small peptides in rats under unrestrained conditions. *The Journal of nutrition*. 1984;114(6):1122-9. DOI: 10.093/jn/114.6.
162. Webb Jr K. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. *Journal of Animal Science*. 1990;68(9):3011-22. DOI: 10.2527/1990.6893011x.
163. He Y, Shen L, Ma C, Chen M, Pan Y, Yin L, et al. Protein Hydrolysates' Absorption Characteristics in the Dynamic Small Intestine In Vivo. *Molecules*. 2018;23(7):1591. DOI: 10.3390/molecules23071591.
164. Lundquist P, Artursson P. Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;106:256-76. DOI: 10.1016/j.addr.2016.07.007.
165. Cicero AF, Fogacci F, Colletti A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British journal of pharmacology*. 2017;174(11):1378-94. DOI: 10.1111/bph.13608.
166. Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*. 2012;77(1):R11-R24. DOI: 10.1111/j.750-3841.2011.02455.x.
167. Salampessy J, Phillips M, Seneweera S, Kailasapathy K. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chemistry*. 2010;120(2):556-60. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.054.
168. He H-L, Liu D, Ma C-B. Review on the angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitor peptides from marine proteins. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2013;169(3):738-49. DOI: 10.1007/s12010-012-0024-y.
169. Nasri R, Nasri M. Marine-derived bioactive peptides as new anticoagulant agents: a review. *Current Protein and Peptide Science*. 2013;14(3):199-204. DOI: 10.2174/13892037113149990042.

170. Lassoued I, Trigui M, Ghilissi Z, Nasri R, Jamoussi K, Kessis M, et al. Evaluation of hypocholesterolemic effect and antioxidant activity of Boops boops proteins in cholesterol-fed rats. *Food & function*. 2014;5(6):1224-31. DOI: 10.1039/c3fo60705d.
171. Udenigwe CC, Rouvinen-Watt K. The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):9303-13. DOI: 10.3390/ijms16059303.
172. Nasri R, Abdelhedi O, Jemil I, Daoued I, Hamden K, Kallel C, et al. Ameliorating effects of goby fish protein hydrolysates on high-fat-high-fructose diet-induced hyperglycemia, oxidative stress and deterioration of kidney function in rats. *Chemico-biological interactions*. 2015;242:71-80. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.08.003.
173. Xue Z, Gao J, Zhang Z, Yu W, Wang H, Kou X. Antihyperlipidemic and antitumor effects of chickpea albumin hydrolysate. *Plant foods for human nutrition*. 2012;67(4):393-400. DOI: 10.1007/s11130-012-0311-3.
174. Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-González S, Montero-Morán GM, Díaz-Gois A, de Mejia EG, et al. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food chemistry*. 2013;136(2):758-64. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.08.032.
175. Siro I, Kápolna E, Kápolna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*. 2008;51(3):456-67. DOI: 10.1016/j.appet.2008.05.060.
176. Gonzalez-Gonzalez C, Tuohy K, Jauregi P. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International dairy journal*. 2011;21(9):615-22. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.04.001.
177. Moronta J, Smaldini PL, Docena GH, Añón MC. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. *Journal of Functional Foods*. 2016;21:463-73. DOI: 10.1016/j.jff.2015.12.022.
178. Quiroga AV, Barrio DA, Añón MC. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT-Food Science and Technology*. 2015;60(1):478-85. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.07.035.
179. Guha S, Majumder K. Structural-features of food-derived bioactive peptides with anti-inflammatory activity: A brief review. *Journal of food biochemistry*. 2019;43(1):e12531. DOI: 10.1111/jfbc.
180. Orona-Tamayo D, Valverde ME, Paredes-López O. Bioactive peptides from selected latin american food crops—A nutraceutical and molecular approach.



Critical reviews in food science and nutrition. 2019;59(12):1949-75. DOI: 10.080/10408398.2018.1434480.

181. Chalamaiah M, Yu W, Wu J. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*. 2018;245:205-22. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.087.

182. Rodríguez-Carrio J, Fernández A, Riera FA, Suárez A. Immunomodulatory activities of whey  $\beta$ -lactoglobulin tryptic-digested fractions. *International Dairy Journal*. 2014;34(1):65-73. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.07.004.

183. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005;6(12):1191-7. DOI: 10.038/ni276.

184. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell discovery*. 2020;6(1):1-22. DOI: 10.1038/s41421-020-0167-x.

185. Carter GT, Duong V, Ho S, Ngo KC, Greer CL, Weeks DL. Side effects of commonly prescribed analgesic medications. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*. 2014;25(2):457-70. DOI: 10.1016/j.pmr.2014.01.007.

186. Roubille C, Martel-Pelletier J, Davy J-M, Haraoui B, Pelletier J-P. Cardiovascular adverse effects of anti-inflammatory drugs. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*. 2013;12(1):55-67. DOI: 10.2174/187152313804998687.

187. Zhang H, Kovacs-Nolan J, Kodera T, Eto Y, Mine Y.  $\gamma$ -Glutamyl cysteine and  $\gamma$ -glutamyl valine inhibit TNF- $\alpha$  signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(5):792-804. DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.12.023.

188. Vargas-Robles H, Castro-Ochoa KF, Citalán-Madrid AF, Schnoor M. Beneficial effects of nutritional supplements on intestinal epithelial barrier functions in experimental colitis models in vivo. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25(30):4181-98. DOI: 10.3748/wjg.v25.i30.4181.

189. Kiewiet MB, Faas MM, De Vos P. Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. *Nutrients*. 2018;10(7):904. DOI: 10.3390/nu10070904.

190. Millán-Linares M, Millán F, Pedroche J, Yust M. GPETAFLR: A new anti-inflammatory peptide from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:358-67. DOI: 10.1016/j.jff.2015.07.016.

191. Montserrat-de la Paz S, Lemus-Conejo A, Toscano R, Pedroche J, Millan F, Millan-Linares MC. GPETAFLR, an octapeptide isolated from *Lupinus angustifolius* L. protein hydrolysate, promotes the skewing to the M2 phenotype in human

primary monocytes. *Food & function*. 2019;10(6):3303-11. DOI: 10.1039/C9FO00115H.

192. Cruz-Chamorro I, Álvarez-Sánchez N, Santos-Sánchez G, Pedroche J, Fernández-Pachón M-S, Millán F, et al. Immunomodulatory and antioxidant properties of wheat gluten protein hydrolysates in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrients*. 2020;12(6):1673. DOI: 10.3390/nu12061673.

193. Cruz-Chamorro I, Álvarez-Sánchez N, Álvarez-Ríos AI, Santos-Sánchez G, Pedroche J, Millán F, et al. Safety and Efficacy of a Beverage Containing Lupine Protein Hydrolysates on the Immune, Oxidative and Lipid Status in Healthy Subjects: An Intervention Study (the Lupine-1 Trial). *Molecular Nutrition & Food Research*. 2021;65(14):2100139. DOI: 10.1002/mnfr.202100139.

194. Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells. *Glia*. 2019;67(6):1017-35. DOI: 10.02/glia.23571.

195. Peters A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *Journal of neurocytology*. 2004;33(3):345-57. DOI: 10.1023/B:NEUR.0000044195.64009.27.

196. Böttcher C, Schlickeiser S, Sneebouer MA, Kunkel D, Knop A, Paza E, et al. Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nature Neuroscience*. 2019;22(1):78-90. DOI: 10.1038/s41593-018-0290-2.

197. Toscano R, Millan-Linares MC, Naranjo MC, Lemus-Conejo A, Claro C, Montserrat-de la Paz S. Unsaponifiable and phenolic fractions from virgin olive oil prevent neuroinflammation skewing microglia polarization toward M2 phenotype. *Journal of Functional Foods*. 2019;62:103543. DOI: 10.1016/j.jff.2019.

198. Olajide OA, Kumar A, Velagapudi R, Okorji UP, Fiebich BL. Punicalagin inhibits neuroinflammation in LPS-activated rat primary microglia. *Molecular nutrition & food research*. 2014;58(9):1843-51. DOI: 10.002/mnfr.201400163.

199. Wu W, Li Y, Wu Y, Zhang Y, Wang Z, Liu X. Lutein suppresses inflammatory responses through Nrf2 activation and NF- $\kappa$ B inactivation in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. *Molecular nutrition & food research*. 2015;59(9):1663-73. DOI: 10.002/mnfr.201500109.

200. Lqari H, Vioque J, Pedroche J, Millán F. Lupinus angustifolius protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*. 2002;76(3):349-56. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00285-0.

201. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1979;27(6):1256-62. DOI: 10.021/jf60226a042.

202. Prosky L, Asp N-G, Schweizer TF, Devries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 1988;71(5):1017-23. DOI: 10.93/jaoac/71.5.
203. Moores R, McDermott DL, Wood T. Determination of chlorogenic acid in coffee. *Analytical Chemistry*. 1948;20(7):620-4. DOI: 10.1021/ac60019a007.
204. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pt, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 1956;28(3):350-6. DOI: 10.1021/ac60111a017.
205. Alaiz M, Navarro JL, Girón J, Vioque E. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography A*. 1992;591(1-2):181-6. DOI: 10.1016/0021-9673(92)80236-N.
206. Yust M, Pedroche J, Girón-Calle J, Vioque J, Millán F, Alaiz M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chemistry*. 2004;85(2):317-20. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.07.026.
207. Sindayikengera S, Xia W-s. Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2006;7(2):90-8. DOI: 10.1631/jzus.2006.B0090.
208. Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*. 2003;36(9-10):949-57. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00104-2.
209. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*. 1986;44(6):307-15. DOI: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
210. Acosta C, Carpio C, Vilcacundo R, Carrillo W. Identification of proteins isolate from amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 m solvents. *Asian J Pharm Clin Res*. 2016;9(3):331-4.
211. Mohanta TK, Khan A, Hashem A, Abd\_Allah EF, Al-Harrasi A. The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. *BMC genomics*. 2019;20(1):631. DOI: 10.1186/s12864-019-5983-8.
212. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry 7th Edition*. WH Freeman and Company; 2017.

213. Malomo SA, Onuh JO, Girgih AT, Aluko RE. Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates. *Nutrients*. 2015;7(9):7616-32. DOI: 10.3390/nu7095358.
214. Daskaya-Dikmen C, Yucetepe A, Karbancioglu-Guler F, Daskaya H, Ozcelik B. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*. 2017;9(4):316. DOI: 10.3390/nu9040316.
215. Gómez LJ, Gómez NA, Zapata JE, López-García G, Cilla A, Alegría A. In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. *Food Research International*. 2019;120:52-61. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.02.029.
216. Zhang Q, Tong X, Sui X, Wang Z, Qi B, Li Y, et al. Antioxidant activity and protective effects of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Food Research International*. 2018;111:256-64. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.046.
217. Rodriguez-Martin NM, Toscano R, Villanueva A, Pedroche J, Millan F, Montserrat-de la Paz S, et al. Neuroprotective protein hydrolysates from hemp (*Cannabis sativa L.*) seeds. *Food & function*. 2019;10(10):6732-9. DOI: 10.1039/C9FO01904A.
218. Villanueva-Lazo A, Paz SM-dl, Rodriguez-Martin NM, Millan F, Carrera C, Pedroche JJ, et al. Antihypertensive and Antioxidant Activity of Chia Protein Techno-Functional Extensive Hydrolysates. *Foods*. 2021;10(10):2297. DOI: 10.3390/foods10102297.
219. Kovacs-Nolan J, Zhang H, Ibuki M, Nakamori T, Yoshiura K, Turner PV, et al. The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2012;1820(11):1753-63. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.07.007.
220. Shimizu M. Interaction between food substances and the intestinal epithelium. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2010;74(2):232-41. DOI: 10.1271/bbb.90730.
221. Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, Khailova L, Masterson JC, Tye H, et al. Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Experimental Medicine*. 2017;214(6):1737-52. DOI: 10.1084/jem.20160462.
222. Menu P, Vince J. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clinical & Experimental Immunology*. 2011;166(1):1-15. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2011.04440.x.
223. Fantuzzi L, Tagliamonte M, Gauzzi MC, Lopalco L. Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(24):4869-86. DOI: 10.1007/s00018-019-3255-6.

224. Sampath P, Moideen K, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Monocyte subsets: phenotypes and function in tuberculosis infection. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1726. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01726.
225. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35(6):1306-16. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.304650.
226. Hao Q, Vadgama JV, Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(82):1-13. DOI: 0.1186/s12964-020-00589-8.
227. Akram IG, Georges R, Hielscher T, Adwan H, Berger MR. The chemokines CCR1 and CCRL2 have a role in colorectal cancer liver metastasis. *Tumor Biology*. 2016;37(2):2461-71. DOI: 10.1007/s13277-015-4089-4.
228. Anders H-J, Ninichuk V, Schlöndorff D. Progression of kidney disease: blocking leukocyte recruitment with chemokine receptor CCR1 antagonists. *Kidney international*. 2006;69(1):29-32. DOI: 10.1038/sj.ki.5000053.
229. Li J, Zhou H, Fu X, Zhang M, Sun F, Fan H. Dynamic role of macrophage CX3CR1 expression in inflammatory bowel disease. *Immunology Letters*. 2021;232:39-44. DOI: 10.1016/j.imlet.2021.02.001.
230. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology*. 2020;877:173090. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.
231. Röszer T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:16. DOI: 0.1155/2015/816460.
232. Toscano R, Millan-Linares MC, Lemus-Conejo A, Claro C, Sanchez-Margalet V, Montserrat-de la Paz S. Postprandial triglyceride-rich lipoproteins promote M1/M2 microglia polarization in a fatty-acid-dependent manner. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2020;75:108248. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.
233. Yang X, Xu S, Qian Y, Xiao Q. Resveratrol regulates microglia M1/M2 polarization via PGC-1 $\alpha$  in conditions of neuroinflammatory injury. *Brain, behavior, and immunity*. 2017;64:162-72. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.03.003.
234. Hellenbrand DJ, Reichl KA, Travis BJ, Filipp ME, Khalil AS, Pulito DJ, et al. Sustained interleukin-10 delivery reduces inflammation and improves motor function after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*. 2019;16(93):1-19. DOI: 0.1186/s12974-019-1479-3.

235. Papa S, Caron I, Rossi F, Veglianesi P. Modulators of microglia: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2016;26(4):427-37. DOI: 10.1517/13543776.2016.1135901.

# Curriculum Vitae

---

## Información personal

<i>Nombre y Apellidos</i>	<b>ALICIA MARTÍNEZ LÓPEZ</b>
<i>Dirección</i>	C/Tocina 22, Alcalá del Río 41200 Sevilla (España)
<i>Teléfono</i>	627323107
<i>E-mail</i>	alicia.martlopez@gmail.com
<i>Nacionalidad</i>	Española

## Experiencia profesional

### Scientist

2022 – PRESENTE  
CITRE - Bristol Myers Squibb Company

### Associate Research Scientist

2020 – 2022  
CITRE - Bristol Myers Squibb Company

### Junior Research Associate

2018 – 2020  
Oxford Global Resources Para Celgene Research S.L.U.

### Investigación en NeuroInmunoEndocrinología y Alimentos Funcionales

#### *Beca pre-doctoral de la Universidad de Sevilla*

2017 – 2018  
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Universidad de Sevilla

### Investigación en Diagnóstico de Enfermedades Raras

2016  
Hospital Universitario Virgen del Rocío para Sanofi Genzyme

### Investigación en NeuroInmunoEndocrinología

2013 – 2015  
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y Universidad de Sevilla

## Formación

### **Máster en Tecnología e Industria Alimentaria**

2016-2017

Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla

### **Máster en Investigación Médica: Clínica y Experimental**

#### ***Premio Extraordinario Fin de Estudios***

2014-2015

Universidad de Sevilla

### **Grado en Bioquímica**

2010-2014

Universidad de Sevilla y Universidad de Málaga

### **Ciclo Formativo de Grado Superior en Laboratorio de Diagnóstico Clínico**

2010-2014

I.E.S Federico Mayor Zaragoza (Sevilla)

**Nivel de Inglés: B2**

## Publicaciones Científicas

- **Safety and Efficacy of a Beverage Containing Lupine Protein Hydrolysates on the Immune, Oxidative and Lipid Status in Healthy Subjects: An Intervention Study (the Lupine-1 Trial).** Cruz-Chamorro I, Álvarez-Sánchez N, Álvarez-Ríos AI, Santos-Sánchez G, Pedroche J, Millán F, Carrera Sánchez C, Fernández-Pachón MS, Millán-Linares MC, Martínez-López A, Lardone PJ, Bejarano I, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. *Mol Nutr Food Res*. 2021 Jul;65(14):e2100139. doi: 10.1002/mnfr.202100139. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34015184.
- **Identification and Characterization of Novel Antioxidant Protein Hydrolysates from Kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*).** Paz SM, Martínez-López A, Villanueva-Lazo A, Pedroche J, Millan F, Millan-Linares MC. *Antioxidants*. 2021 Apr 22;10(5):645. doi: 10.3390/antiox10050645. PMID: 33922174; PMCID: PMC8145011.



- **Control of the extractable content of bioactive compounds in coffee beans by near infrared hyperspectral imaging.** Nogales-Bueno, J., Baca-Bocanegra, B., Romero-Molina, L., Martínez-López, A., Rato, A. E., Heredia, F. J., ... & González-Miret, M. L. (2020). LWT, 110201.
- **Seasonal Variations in Macrophages/Microglia Underlie Changes in the Mouse Model of Multiple Sclerosis Severity.** Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Álvarez-López AI, López-González A, Lacalle Remigio JR, Lardone PJ, Guerrero JM, Martínez-López A., Carrillo-Vico A. (2020). Molecular Neurobiology, 1-8.
- **Data regarding: Melatonin induces neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis by impairing T cell priming and reactivation in the central nervous system.** Álvarez-Sánchez, Nuria; Martínez-López, Alicia; Cruz-Chamorro, Ivan; Álvarez-López, Ana Isabel; Mayo-Léon, Francisco; Santos-Sánchez, Guillermo; Lardone, Patricia Judith; Fernández-Santos, José M.; Utrilla, José Carmelo; Guerrero, Juan Miguel; Carrillo-Vico, Antonio (2020). Mendeley Data, V2, doi: 10.17632/tdb98cr3yz.2
- **Nutraceutical value of kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.).** Martinez-Lopez, A., Millan-Linares, M. C., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., & Montserrat-de la Paz, S. (2020). Journal of Functional Foods, 65, 103735.
- **Melatonin reduces inflammatory response in peripheral T helper lymphocytes from relapsing-remitting multiple sclerosis patients.** Álvarez-Sánchez, N., Cruz-Chamorro, I., Díaz-Sánchez, M., Sarmiento-Soto, H., Medrano-Campillo, P., Martínez-López, A., ... & Carrillo-Vico, A. (2017). Journal of pineal research, 63(4), e12442.
- **Melatonin treatment improves primary progressive multiple sclerosis: a case report.** López-González, A., Álvarez-Sánchez, N., Lardone, P. J., Cruz-Chamorro, I., Martínez-López, A., Guerrero, J. M., ... & Carrillo-Vico, A. (2015). Journal of pineal research, 58(2), 173-177.
- **Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance.** Álvarez-Sánchez, N., Cruz-Chamorro, I., López-González, A., Utrilla, J. C., Fernández-Santos, J. M., Martínez-López, A., ... & Carrillo-Vico, A. (2015). Brain, behavior, and immunity, 50, 101-114.

## Asistencia a Congresos

- XIX Congreso Latinoamericano de Nutrición: Congreso Virtual SLAN 2021  
**Efecto antiinflamatorio de hidrolizados proteicos de kiwicha (*Amaranthus caudatus L.*) a nivel intestinal vía inflamasoma.**  
Póster
- I Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado (CAED), 2021.  
Universidad Miguel Hernández
- XVI Foro de Investigadores: Ciencia y Comunicación a la Sociedad 2020  
**Efectos de la melatonina sobre la sinapsis inmune a lo largo de la encefalomiелitis autoinmune experimental, modelo animal de esclerosis múltiple**  
Comunicación  
Instituto de Biomedicina de Sevilla, España
- EuroFlow Quality Assessment Program 2019  
Gante, Bruselas
- XI Reunión de Jóvenes Farmacólogos de Andalucía 2019  
**Anti-neuroinflammatory properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein hydrolysates**  
Instituto de Biomedicina de Sevilla, España
- XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas 2018  
**Immunomodulatory effects of melatonin**  
Presentación  
Cádiz, España
- 10th Anniversary of the International Symposium on Immunonutrition. International Society for Immunonutrition (ISIN) 2017  
**Lupinus angustifolius protein hydrolysate reduces pro-inflammatory markers in healthy human volunteers**  
Póster  
Madrid, España

- EuroFoodChem XVIII. Upcoming Challenges in Food Science 2015  
**Immunomodulatory and antioxidants effects of lupine protein hydrolysates on human peripheral blood mononuclear cells**  
Póster  
Madrid, España
- IV FASEB conference on Melatonin Biology: Actions and Therapeutics 2015  
**Melatonin: a buffer of the immune system**  
Presentación  
Lisboa, Portugal
- IV FASEB conference on Melatonin Biology: Actions and Therapeutics 2015  
**Melatonin suppresses Th1 response in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients**  
Comunicación  
Lisboa, Portugal
- IV FASEB conference on Melatonin Biology: Actions and Therapeutics 2015  
**Melatonin protects from the entry of pathogenic cells in the inflamed central nervous system of mice with EAE, the experimental model for Multiple Sclerosis**  
Póster  
Lisboa, Portugal
- IV FASEB conference on Melatonin Biology: Actions and Therapeutics 2015  
**Melatonin modulates APC-T cell interaction in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)**  
Póster  
Lisboa, Portugal

## **Capacidades y competencias técnicas**

- Manipulación de muestras humanas
- Cultivo celular (tanto cultivo celular adherente como en suspensión; cultivo celular primario)
- Aislamiento de PBMC a partir de sangre total y posterior cultivo y aislamiento de diferentes tipos celulares
- Técnicas de proliferación celular y muerte celular
- Técnicas de biología molecular
- Técnicas de citometría de flujo
- Procedimientos de mantenimiento del laboratorio
- Manejo, seguimiento y cría de animales (roedores) – Categoría A, B y C (Certificado Junta de Andalucía)
- Técnicas de fisiología en roedores (técnicas de biología y bioquímica, medición de diversos parámetros fisiológicos, extracción de sangre, cirugía, etc.)
- Histología tisular en roedores, preparación de muestras y diferentes técnicas analíticas.
- Experiencia con varios paquetes de software, citometría y conocimientos en software de programación informática (Office, SPSS, Infinicyt, FlowJo, R, etc.)