



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

*IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DE  
PROTEASAS TIPO SERINA CON  
POTENCIAL INMUNONUTRICIONAL EN  
TRIGO (TRITICUM DURUM) Y QUINOA  
(CHENOPODIUM QUINOA)*

TRABAJO DE FIN DE GRADO  
Grado de Biotecnología



Elena Alberó Davó

Tarragona, Junio 2018

Tutor académico: Javier Capilla

Tutor profesional: Moisés Laparra

# ÍNDICE

DATOS DEL CENTRO .....	3
RESUMEN .....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
IMPORTANCIA DE LOS CEREALES EN LA SALUD .....	7
Trigo ( <i>Triticum spp.</i> ).....	8
ALTERNATIVAS A LOS CEREALES: PSEUDOCEREALES .....	8
Quinoa ( <i>Chenopodium quinoa</i> ) .....	9
BIOACCESIBILIDAD DE LOS SETIS: INMUNONUTRICIÓN .....	11
HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	12
PLAN DE TRABAJO .....	13
METODOLOGÍA .....	14
MUESTRAS.....	14
OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE SALINA.....	14
ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) .....	14
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEASAS .....	14
FRACCIONAMIENTO DE SETIS .....	15
DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA: BIOACCESIBILIDAD DE SETIS .....	16
ACTIVIDAD ENDOSÓMICA: ROJO NEUTRO.....	17
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
PERFIL PROTEICO DE LA FRACCIÓN SALINA .....	19
ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEASAS.....	21
BIOACCESIBILIDAD.....	25
CONCLUSIONES .....	29
VALORACIÓN PERSONAL.....	30

<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO 1: ANÁLISIS SDS-PAGE .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO 2: ANÁLISIS SDS-PAGE .....</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 3: HOMOLOGÍA DE SECUENCIA ENTRE CM16 Y LA QUENOPODINA.....</b>	<b>36</b>
<b>ANEXO 4: HOMOLOGÍA DE SECUENCIA ENTRE CM2 Y QUENOPODINA.....</b>	<b>37</b>

## DATOS DEL CENTRO

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha llevado a cabo en el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación (IMDEA Alimentación). El centro tiene como objetivo avanzar en el conocimiento científico en el área de los alimentos y la salud, contribuir al desarrollo económico y la competitividad de la industria alimentaria mediante el diseño de alimentos funcionales y, a su vez, mejorar el bienestar de la población mediante la relación dieta-salud. Las plataformas de I+D+i y los distintos programas de investigación con sus respectivos grupos de investigación se detallan en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Esquema de los programas y los grupos de investigación y las plataformas I+D+i de IMDEA Alimentación

El TFG se ha desarrollado en el departamento de Nutrición de Precisión y Cáncer, concretamente en el grupo de investigación de Inmunonutrición Molecular dirigido por el Dr. Moisés Laparra. El objetivo del grupo es la búsqueda de estrategias de intervención de precisión basadas en la modulación selectiva de respuestas inmunitarias innatas para la prevención de alteraciones en la salud del eje entero-hepático y neuro-inmunológico. El trabajo se centra en una de las principales de investigación del grupo,

la cual se centra en los agonistas inmunonutricionales de los receptores inmunes innatos de tipo-Toll (TLR) y su impacto e influencia en la diferenciación funcional y polarización de macrófagos para potenciar una respuesta inmune de mayor duración.

## RESUMEN

Los cereales son los alimentos más consumidos alrededor del mundo por su valor nutricional, su alto rendimiento de producción y su bajo coste. Sin embargo, la globalización y el desarrollo social han despertado el interés en la búsqueda de nuevos alimentos que promuevan la salud, como los pseudocereales. Dentro de estos, se puede encontrar la quinoa (*Chenopodium quinoa*), la cual, destaca por su ventajoso perfil nutricional.

Los cereales han recibido una gran atención clínica debido a su participación en distintas patologías inflamatorias y/o alérgicas. En el trigo se han identificado componentes inmunonutricionales, en la fracción de globulinas, con actividad inhibidora de proteasas (SETIs) capaces de activar la respuesta inmune innata a través del receptor inmune innato tipo-Toll (TLR)-4. Actualmente, en relación a los SETIs de la quinoa existe escasa bibliografía, a pesar de que, en este alimento las globulinas representan una fracción significativa.

El análisis SDS-PAGE de la fracción de globulinas de *Chenopodium quinoa* y *Triticum durum* llevado a cabo en este trabajo, ha mostrado marcas electroforéticas de entre 6-70 kDa, tamaño molecular descrito para los SETIs. El fraccionamiento de masas moleculares revela que la máxima actividad SETI en la quinoa la presenta la fracción mayor a 30 kDa, mientras que en el trigo se encuentra en la menor a 30 kDa. La estimación de la bioaccesibilidad proteica desde las muestras, indica una bioaccesibilidad del 53% en el extracto de quinoa y del 20% en el extracto de trigo, no obstante, la actividad SETI es similar para ambas muestras (14-18%/mg proteína). Estos resultados confirman el aporte dietético de SETIs desde quinoa y trigo, al tiempo que estos son parcialmente resistentes a la digestión gastrointestinal.

## ABSTRACT

Cereals are the most consumed food in the world for their nutritional value, high production yield and low cost. However, the globalization and the social development have awakened the interest in searching for novel foods that promote health, as pseudocereals. One example is quinoa (*Chenopodium quinoa*), which has an advantageous nutritional profile.

Cereals have received clinical attention due to their participation in different inflammatory and allergic pathologies. In wheat they have been identified immunonutritional compounds, in the globulin fraction, with protease inhibitory activity (SETIs) with the ability to activate the innate immune response through the innate immune receptor type Toll (TLR)-4. Nowadays, for the quinoa there is no bibliography available on the matter, although globulins represent a significant fraction.

The SDS-PAGE analysis of the globulin fraction of *Chenopodium quinoa* and *Triticum durum* in this study has shown electrophoretic marks between 6-70 kDa, molecular size described for SETIs. The fractionation of the molecular masses reveals that the highest SETI activity in quinoa is the 30-50kDa fraction, whereas in wheat is in the 14-30 kDa fraction. The estimation of protein bioaccessibility of the samples suggests a bioaccessibility of 53% in the quinoa extract and of 20% in the *T. durum* extract. Nevertheless, the SETI activity is similar for both samples (14-18%/mg protein). These results confirm the dietary contribution of SETIs from quinoa and wheat, while these are partially resistant to gastrointestinal digestion.

# INTRODUCCIÓN

## IMPORTANCIA DE LOS CEREALES EN LA SALUD

Los cereales son plantas que pertenecen a la familia de las gramíneas. Constituyen una fuente de proteínas, hidratos de carbono complejos, fibra y vitaminas por lo que representan un alimento esencial por su valor nutricional y efectos beneficiosos para la salud (revisado en Frutos *et al.*, 2017). Contienen poca grasa, la cual no es saturada, no contienen colesterol y son la mayor fuente de almidón (revisado en Sanz-Penella, 2012). Además, algunos componentes (i.e., almidón) derivados de estos son utilizados por la industria farmacéutica.

El trigo y el arroz destacan por ser los cereales más consumidos a nivel mundial ([www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/](http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/)), (Figura 2), mientras que el consumo de cebada, avena y centeno no es tan generalizado (revisado en Sanz-Penella, 2012).

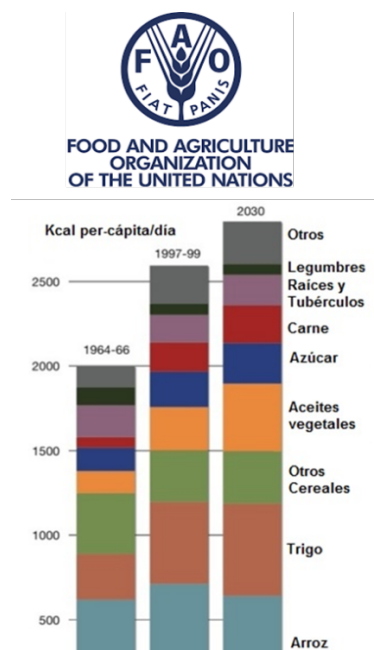


Figura 2. Estadísticas de consumo (Kcal per cápita/día) según la FAO

### Trigo (*Triticum spp*)

El trigo continúa siendo el alimento más consumido del mundo ya que su valor nutricional, su alto rendimiento de producción y su bajo coste permite que se pueda utilizar como ingrediente en una amplia variedad de productos.

En la fracción proteica del trigo se pueden encontrar cuatro tipos de proteínas que se clasifican según su solubilidad en albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas (Wieser *et al.*, 1998). Estas dos últimas forman el gluten, componente mayoritario del trigo y de gran interés debido a sus propiedades tecno-funcionales (i.e., elasticidad y viscosidad en masas panarias) y su implicación en patologías inmunometabólicas (i.e., celiaquía, etc.). No obstante, recientemente se ha visto que hay otros componentes en menor proporción, como la fracción de globulinas/albúminas, que tienen impacto en el sistema inmune (Frutos *et al.*, 2017).

### ALTERNATIVAS A LOS CEREALES: PSEUDOCEREALES

La globalización y el desarrollo social han despertado el interés en investigaciones que tienen como objetivo la búsqueda de nuevos alimentos que satisfagan las necesidades de los consumidores, centrándose en alimentos que, además de ser ricos en nutrientes, contengan componentes bioactivos que promuevan la salud y la prevención de enfermedades. Debido a esto, ha aumentado el interés y estudio de los llamados pseudocereales, considerados en Europa nuevos alimentos. Según la Agencia de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) un nuevo alimento se define como aquel que no ha sido consumido en gran medida por los seres humanos en la UE antes del 15 de mayo de 1997, fecha en la que entró en vigor el primer reglamento de Nuevo Alimentos.

Los pseudocereales son plantas no gramíneas que se usan en el ámbito doméstico de la misma forma que los cereales por su contenido en almidón y similitud de granos. Fueron parte de la dieta humana durante siglos y, recientemente, el consumo de estos granos ha experimentado un importante incremento a nivel mundial (FAO-ALADI 2014). Este éxito se debe principalmente a su carácter de alimentos completos y a sus propiedades

nutricionales y de salud, aunque no existen alegaciones de salud por parte de la Autoridad Europea de Salud Alimentaria (EFSA).

Se utilizan en una gran variedad de productos destinados tanto a humanos como a animales, en forma de semilla o de harina. Los principales pseudocereales son la quinoa (*Chenopodium quinoa*), el amaranto (*Amaranthus cruentus*) y el alforfón o trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* y *Fagopyrum tararicum*).

Se caracterizan por tener una elevada concentración de proteínas de calidad, presencia de aminoácidos esenciales como lisina, triptófano y metionina, además de minerales, vitaminas y ácidos grasos. Carecen de gliadinas, las proteínas que causan la enfermedad celiaca, por lo que, sumado a sus características nutricionales, son buenos candidatos para formar parte de estrategias nutricionales, así como de mejora de formulaciones alimentarias que sustituyan al trigo (Frutos *et al.*, 2017).

#### Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

La quinoa (*Chenopodium quinoa*) es un grano perteneciente a la familia Chenopodiaceae procedente de los Andes. Es un grano con un gran valor nutricional y una fuerte adaptabilidad a condiciones ambientales extremas (sequia, heladas y salinidad del suelo) (Valcárcel-Yamani *et al.*, 2012).

Los granos de quinoa se caracterizan por ser una fuente de proteínas de alto valor biológico, ricas en aminoácidos esenciales, especialmente lisina y aminoácidos azufrados. La fracción proteica está compuesta mayoritariamente por globulinas y albuminas, por lo que cumple con la nomenclatura del Codex Alimentarius de productos sin gluten (cantidad de gluten menor al 20 mg/kg). Hasta el momento, se han identificado como las proteínas más abundantes la globulina 11S (quenopodina) y la 2S, representando el 37% y el 35% del contenido proteico, respectivamente (Frutos *et al.*, 2017).

Presenta una fracción lipídica rica en ácidos grasos insaturados, especialmente ácido oleico y linolénico. Además es una fuente de compuestos bioactivos como fitoesteroles, flavonoides y tocoferoles (Frutos *et al.*, 2017). Sin embargo, en la capa externa de los

granos se puede encontrar un elevado contenido de saponinas, consideradas como factores antinutricionales, pudiendo afectar la biodisponibilidad de nutrientes esenciales, como proteínas y minerales (Haros *et al.*, 2017). Los componentes mayoritarios de la quinoa se representan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Componentes mayoritarios de la quinoa en comparación con el trigo (representado como porcentaje en peso seco) (Valcárcel-Yamani *et al.*, 2012).

<b>Componente</b>	<b>Quinoa (%)</b>	<b>Trigo (%)</b>
<b>Proteínas</b>	13,80	14,3
<b>Lípidos</b>	5,04	2,3
<b>Carbohidratos</b>	69,00	78,4
<b>Minerales</b>	3,33	1,7

## INHIBIDORES DE PROTEASAS TIPO SERINA EN CEREALES Y PSEUDOCEREALES

Desde el punto de vista nutricional, los inhibidores de proteasas son sustancias antinutricionales que interfieren en la digestión de las proteínas, absorción o utilización metabólica de los aminoácidos. En cereales y pseudocereales, particularmente en su fracción de globulinas, se han identificado distintos inhibidores de proteasas. Éstos, principalmente ejercen una actividad inhibidora sobre amilasa y tripsina de bacterias, insectos y mamíferos. Los inhibidores de proteasas se clasifican dentro de los 'tipo serina' (SETIs) donde se han identificado 6 clases según la estructura terciaria que presentan: tipo Kunitz, tipo Knottin, tipo cereal, tipo tionina, tipo taumatina y tipo lectina. Los inhibidores tipo Kunitz se encuentran en cereales como la cebada, el trigo o el arroz, el tipo Knottin se encuentra en el amaranto y el tipo cereal en el trigo, centeno, cebada y raji (Wisessing *et al.*, 2012).

En el trigo, los inhibidores de proteasas de tipo serina constituyen una familia de hasta 17 globulinas que representan hasta el 4% del total de la fracción proteica (Kaliszewska *et al.*, 2016). Basándose en su bioactividad, los SETIs principales del trigo son CM3 y 0.19, los cuales se pueden encontrar como monómeros o unidos de forma no covalente formando compuestos heterólogos diméricos y tetraméricos (Capocchi *et al.*, 2013;

Zevallos *et al.*, 2017). En la quinoa, hasta el momento de redacción de este documento, solo hay descrita la presencia de la quenopodina y la globulina 2S. No obstante, sus potenciales inhibidores de proteasas no se han caracterizado, lo cual, constituye uno de los principales aspectos en los que se centra este trabajo.

## BIOACCESIBILIDAD DE LOS SETIs: INMUNONUTRICIÓN

La bioaccesibilidad es la fracción máxima que puede liberarse de la matriz del alimento y se mantiene soluble en el tracto gastrointestinal. Los datos actuales presentan conclusiones contradictorias sobre la bioaccesibilidad de los SETIs. Algunos estudios señalan que estos componentes presentan una resistencia parcial a la acción de los enzimas gastrointestinales debido a su actividad inhibidora de proteasas (Junker *et al.*, 2012; Kaliszewska *et al.*, 2016; Zevallos *et al.*, 2017). Desde un punto de vista fisiológico, es importante determinar estos aspectos ya que el impacto inmunometabólico de las proteínas dietéticas varía en función del grado de hidrólisis que sufran durante el tránsito gastrointestinal, así como sus propiedades tolerogénicas están en función de su digestibilidad (Michael 1989; Kaliszewska *et al.*, 2016). El estudio de estas propiedades tolerogénicas y/o inmunogénicas de los componentes nutricionales ha favorecido el desarrollo de áreas de estudio como la inmunonutrición.

La inmunonutrición es la capacidad de modular el sistema inmune mediante nutrientes específicos. De esta manera, se ha visto que componentes nutricionales pueden mantener o aumentar aspectos de la función celular inmune modificando la producción de mediadores inflamatorios (Calder 2003). En esta línea se encuentran los SETIs, ya que son capaces de activar la respuesta innata en monocitos, macrófagos y células dendríticas a través del receptor inmune innato tipo-Toll (TLR)-4, lo que provoca la activación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Junker *et al.*, 2012).

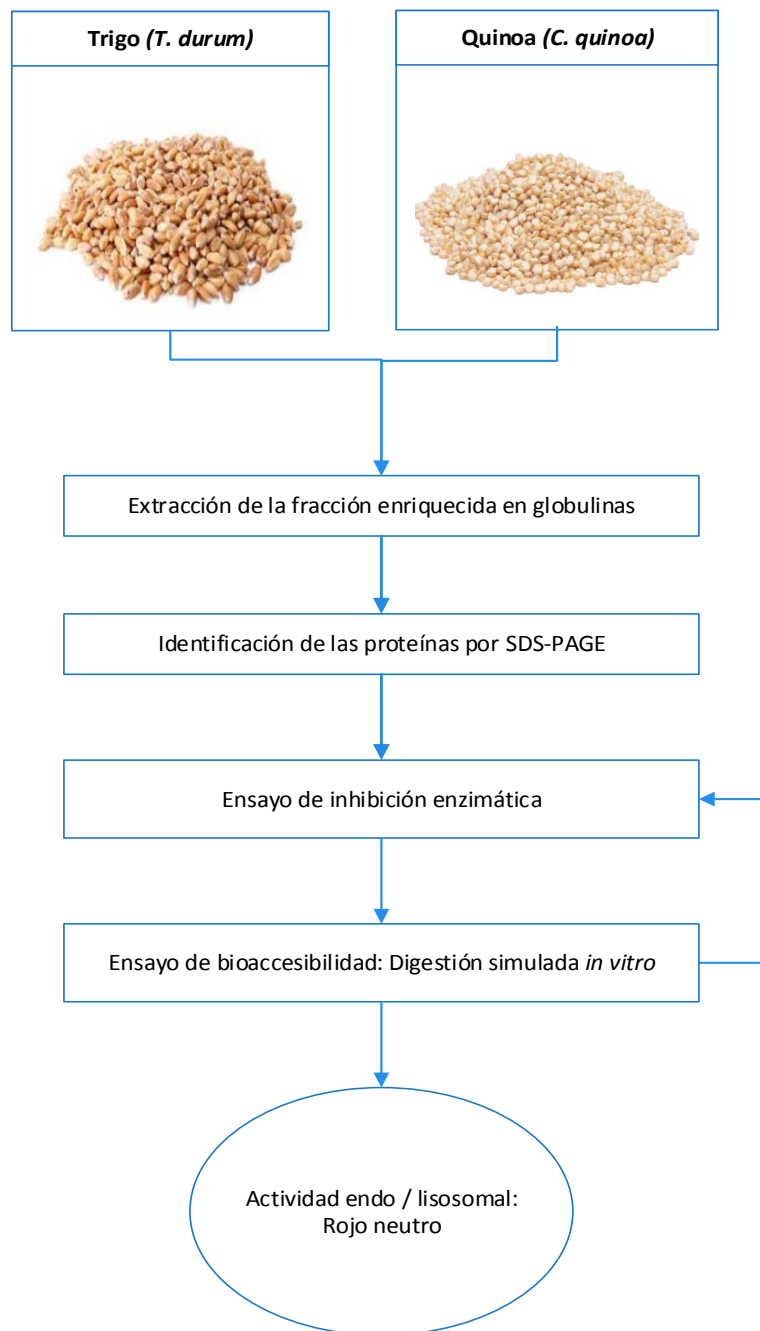
## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Este trabajo parte de la hipótesis de que los nuevos alimentos aportan componentes inmunonutricionales a la dieta y su bioaccesibilidad se ve condicionada en función de la matriz alimentaria.

Para comprobar esto, se propone como objetivo principal el valorar la proporción de SETIs en harinas de quinoa blanca (*Chenopodium quinoa*), como representante de los nuevos alimentos, y trigo (*Triticum durum*), de los que se estimará su bioaccesibilidad y mantenimiento de su actividad inhibidora de proteasas en esta fracción. Para ello, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Realizar extracciones proteicas soluble en soluciones salinas de harinas de quinoa y trigo.
- Caracterizar de forma cualitativa y fraccionar los extractos en función de su tamaño molecular con el fin de conocer los componentes moleculares que lo forman.
- Determinar la actividad inhibidora de proteasas de tanto los extractos como de las diferentes fracciones para conocer su actividad biológica.
- Valorar la digestibilidad de los diferentes alimentos y como esto puede afectar a la bioactividad de los SETIs.
- Estimar el impacto en la actividad metabólica del compartimento endosomal de macrófagos.

## PLAN DE TRABAJO



**Figura 3.** Diagrama de flujo del plan de trabajo seguido en el presente trabajo

## METODOLOGÍA

### MUESTRAS

En el presente estudio se utilizaron dos muestras comerciales de harina: quinoa blanca (*Chenopodium quinoa*) y trigo (*Triticum durum*).

### OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE SALINA

Para la extracción de la fracción enriquecida en globulinas de las muestras, se pesaron 0,5 gramos de estas y se adicionaron 10 mL de una solución salina tamponada (PBS, 137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) (Sigma-Aldrich). La mezcla se mantuvo en un agitador orbital con una intensidad moderada durante 2 horas. A continuación, se centrifugaron las muestras (4.000 g/15 min). Excepto en una muestra de trigo, como se presentará en el apartado de resultados, los sobrenadantes obtenidos se calentaron (60°C/30 min), y, posteriormente se obtuvo el sobrenadante por centrifugación (4.000 g/15 min). El contenido total proteico se cuantificó mediante lectura espectrofotométrica ( $\lambda=280$  nm, Nanodrop, ThermoFisher).

### ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)

El peso molecular de las proteínas se estimó mediante geles SDS-PAGE al 15%(p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla proteica comercial preteñida (10 a 170 kDA, BlueStar Prestained Protein Market de Nippon Genetic Europe). Los geles se dejaron correr a 60V-90V durante aproximadamente 1 hora y se revelaron con azul de Coomassie.

### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEASAS

La determinación de la actividad inhibidora de los SETIs en la fracción soluble se llevó a cabo basándose en el método descrito por Page *et al.*, (2000) con algunas modificaciones.

Como control de la actividad enzimática se utilizó pancreatina (Sigma-Aldrich) (actividad 8 x USP) y albúmina (Sigma-Alrich) como sustrato (relación 1:3) en medio de PBS (1x). Mientras que para el ensayo de actividad enzimática de las muestras se

utilizó una mezcla de pancreatina (0,3 mg/mL) y albúmina (1 mg/mL) junto con los extractos en una concentración de 0,03 mg/mL.

Para los experimentos se prepararon distintas muestras:

1. Control: solución de pancreatina junto a la albúmina
2. Muestra: solución de pancreatina junto a los extractos enriquecidos en globulinas y la albúmina.

Primero se pre-incubó la pancreatina junto a los extractos enriquecidos en globulinas (37°C/20 min). Posteriormente, se adicionó la albúmina (concentración final 1 mg/mL) en ambos lotes y se incubó de nuevo (37°C/1 h). Transcurrido este tiempo, se detuvo la reacción utilizando una solución de ácido tricloroacético (TCA, VWR Chemicals) al 2% (concentración final).

Finalmente, se midió la absorbancia por medio del NanoDrop (ThermoFisher) a una longitud de onda de 280 nm y se calcula el porcentaje de actividad SETI con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad SETI} = \left( 100 - \frac{\text{Abs muestra problema}}{\text{Abs control}} \right) \times 100$$

Los resultados de actividad inhibidora de proteasas se normalizaron utilizando el contenido total proteico.

## FRACCIONAMIENTO DE SETIs

El proceso para la obtención del fraccionamiento de SETIs en función de su tamaño molecular se llevó a cabo mediante tubos Amicon® con filtros de tamaño molecular de 30 kDa (Sigma-Aldrich) y 50 kDa (Sigma-Aldrich). Una alícuota (5 mL) de extracto se adicionó en el filtro de 50 kDa y se centrifugó (3.000 g / 20 minutos y 5.000 g / 10 min) para obtener el filtrado. Se recuperaron alícuotas tanto de los filtrados como de los sobrenadantes obtenidos que se utilizaron en filtraciones secuenciales de 30 kDa para posteriormente obtener el dializado con una membrana de 14 kDa para conseguir un mayor fraccionamiento del filtrado proteico.

## DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA: BIOACCESIBILIDAD DE SETIs

Tanto las muestras como los extractos obtenidos se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal simulada *in vitro* como se describe en Kaliszewska *et al.*, 2016. Para ello se emplearon enzimas de origen porcino: pepsina (Sigma-Aldrich) (250U/mg proteína), pancreatina (Sigma-Aldrich) (actividad 8 x USP) y extractos biliares (Sigma-Aldrich). Se utilizaron 3 mL de los extractos obtenidos y 300 mg de las muestras disueltas en 3 mL en PBS.

Para la fase de digestión gástrica, el pH de la mezcla se ajustó a un valor de 3 con HCl 1M, se adicionaron 0,93 mL de la disolución de pepsina en 0,1 M HCl a las distintas muestras y se incubaron (1 h/37°C) con una ligera agitación.

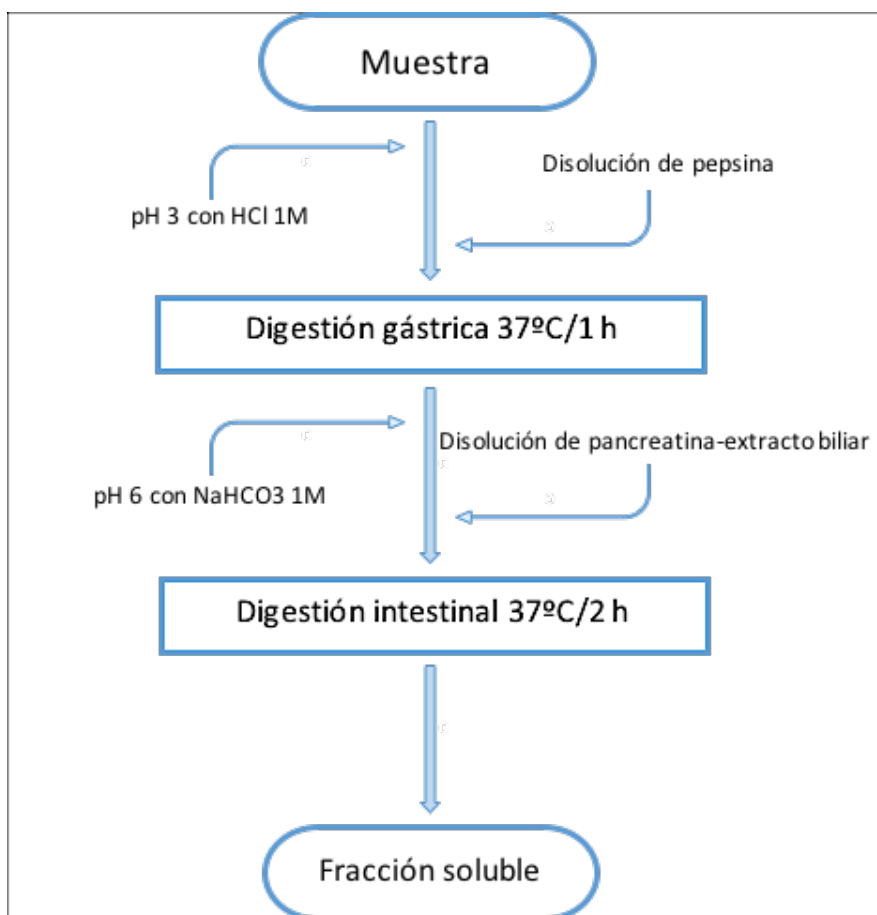
Para la fase de digestión intestinal, el pH de la mezcla se ajustó a un valor de 6 con NaHCO<sub>3</sub> 1M y se adicionó 1,19 mL de la disolución de pancreatina y extracto biliar en NaHCO<sub>3</sub> 0,1M. A continuación, se transfirió 1 mL de la mezcla a la cámara superior de un sistema bicameral con una membrana de diálisis con un tamaño molecular de 14 kDa y se incubó (2 h/37°C). En la **Figura 4** se muestra un esquema del proceso de digestión gastrointestinal simulado seguido en el presente trabajo.

El contenido total proteico se cuantificó mediante lectura espectrofotométrica ( $\lambda=280$  nm, Nanodrop, ThermoFisher).

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de digestión de las muestras, se calculó la bioaccesibilidad proteica y la actividad SETI. La bioaccesibilidad proteica se estimó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ bioaccesibilidad} = \left( \frac{S}{C} \right) \times 100$$

donde S, es el contenido total proteico en el compartimento aceptor (basal) (<14kDa) y C, el contenido total proteico en el compartimento dador (apical) (>14 kDa).



**Figura 4.** Proceso de digestión gastrointestinal simulada in vitro

#### ACTIVIDAD ENDOSÓMICA: ROJO NEUTRO

Para realizar los estudios de actividad endosómica se utilizaron Macrófagos WBC264-9C obtenidos de *American Type Culture Collection* (ATCC® HB-8902™) que fueron cultivados en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> en medio EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium N° 30 – 2003*) suplementado con 10% (v:v) de suero bovino fetal (FBS), penicilina/estreptomina al 1% y solución de L-glutamina 2 mM. Las células se incubaron a 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

La actividad endosómica se evaluó con el ensayo espectrofotométrico de captación de rojo neutro (rojo de toluleno, 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) para determinar la viabilidad celular en macrófagos siguiendo el procedimiento descrito por Borenfreund *et al.*, 1985. Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 20.000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas a 37°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y medio EMEM con FBS al 10%. A continuación, fueron

expuestas a los extractos de trigo y de quinoa (100 µg/ml en EMEM sin FBS) y se incubaron durante 1 hora. El medio de cultivo se eliminó y las células se tiñeron con solución rojo neutro al 0,33% (Sigma-Aldrich) en dilución 1/10 (30 min / 37°C/5% CO<sub>2</sub>). A continuación, se retiró el rojo neutro y se añadió una solución de ácido acético al 1% en etanol al 50%. La cuantificación de rojo neutro endocitado por los macrófagos se realizó mediante la lectura de la absorbancia de las muestras a 540 nm eliminando las absorbancias de fondo medidas a 690 nm.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el Excel del paquete de herramientas de Microsoft Office 2016. Para los datos de distribución normal se aplicó la prueba 't de Student' estableciendo la significación estadística en  $P < 0,05$  para todas las comparaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

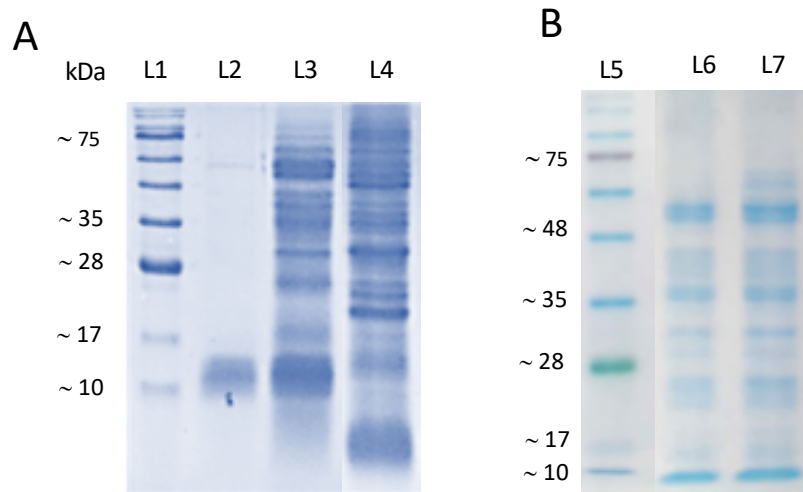
### PERFIL PROTEICO DE LA FRACCIÓN SALINA

El análisis de los extractos obtenidos de las harinas mediante SDS-PAGE (15%, p/v) demuestra la complejidad y variabilidad en las masas moleculares de los compuestos proteicos presentes en las mismas (**Figura 5A**).

En el extracto obtenido de quinoa se pueden encontrar marcas electroforéticas de 45-60kDa que podrían corresponder a la quenopodina. Esta proteína está formada por subunidades heterólogas de 49 kDa y 57 kDa que se asocian mediante enlaces no covalentes creando un hexámero. Cada subunidad consta de una cadena ácida de 34 kDa y una básica de 19 kDa unidas por puentes disulfuro (Brinegar *et al.*, 1993). Estas subunidades proteicas presentan un tamaño molecular similar al descrito para otros SETIs en avena (*Avena sativa*) (18 kDa), arroz (*Oryza sativa*) (20 kDa) o trigo (*Triticum aestivum*) (13 – 60 kDa) ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Para todos estos componentes y rangos de masas moleculares se ha descrito su actividad inhibidora de proteasas, así como su potencial para interactuar con el receptor inmune innato ‘tipo-Toll’ (TLR)-4 (Fernandez *et al.*, 2017; Laparra *et al.*, 2017). Además, se pueden observar componentes por debajo de los 10 kDa los cuales se pueden atribuir a la presencia de la globulina 2S, ya que coincide con el tamaño molecular descrito por la bibliografía (Brinegar *et al.*, 1996).

En la muestra de trigo, son destacables las señales electroforéticas entre 10-17 kDa que se corresponden con la masa molecular de componentes como CM3 y 0.19, como muestra el extracto comercial de CM3 (L2), y que han identificado otros grupos en harinas de otros tipos de trigo (*Triticum aestivum*) (Junker *et al.*, 2012). Otros SETIs identificados por estos autores son los compuestos 0.28, 0.53, CM16, CM17, CM1, CMX1 y CMX3 (Zevallos *et al.*, 2017). A este respecto hay que señalar que estudios proteómicos han determinado masas moleculares similares para todos ellos en el intervalo 13 -19 kDa ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Además, estudios previos en la harina de *Triticum durum* han identificado la presencia de complejos heterólogos tetraméricos de composición CM2(CM3)<sub>2</sub>CM16. Éste complejo correspondería a las marcas electroforéticas de aproximadamente 60 kDa (**Figura 5A**) y ha podido ser ‘reconstituido’ a partir de las

distintas subunidades individuales (Capocchi *et al.*, 2013) lo que parece indicar que las distintas subunidades proteicas no se conforman mediante enlaces ‘covalentes’, sino más bien electrostáticos. Además, las muestras de trigo se analizaron en geles PAGE (15%, p/v) sometidos o no a calentamiento (60°C) en el proceso de extracción observándose una diferente movilidad electroforética de las subunidades con masas molecular de aproximadamente 60 kDa (**Figura 5B**).

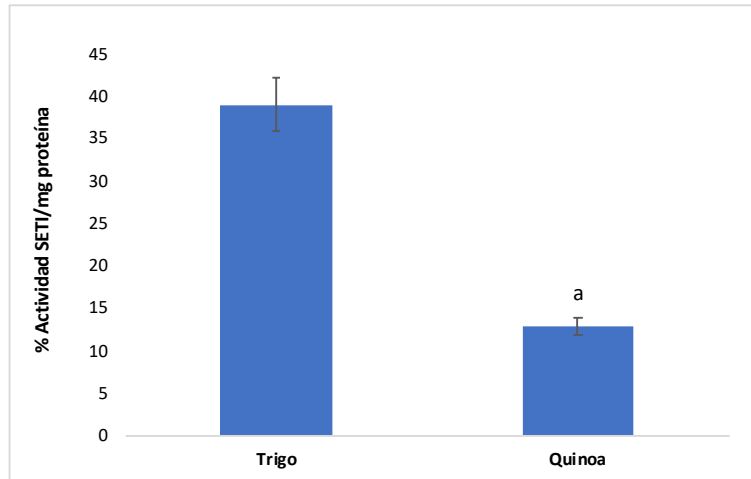


**Figura 5.** Patrón proteico de la fracción soluble en soluciones salinas de trigo (*Triticum durum*) y quinoa (*Chenopodium quinoa*). (A) L1 marcador de proteína, L2 inhibidor comercial de  $\alpha$  amilasa tripsina (*Triticum aestivum*), L3 trigo (*Triticum durum*) calentado, L4 quinoa (*Chenopodium quinoa*). (B) L5 marcador de proteína, L6 trigo (*Triticum durum*) calentado L7 trigo (*Triticum durum*) no calentado. Figuras completas en Anexos (Figura A1 y Figura A2).

En un intento de profundizar en el estudio de la identidad de los distintos componentes identificados, se llevó a cabo un análisis metaproteómico *in silico* de homología entre la globulina 11S de la quinoa y los componentes CM3, CM2 y CM16 del trigo utilizando la base de datos [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org). El análisis reveló una homología individual del 49% (**Figura 6**), 43% (**Figura A3**) y 43% (**Figura A4**), respectivamente, entre los residuos aminoácidos 1-161 de la globulina 11S.

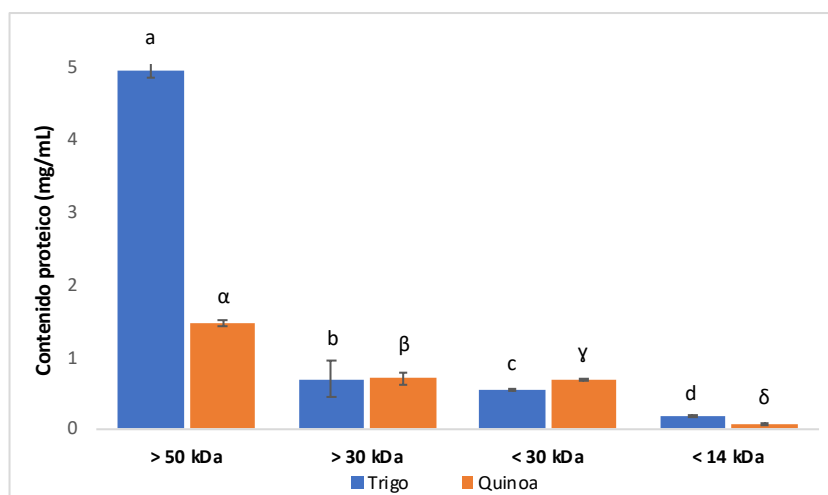


potenciales complejos presentes en el extracto de quinoa al cuantificarse menor actividad SETI.



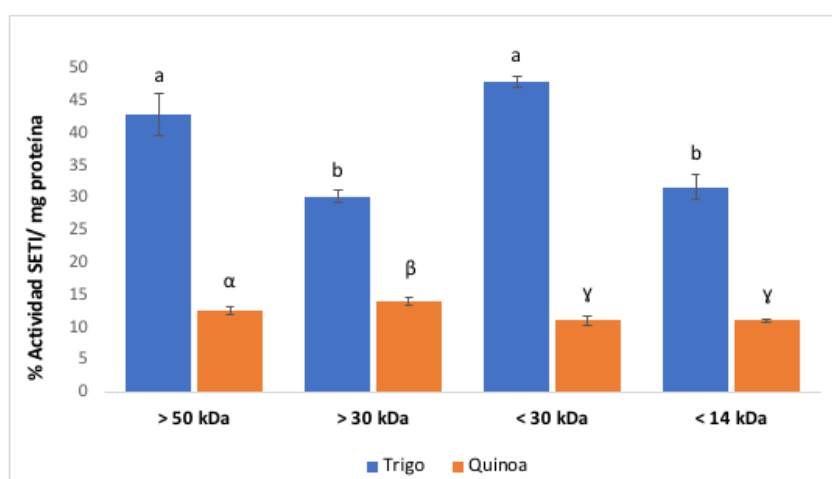
**Figura 8.** Actividad inhibidora de proteasas de extractos de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa* no filtrados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). La letra (a) indica diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

A partir del extracto obtenido de las harinas se procedió al fraccionamiento molecular del mismo para identificar la fracción proteica de mayor actividad SETI. Los resultados obtenidos (**Figura 9**) muestran que el contenido proteico de ambas muestras disminuye proporcionalmente al tamaño molecular. El elevado contenido proteico en la fracción mayor a 50 kDa en el trigo podría indicar la presencia de complejos heterólogos tetraméricos.



**Figura 9.** Contenido proteico las diferentes fracciones del extracto obtenido de la harina de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). Las letras latinas (a, b, c y d) indican diferencias significativas entre las fracciones de trigo ( $p < 0,05$ ). Las letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) indican diferencias significativas entre las fracciones de quinoa ( $p < 0,05$ ).

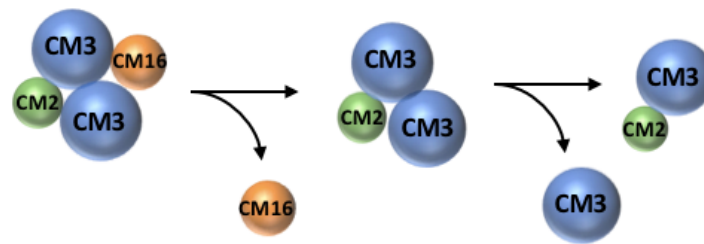
La cuantificación de la actividad SETI (**Figura 10**) muestra que es del 12% para la fracción mayor a 50 kDa obtenida de quinoa, la cual se mantiene constante en las fracciones de menor masa molecular. En el caso del trigo, la mayor actividad SETI se estima en la fracción menor a 30 kDa, aumentando un 23% en relación a la del extracto 'crudo' obtenido de la harina de trigo.



**Figura 10.** Actividad inhibidora en las diferentes fracciones del extracto obtenido de la harina de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). Las letras latinas (a y b) indican diferencias significativas entre las diferentes fracciones de trigo ( $p < 0,05$ ). Las letras griegas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) indican diferencias significativas entre las diferentes fracciones de quinoa ( $p < 0,05$ ).

Trabajos previos han descrito una diferente actividad SETI de las subunidades CM3, CM2 y CM16 utilizando amilasa humana, así como pancreatina porcina. Es importante destacar que en los estudios se utilizaron complejos heterólogos 'reconstituidos' determinándose que son los componentes CM3/CM2 aquellos que presentan mayor actividad inhibidora sobre la pancreatina (Capocchi *et al.*, 2013). Este complejo tiene un tamaño molecular inferior a 30 kDa, por lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

En vista de las variaciones de actividad SETI en las distintas fracciones de este trabajo y descritas por la bibliografía y, teniendo en cuenta la 'reconstitución' de las distintas subunidades, se plantea la siguiente hipótesis de disgregación de los complejos heterólogos en las muestras de trigo (**Figura 11**). La descomposición de los tetrámeros podría ocurrir, en primer lugar, con la pérdida de la subunidad CM16, para posteriormente sobrevenir la pérdida desde los trímeros de una subunidad CM3.



**Figura 11.** Representación esquemática de la descomposición de subunidades con actividad SETI en las muestras de *Triticum durum*.

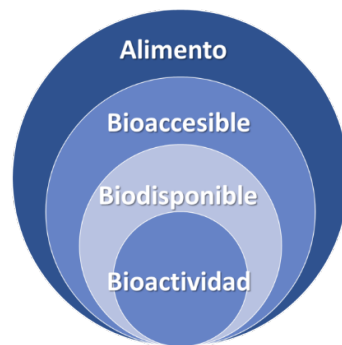
En el caso de la quinoa no se observa esta variación en la actividad SETI entre las distintas fracciones obtenidas, lo que parece indicar que la actividad SETI reside en un componente no aminoacídico de proteínas conjugadas.

El comportamiento de los complejos con actividad SETI plantea distintas opciones para la utilización de estos en estrategias preventivas y/o terapéuticas en el control de diversas patologías de base inmunometabólica (Wang *et al.*, 2011). Además de su capacidad para interactuar con el receptor TLR-4, pueden utilizarse en procesos de complementación proteica, atendiendo a la compatibilidad de las distintas subunidades o grupos prostéticos, de modo que estos puedan reconstituirse en los medios

fisiológicos durante el tránsito intestinal. Así, se procedió a estimar el potencial de bioaccesibilidad y proteólisis gastrointestinal.

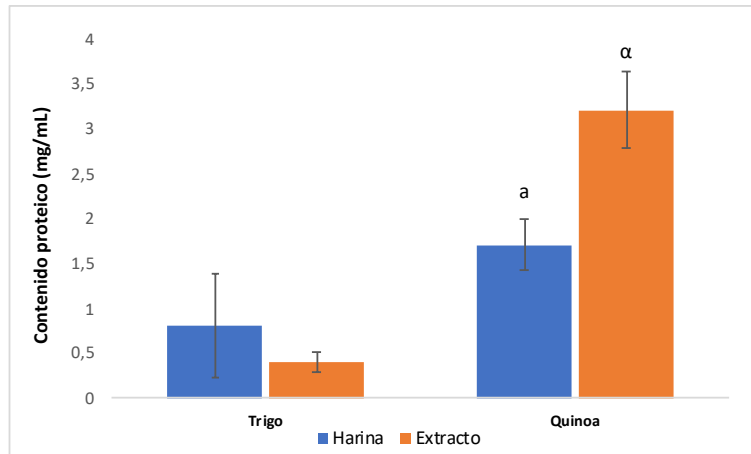
## BIOACCESIBILIDAD

Los estudios de bioaccesibilidad se han llevado a cabo utilizando condiciones de actividad enzimática y pH definidas en los medios fisiológicos (Ekmekcioglu 2002). En este trabajo se ha utilizado la fracción bioaccesible como estimador de la máxima actividad SETI que aportan los alimentos estudiados (**Figura 12**).



**Figura 12.** Relación esquemática entre la composición del alimento y la bioactividad de una determinada fracción alimentaria.

Los resultados de bioaccesibilidad obtenidos para las distintas muestras analizadas se muestran en la **Figura 13**. El contenido total proteico en el compartimento aceptor (basal) pone de manifiesto la menor digestibilidad de los extractos obtenidos de trigo en comparación con la quinoa. En los medios obtenidos de ambas muestras se obtuvo una actividad SETI similar (**Figura 14**), a pesar de las marcadas diferencias en el contenido proteico bioaccesible desde los extractos.



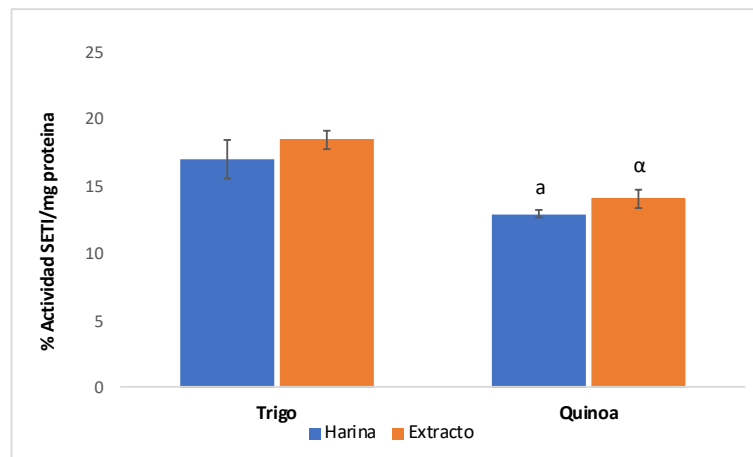
**Figura 13.** Contenido proteico tras la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* de extractos y harinas sin procesar de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). La letra (a) indica diferencias significativas entre las harinas ( $p < 0,05$ ). La letra ( $\alpha$ ) indica diferencias significativas entre los extractos ( $p < 0,05$ ).

A partir de estos datos se estima una bioaccesibilidad de los componentes con actividad SETI del 20% en el extracto y del 42% en la harina de trigo sin procesar. La fracción bioaccesible obtenida de la harina sin procesar presenta una actividad SETI (**Figura 14**) ligeramente superior a la del extracto. Sin embargo, ambas son notablemente inferiores a las fracciones sin digerir (**Figura 8**). Esto indica que en el trigo la inhibición enzimática es menor tras la digestión de los SETIs.

La quinoa presenta un grado de bioaccesibilidad superior al trigo, siendo del 28% en la harina sin procesar y del 53% en el extracto. En cuanto a la actividad SETI (**Figura 14**), es ligeramente superior en el extracto digerido, no obstante, no difieren de los extractos sin digerir.

Hay que señalar que tanto la harina sin procesar de quinoa como la de trigo presentan una actividad SETI similar. No obstante, se cuantifica un mayor contenido proteico en la fracción bioaccesible de quinoa. En el caso de trigo, parece reducirse el contenido proteico bioaccesible a partir de la harina. Esto indica que la matriz alimentaria interfiere en la digestibilidad de estos compuestos, si bien la quinoa presenta proteínas de mayor valor biológico. La ventaja inmunonutricional de la sustitución de harina de trigo por la de quinoa, en formulaciones panarias, ha demostrado mejorar el estado nutricional y homeostasis de hierro dietético (Laparra *et al.*, 2016) que va a influenciar la señalización del receptor TLR-4. Además, la incorporación de quinoa mejoró el ambiente

inmunometabólico, aumentando la expresión (mRNA) de los receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR)- $\gamma$  y retrasando en la liberación de glucosa en modelos preclínicos (Laparra *et al.*, 2018). Los PPAR se han identificado como reguladores clave del metabolismo de la glucosa y los lípidos, porque actúan como factores de transcripción que estimulan la síntesis de proteínas en una amplia variedad de procesos (metabolismo energético, proliferación y diferenciación celular).

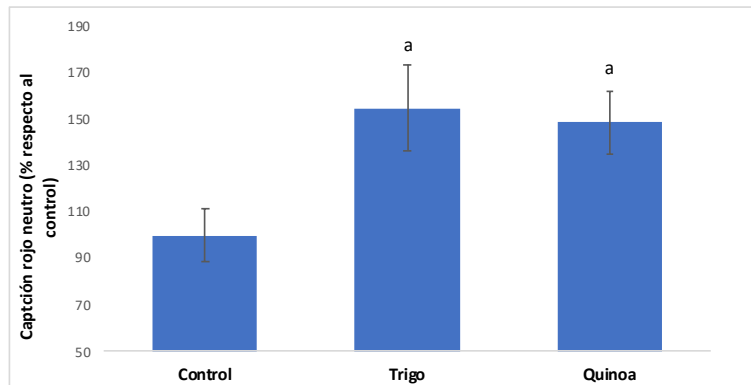


**Figura 14.** Actividad inhibidora de proteasas tras la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* de extractos y muestras de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa*. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). La letra (a) indica diferencias significativas entre las harinas ( $p < 0,05$ ). La letra ( $\alpha$ ) indica diferencias significativas entre los extractos ( $p < 0,05$ ).

## IMPACTO METABÓLICO EN MACRÓFAGOS

Los macrófagos son efectores críticos en el procesamiento antigénico y en la coordinación de la respuesta(s) inmune innata. Los extractos obtenidos de las harinas promueven los procesos de endocitosis en macrófagos en un breve intervalo de tiempo (1h) (**Figura 15**). Esto indica la rápida internalización celular de los componentes bioactivos presentes en el extracto. Así, podría esperarse una respuesta inmunometabólica similar para ambos alimentos. Es importante señalar que la vía de señalización endosomal de TLR-4 está influenciada por las constantes de disociación de los inhibidores de proteasas que están en función del pH intracelular (Gangloff 2012). Así, los datos existentes en la bibliografía, ponen de manifiesto que la incorporación de harina de quinoa en formulaciones panarias genera una menor respuesta inflamatoria

reflejándose en una menor concentración de hepcidina bioactiva circulante en los animales administrados (Laparra *et al.*, 2016).



**Figura 15.** Captación del rojo neutro por macrófagos tratados con extractos de *Triticum durum* y *Chenopodium quinoa*. Resultado expresado como porcentaje. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD (n=3). La letra (a) indica diferencias significativas entre las muestras y el control ( $p < 0,05$ )

A partir de los datos obtenidos se puede llevar a cabo una estimación hipotética del riesgo alimentario que podría suponer el consumo de quinoa en comparación al trigo. La bioaccesibilidad de los SETI a partir del trigo se estima en un 20%, mientras que desde la quinoa este valor resulta 1,4 veces superior, situándose en el 28%. Teniendo en cuenta estos datos y asumiendo una interacción similar con el receptor TLR-4 se debería esperar una mayor inmunogenicidad de la quinoa en relación al trigo. Por el contrario, la revisión bibliográfica señala que el consumo de quinoa (50g/6 semanas) no se refleja en una mayor severidad de los procesos inflamatorios gastrointestinales, sino en una aceptable tolerancia por parte de pacientes celíacos (Zevallos *et al.*, 2014). Esto parece sugerir que los SETIs derivados de ambos alimentos no inducen una señalización molecular 'idéntica' a través del receptor TLR-4, lo cual, se está utilizando para influenciar de modo selectivo la respuesta inmune innata a través de estrategias inmunonutricionales de precisión en distintas patologías de base inmunometabólica (i.e., obesidad, carcinoma hepático, diabetes tipo 2). Debido a estas controversias e incertidumbres, todavía no definidas, es conveniente evaluar estos resultados con modelos biotecnológicos que incorporen modelos celulares para estimar el impacto en la funcionalidad fisiológica celular y orgánica.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio confirman la hipótesis planteada y demuestran que los nuevos alimentos aportan compuestos inmunonutricionales activos a la dieta, concretamente inhibidores de proteasas de tipo serina (SETIs).

El análisis de los componentes moleculares de los extractos de harinas de quinoa (*Chenopodium quinoa*) y trigo (*Triticum durum*) mediante SDS-PAGE muestra marcas electroforéticas para ambos extractos dentro del rango de los 13-20 kDa, lo que coincide para lo descrito por la bibliografía para los inhibidores de proteasas de tipo serina de otros alimentos.

Los estudios de digestibilidad confirman que los inhibidores de proteasas de tipo serina son parcialmente resistentes a los procesos de digestión gastrointestinal y su fracción bioaccesible mantiene actividad inhibidora de los enzimas digestivos.

También se puede confirmar que la bioaccesibilidad de estos compuestos se ve condicionada por la matriz alimentaria, debido a una menor bioaccesibilidad en el trigo a pesar de que ambos presentan una actividad SETI similar.

## VALORACIÓN PERSONAL

Formar parte de esta investigación ha sido una experiencia muy enriquecedora que me ha permitido afianzar los conocimientos adquiridos durante los cuatro años de la carrera. He podido poner en práctica algunas de las técnicas estudiadas y he aprendido a interpretar resultados comparándolos con la bibliografía disponible, algo fundamental en un trabajo científico.

El estudio llevado a cabo durante estos meses me ha parecido muy interesante, ya que tiene como objetivo final mejorar formulaciones alimentarias con nuevos alimentos para facilitar la prevención y/o tratamiento de patologías de base inmunometabólica, llegando así a amplios grupos de población. Sin embargo, aun queda un largo camino para conseguir este objetivo.

## BIBLIOGRAFÍA

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 1985; 24:119–124.

Brinegar C, Goundan S. Isolation and Characterization of Chenopodin, the 11S Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993; 41:182–185.

Brinegar C, Sine B, Nwokocha L. High-Cysteine 2S Seed Storage Proteins from Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 1996; 44:1621–1623.

Calder PC. Immunonutrition. *British Medical Journal*. 2003; 327:117–8.

Capocchi A, Muccilli V, Cunsolo V, Saletti R, Foti S, Fontanini D. A heterotetrameric alpha-amylase inhibitor from emmer (*Triticum dicoccon* Schrank) seeds. *Phytochemistry*. 2013; 88:6–14.

Carbonero P, García-Olmedo F. A Multigene Family of Trypsin/ $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Cereals. *Seed Proteins* 1999; 617–633.

Ekmekcioglu C. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chem*. 2002; 76:225–230.

FAO-ALADI. Tendencias y perspectivas del comercio internacional de quinoa. 2014

Fernandez R, Laparra JM. Immunonutritional Protease Inhibitors from Rice: A Metaproteomic Analysis. *International Symposium on Immunonutrition*. 2017.

De Frutos MF, Fotschki B, Musoles RF, Moisés J, Llopis L. 2017. Gluten-Free Cereals and Pseudocereals: Nutrition and Health. *Bioactive Molecules in Food*. 2017; 1–18.

Gangloff M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? *Trends in Biochemical Sciences*. 2012; 37:92–98.

Haros M, Schoenlechner R. *Pseudocereals: Chemistry and Technology*. John Wiley & Sons. 2017.

Junker Y, Zeissig S, Kim S-J, Barisani D, Wieser H, Leffler DA, Zevallos V, Libermann TA, Dillon S, Freitag TL, Kelly C, Schuppan D. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *Journal of Experimental Medicine*. 2012; 209:2395–2408.

Kaliszewska A, Martinez V, Laparra JM. Proinflammatory responses driven by non-gluten factors are masked when they appear associated to gliadins. *Food Chemical Toxicology*. 2016; 95:89–95.

Laparra JM, Haros M. Inclusion of ancient Latin-American crops in bread formulation improves intestinal iron absorption and modulates inflammatory markers. *Food Function*. 2016; 7:1096–1102.

Laparra JM, Haros M. Inclusion of Whole Flour from Latin-American Crops into Bread Formulations as Substitute of Wheat Delays Glucose Release and Uptake. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2018; 73:13–17.

Laparra JM, Lee L, Gomez M, Ramirez A. 2017. Discerning the Role of Nutritional Protease Inhibitors in Hepatoblastoma Cells and Macrophages's Phenotype. *Immunonutritional Symposium on Immunonutrition 2017*.

Michael JG. The role of digestive enzymes in orally induced immune tolerance. *Children*. 1989; 8:382–402.

Sanz M. Nuevas estrategias para incrementar la calidad nutricional de productos de panadería. Efecto sobre el contenido de fitatos y la biodisponibilidad de hierro en cacao-2. 2012.

Valcárcel-Yamani B, Lannes SCDS. 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; 2:265–275.

Wang HH, Chen CL, Jeng TL, Sung JM. Comparisons of  $\alpha$ -amylase inhibitors from seeds of common bean mutants extracted through three phase partitioning. *Food Chemistry*. 2011; 128:1066–1071.

Wieser H, Susanne A, Seilmeier W. Quantitative Determination of Gluten Protein Types

on Wheat Flour by Reverse-Phase High-Performance Lipid Chromatography. *Cereal Chemistry*. 1998; 75:644–650.

Wisessing A, Choowongkamon K. Amylase Inhibitors in Plants : Structures , Functions and Applications. *Functional Plant Science Biotechnology*. 2012; 6:31–41.

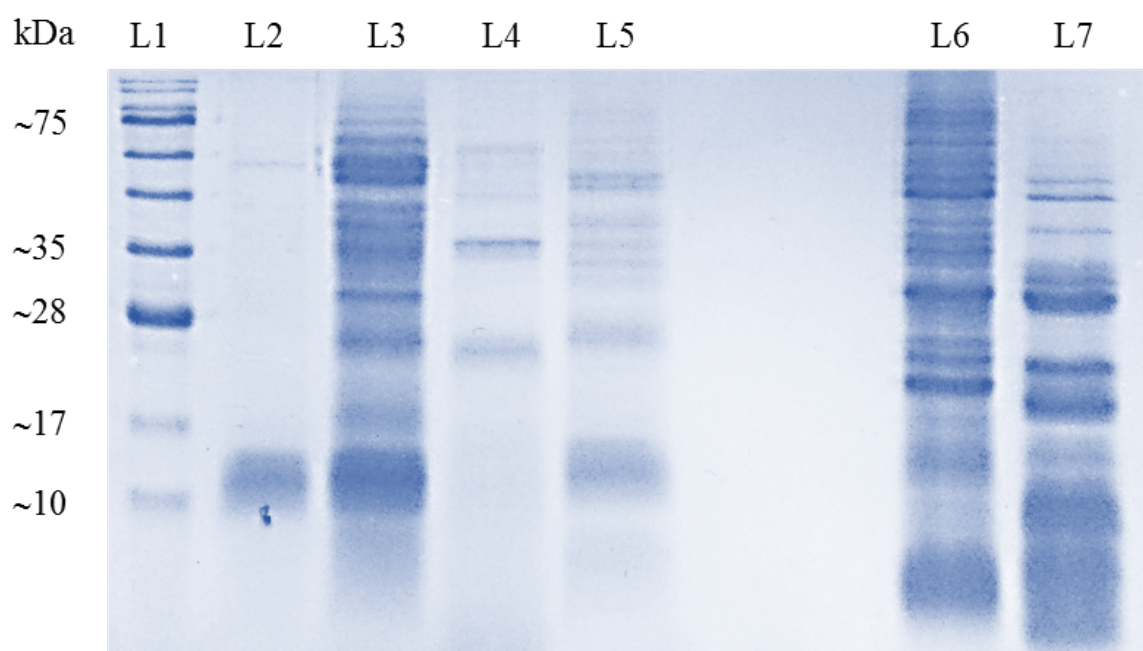
Zevallos VF, Herencia LI, Chang F, Donnelly S, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Gastrointestinal effects of eating Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) in celiac patients. *The American Journal of Gastroenterology*. 2014; 109:270–278.

Zevallos VF, Raker V, Tenzer S, Jimenez-Calvente C, Ashfaq-Khan M, Rüssel N, Pickert G, Schild H, Steinbrink K, Schuppan D. Nutritional Wheat Amylase-Trypsin Inhibitors Promote Intestinal Inflammation via Activation of Myeloid Cells. *Gastroenterology*. 2017; 152:1100–1113.

## ANEXOS

### ANEXO 1: ANÁLISIS SDS-PAGE

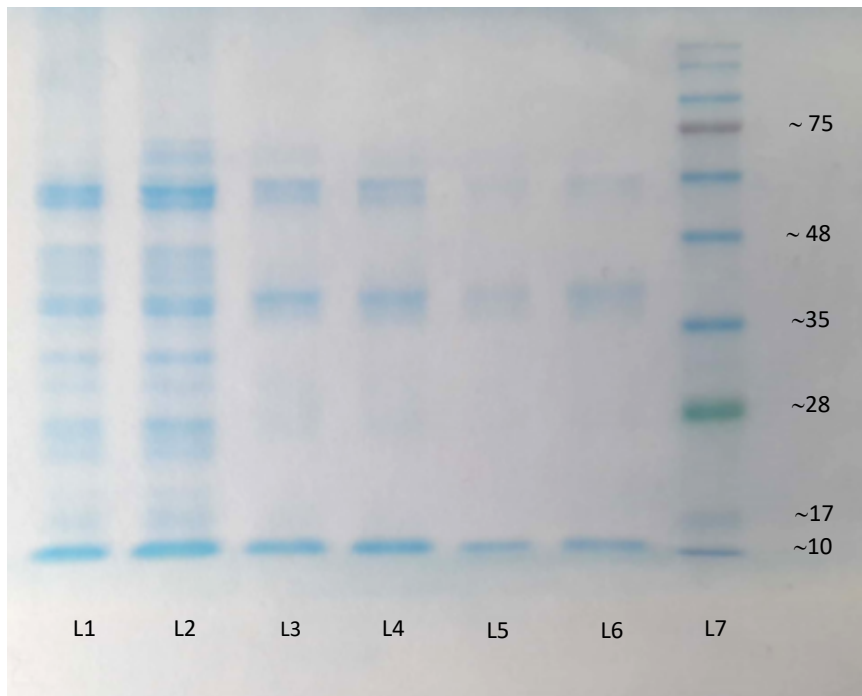
Figura 5A del texto completa con todos los componentes analizados.



**Figura A1.** Patrón proteico de la fracción soluble salina de diferentes muestras. L1 marcador de proteína, L2 inhibidor comercial de  $\alpha$  amilasa tripsina (*Triticum aestivum*), L3 trigo (*Triticum durum*), L4 avena (*Avena sativa*), L5 arroz (*Oryza sativa*), L6 quinoa (*Chenopodium quinoa*) L7 chía (*Salvia hispánica*).

## ANEXO 2: ANÁLISIS SDS-PAGE

Figura 5B del texto completa con todos los componentes analizados.



**Figura A2.** L1 trigo (*Triticum durum*) calentado en el proceso de extracción, L2 trigo (*Triticum durum*) no calentado en el proceso de extracción, L3 Macarrones comerciales calentados en el proceso de extracción, L4 macarrones comerciales no calentados en el proceso de extracción, L5 macarrones vegetales comerciales calentados en el proceso de extracción, L6 macarrones vegetales comerciales no calentados en el proceso de extracción, L7 marcador de proteína.



## ANEXO 4: HOMOLOGÍA DE SECUENCIA ENTRE CM2 Y QUENOPODINA

Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	1	MA-KSTTTFLLLSCSIAL-----VLLNGCMGQGRMREQGNECQI
P16851	IAAC2_WHEAT	1	MASKSSITHLLLA AVLVSVFAAAAATGPYCYPGMGLPSNPLEGREY-----VAQQTGCV
			** **: * :*: : . : . : * : * : : : * : :
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	40	DRLTA---LEPTYRIQAEGLTEVWDTQDQFQCSGVS-VIRRTIEPNGLLLPSFTSGPE
P16851	IAAC2_WHEAT	56	GIVGSPVSTEPGN-TPDRCKELYDA-SQHCRC EAVRYFIGRTSDPNSGVLK-----
			. : : * : : : . : * : : * : : * : * : * : * : *
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	96	LIYIEQNGISGLMIPGCPETFESMSQESWREGMERGMRRGFQDQHQKIRHLRQGHIFA
P16851	IAAC2_WHEAT	107	-----DLPGCPREPQDFAKV-----LVTPGHCV
			: * * : : : : : : * : *
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	156	MPAGVAHWAYNSGNEPLVAVILIDTSNHNQLDKDYPKRFYLAGKPPQEHSHHRRGGES
P16851	IAAC2_WHEAT	132	MT-----
			*
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	216	QRGEHSGDGNVFSGLDTKSVVQSFVGSEDIAEKLQAKQDERGNIVLVQEGLHVIKPPSSR
P16851	IAAC2_WHEAT	134	-----
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	276	SYDDEREQRHRSRPNGLLEETICSARLSENIDDPKADVYSPEAGRLTTLNSFNLPILSN
P16851	IAAC2_WHEAT	134	-----VHNTPYCLG
			. * * .
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	336	LRLSAEKGVLRYRNAIMAPHYNLNAHSIIYGVRRGRIGIIVNAQNSVFDDEL RQQLVVV
P16851	IAAC2_WHEAT	143	LDI-----
			* :
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	396	PQNFVAVKQAGEEGFEWIAFKTCENALFQTLAGRTSAIRAMPVEVISNIYQISREQAYRL
P16851	IAAC2_WHEAT	146	-----
Q6Q384	Q6Q384_CHEQI	456	KFSRSETTLFRPENQGRQRREMAA
P16851	IAAC2_WHEAT	146	-----

**Figura A4.** Homología de secuencia de los primeros 161 aminoácidos entre la globulina 11S y CM2.