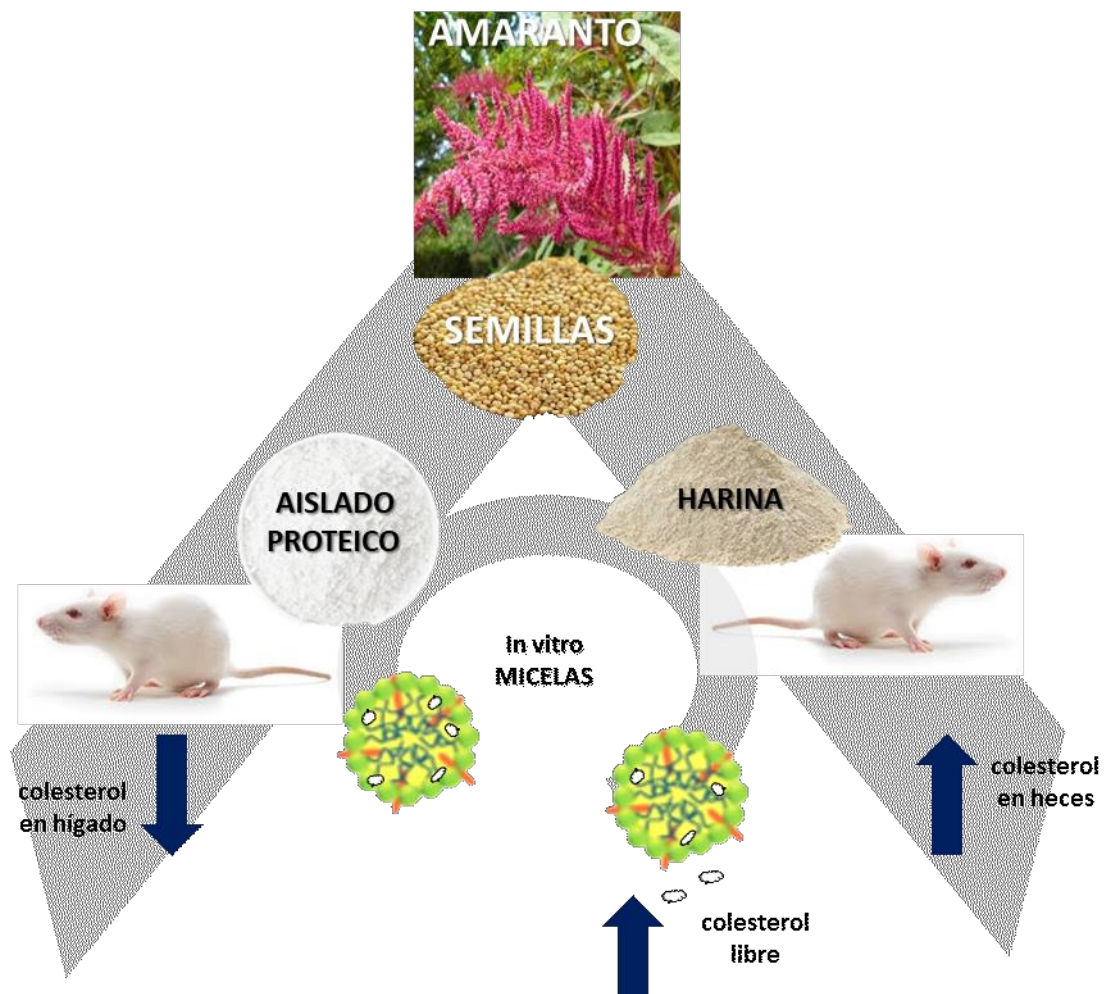


TESIS DOCTORAL

“Proteínas y fibra de amaranto: Actividad sobre el metabolismo de colesterol”



Lic. Martín Sebastián Sisti

Directora Dra. María Cristina Añón

Codirectora Dra. Adriana Alicia Scilingo

-2020-



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral:
“Proteínas y fibra de amaranto:
Actividad sobre el metabolismo de
colesterol”

Tesista: Lic. Martín Sebastián Sisti

Directora: Dra. María Cristina Añón

Codirectora: Dra. Adriana Alicia Scilingo

Año: 2020

El presente trabajo de tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP-CONICET, bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón y la codirección de la Dra. Adriana Alicia Scilingo.



CIDCA

CONICET

LA PLATA



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

"La Felicidad no es hacer lo que uno quiere, sino querer lo que uno hace"

Jean Paul Sartre

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, por permitirme formarme académicamente de forma libre y gratuita.

A CONICET, por la beca otorgada sin la cual hubiera sido imposible realizar este trabajo de tesis.

Al CIDCA por permitirme desarrollar mi trabajo experimental.

A Cristina y Adriana, por aceptar ser mis directoras de tesis, acompañarme en todo el proceso experimental y tenerme tanta paciencia en todo el proceso de escritura.

A mi familia, por brindarme la posibilidad de estudiar, sin ellos nunca habría llegado a concluir esta tarea.

A Jesica, quien me acompañó, ayudó y me escuchó durante estos 5 años.

A la Corta, quien siempre tiene una palabra de aliento y el poder de hacerme reflexionar en momentos complicados.

A Juan, Jhon, Delia, Sonia y Nati con quienes hemos compartido muchos kilómetros y tenemos una amistad invaluable.

A Ceci, por sus charlas al correr.

A Sandra Sharry y Cecilia Rivas, por darme la primera oportunidad y el empujón en este camino.

A Annie, por formarme en la mesada y generar en mí un criterio que aún me acompaña.

A Juan Pablo y Lucia, por ser papá Energía y mi hermanita Entropía con quienes compartimos muchas horas de laboratorio y sacarosa voladora.

Al grupo 7S, Ale, Pau y Agus. Con ellas siempre encontré un buen consejo, una buena charla o un buen lugar para quejarse sobre la cuestión de turno.

A todo el Zoobox: con ellos compartimos muchos momentos que van a quedar para la historia.

A todo el laboratorio de proteínas vegetales, lugar donde además de transcurrir la parte experimental de esta tesis, se forjaron valiosas amistades.

A Juan Lofeudo, por toda la ayuda con los animales de laboratorio.

A Gustavo Rinaldi, por su ayuda y aporte desinteresado en el ensayo con animales.

A Marisa Fernández, por su ayuda y aporte desinteresado en una temática nueva.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

Sisti, M.S., Scilingo, A. & Añón, M.C. (2019), Effect of the incorporation of amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) into fat and cholesterol rich diets for Wistar rats. *Journal of Food Science*, 84, 3075-3082. doi:10.1111/1750-3841.14810



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Metabolismo del colesterol	13
1.2 Dislipemias etiología y su implicancia en las enfermedades no transmisibles	20
1.3 Efecto de los componentes de la dieta sobre el metabolismo de los lípidos	23
1.4 Amaranto: características fenotípicas, fisiológicas y composición nutricional de sus semillas	26
1.5 Amaranto como alimento y fuente de componentes bioactivos	30
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
2.1 Hipótesis	35
2.2 Objetivo general	35
2.3 Objetivos específicos	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 Semillas de amaranto	37
3.2 Obtención de harina, aislado proteico de amaranto y sus digeridos	37
3.2.1 Obtención de la harina de amaranto (HA)	37
3.2.2 Obtención de aislado proteico de amaranto (AA)	37
3.2.3 Obtención de digeridos mediante digestión gastrointestinal simulada	38
3.3 Caracterización de las muestras	39
3.3.1 Composición centesimal de las muestras	39
3.3.2 Determinación del grado de hidrólisis	41
<i>Reactivos</i>	41
3.3.3 Electroforesis	42
3.3.3.1 Reactivos generales	43
<i>SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME</i>	43
<i>Tricina SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE+2-ME</i>	43
<i>Tinción con Coomassie Brilliant Blue</i>	44
<i>Tinción con plata</i>	44
3.3.3.2 Preparación de las muestras	44
3.3.3.3 Proteínas patrón de masa molecular	45
3.3.3.4 Desarrollo de los geles y condiciones de corrida	45
<i>SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME</i>	45
<i>Tricina SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE+ 2-ME</i>	46
3.3.3.5 Fijación, coloración y decoloración de los geles	46
<i>SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME</i>	46
<i>Tricina SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE+ 2-ME</i>	46
3.3.3.6 Obtención de imágenes y análisis de los geles	47
3.3.4 Caracterización cromatográfica	47
3.3.4.1 Cromatografía rápida para proteínas (FPLC)	48

<i>Equipo</i>	48
<i>Preparación de las muestras</i>	48
<i>Desarrollo</i>	48
<i>Calibración</i>	49
3.3.4.2 Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)	50
<i>Equipo</i>	50
<i>Preparación de las muestras</i>	50
<i>Desarrollo</i>	50
3.3.5 Fibra de dietética amaranto	51
3.3.5.1 Obtención de fibra dietética	51
<i>Reactivos</i>	52
<i>Procedimiento</i>	52
3.3.5.2 Caracterización de la fibra dietética por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	53
<i>Obtención de las muestras</i>	53
<i>Fibra dietética</i>	53
<i>Almidón de amaranto</i>	54
<i>Obtención de los espectros</i>	54
3.4 Ensayo <i>in vivo</i>	55
3.4.1 Modelo animal	55
3.4.2 Diseño del ensayo	55
3.4.3 Preparación de las dietas	56
3.4.4 Procesamiento de las muestras biológicas y determinaciones realizadas	57
3.4.4.1 Muestras biológicas: plasma, hígado y materia fecal	57
3.4.4.2 Determinaciones	58
<i>En plasma</i>	58
<i>En hígado</i>	60
<i>En materia fecal</i>	61
3.5 Ensayos <i>in vitro</i>	63
3.5.1 Cambios en el contenido de colesterol de micelas modelo	63
<i>Obtención de las micelas modelo</i>	63
<i>Ensayo de desplazamiento de colesterol</i>	63
<i>Medida del tamaño de las micelas por medio de ensayos de dispersión dinámica de luz</i>	64
3.5.2 Estudio de la interacción entre ácidos biliares y proteínas o péptidos de la semilla de amaranto mediante resonancia plasmónica de superficie	65
<i>Fundamentos de la técnica</i>	65
<i>Diseño experimental e inmovilización de las muestras</i>	67
4. Material suplementario de Materiales y Métodos	69

<i>Obtención de digeridos mediante digestión gastrointestinal simulada</i>	70
<i>Obtención de fibra dietética de amaranto</i>	71
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE I	72
5.1 Ensayos <i>in vivo</i>	73
5.2 Alimentación de los animales	73
5.2.1 Dietas, formulación y composición	73
5.2.2 Consumo de alimento y crecimiento de los animales	81
5.3 Perfiles lipídicos en plasma, hígado y materia fecal	83
5.3.1 Animales alimentados por largo tiempo con una dieta conteniendo proteínas de amaranto en baja proporción	83
5.3.2 Animales alimentados por corto tiempo con dietas conteniendo proteínas de amaranto en alta proporción	93
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PARTE II	98
6.2 Ensayos <i>in vitro</i>	99
6.2.1 Determinación de la composición centesimal y caracterización de los digeridos	100
6.2.2 Ensayos de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol	113
6.2.3 Análisis de las interacciones entre ácidos biliares y proteínas en tiempo real por resonancia plasmónica de superficie (SPR)	122
7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	132
8. BIBLIOGRAFÍA	137



1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo del colesterol

El colesterol juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad y fluidez de las membranas de las células animales. Representa entre el 25 y 30 % del total de los lípidos de dichas membranas. Es un lípido insaponificable derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, constituido por cuatro anillos fusionados que contienen un doble enlace, un grupo hidroxilo y una cola de ocho átomos de carbono (**Figura 1**).

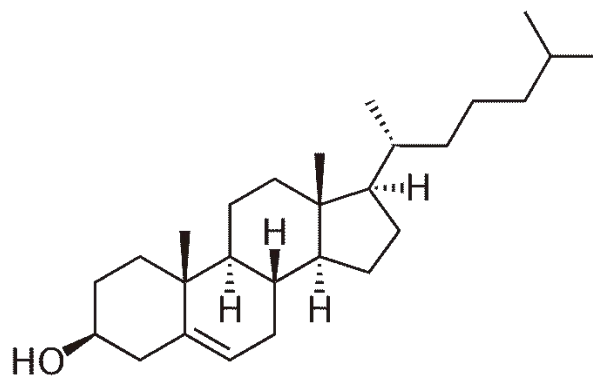


Figura 1 Estructura química del colesterol.

Dentro de las membranas celulares la porción hidrofóbica del colesterol se ubica entre las colas no polares de los fosfolípidos que la integran y previene la fuga de distintos componentes hidrosolubles. Además de las funciones de regulación de la membrana, el colesterol es el precursor de la biosíntesis de la vitamina D, de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas (Vance & Van Den Bosch, 2000).

La mayoría de las células eucariotas son capaces de sintetizar colesterol, pero su tasa de producción varía dependiendo del tipo celular y del órgano al que pertenece la célula. En humanos, en el hígado se sintetiza alrededor del 50 % del

colesterol mientras que se produce en menor cantidad en el intestino, las glándulas suprarrenales y las gónadas. En las células la síntesis *de novo* del colesterol ocurre a través de una ruta metabólica altamente regulada conocida como la vía del mevalonato (**Figura 2**). En esta vía, dos moléculas de acetil-CoA forman acetoacetil-CoA; éste se combina con otra molécula de acetil-CoA y luego se hidrata formando 3-hidroxi3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA); esta reacción es catalizada en el citoplasma por la enzima HMG-CoA sintetasa. El siguiente paso es la reducción del HMG-CoA a mevalonato por la enzima HMG-CoA reductasa (**Figura 2**) que ocurre en el retículo endoplasmático y es NADPH dependiente. El mevalonato se convierte en 3-isopentil pirofosfato, precursor del farnesil pirofosfato que se utiliza para la síntesis de escualeno mediante tres reacciones ATP dependientes. El escualeno se convierte en lanosterol a través de una serie de ciclaciones y migraciones de hidrógenos y metilos. Finalmente, el colesterol se sintetiza a partir de lanosterol en varias reacciones que incluyen oxidaciones, reducciones y desmetilaciones. Todas estas reacciones ocurren en el retículo endoplasmático (Arnold & Kwoiterovich, 2003; Vance & Van Den Bosch, 2000).

Uno de los pasos regulados en la síntesis del colesterol es el catalizado por la enzima HMG-CoA reductasa. Esta enzima se ubica en la membrana externa del retículo endoplasmático. Posee varios dominios transmembrana y un dominio catalítico que convierte HMG-CoA en mevalonato. El dominio catalítico se halla ubicado hacia el citosol (extremo C-terminal), mientras que los dominios transmembrana tienen un rol regulatorio de la actividad de la enzima, son sensibles a las concentraciones intracelulares de esteroides y cambian su conformación al interactuar con ellos. Por ello, cuando el nivel de colesterol celular es alto, cambia la conformación de esta enzima disminuyendo su actividad. Por otro lado, cuando los niveles de colesterol intracelular disminuyen, se incrementa la transcripción y traducción de las enzimas responsables de la síntesis del colesterol, en particular de la HMG-CoA

reductasa, como así también de las responsables de captar colesterol exógeno como el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL). De esta manera los niveles de colesterol intracelular aumentan (Arnold & Kwiterovich, 2003; Vučić & Cvetković, 2016).

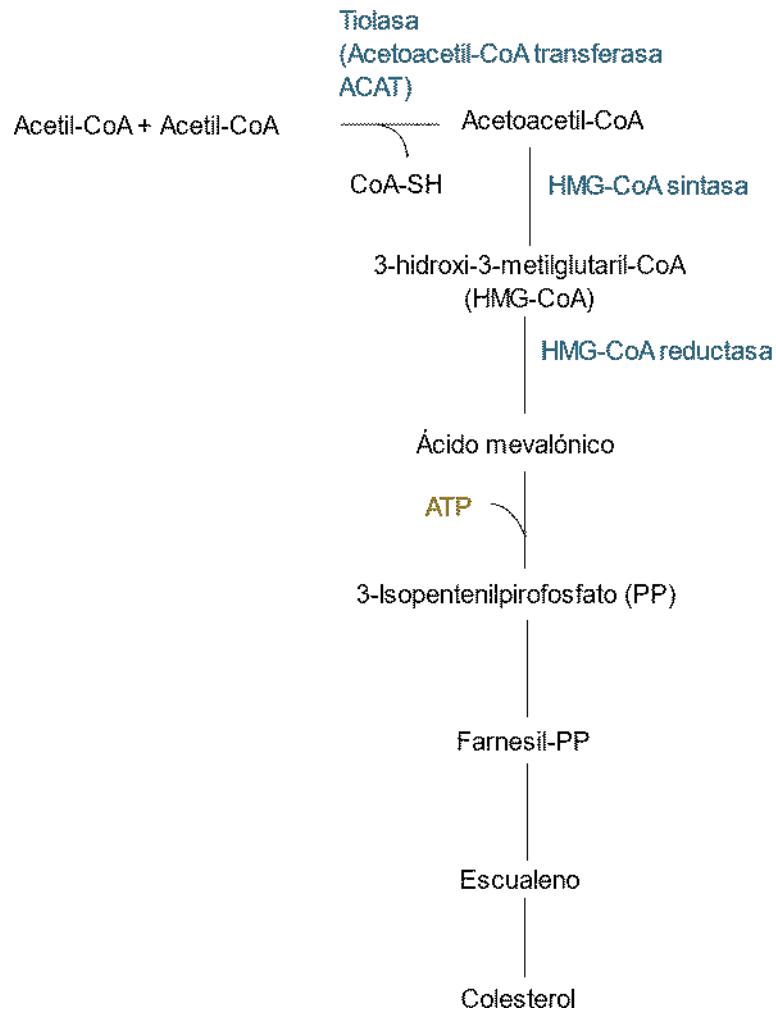


Figura 2 Esquema que representa la vía del mevalonato resumida indicando algunos sustratos, productos y enzimas (en azul).

Además del colesterol endógeno (*síntesis de novo*), los humanos pueden obtener colesterol de la dieta. Diariamente los seres humanos obtienen alrededor de 800-1000 mg de colesterol a partir del acetil-CoA y alrededor de 300 mg de la dieta (Maldonado Saavedra, Ramírez Sánchez, García Sánchez, Ceballos Reyes & Méndez Bolaina, 2012, **Figura 3**).

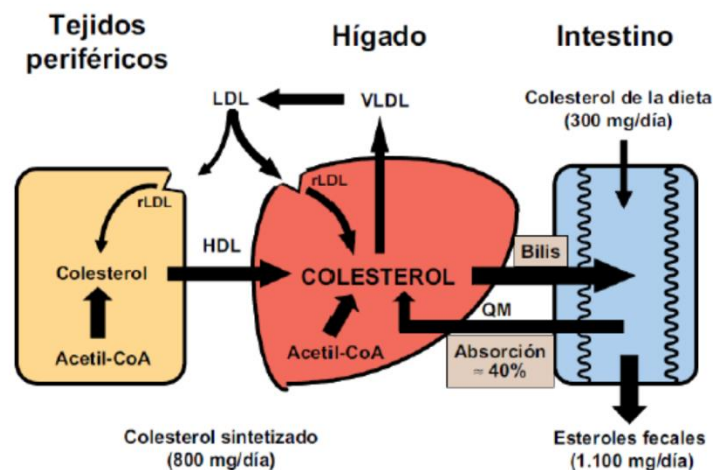


Figura 3 Esquema del flujo de colesterol en humanos (Maldonado Saavedra et al., 2012).

Los órganos responsables de la homeostasis del colesterol en los humanos son el intestino y el hígado. El intestino regula la absorción del colesterol proveniente de la dieta, su excreción vía heces y además interviene en la reabsorción de los ácidos biliares excretados por la vesícula biliar. El hígado controla los niveles en sangre y la eliminación del colesterol a través de la secreción o captación de las distintas especies de lipoproteínas (Vučić & Cvetković, 2016). Las lipoproteínas son complejos macromoleculares formados por un núcleo hidrofóbico rico en triacilglicéridos y ésteres de colesterol, rodeado de una monocapa de fosfolípidos y colesterol no esterificado donde se encuentran insertas las distintas apolipoproteínas. Las apolipoproteínas son capaces de actuar como cofactores y ligandos de enzimas o receptores que intervienen en el metabolismo de los lípidos (**Figura 4**).

Existe una gran variedad de lipoproteínas entre las cuales se encuentran las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), IDL (lipoproteínas de densidad intermedia), HDL (lipoproteínas de alta densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad).

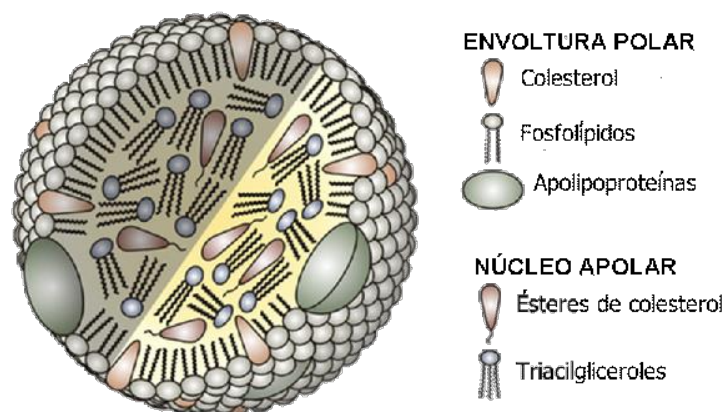


Figura 4 Esquema de una lipoproteína modelo, mostrando el núcleo hidrofóbico rico en triacilglicéridos y ésteres de colesterol y la membrana anfífilica compuesta por fosfolípidos y colesterol libre con apolipoproteínas insertas (Carrero Ayuso & Sánchez Herráez, 2009).

Todas ellas se diferencian en su composición proteica y lipídica, presentando menor densidad a medida que aumenta su contenido de lípidos (Furgione et al., 2009; Soca, 2015; Voet, Voet & Pratt, 2016) (**Tabla 1**).

Tabla 1 Composición y características de las lipoproteínas presentes en la sangre.

	Quilomicrones	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densidad (g/cm³)	< 0,95	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Diámetro (Å)	750-12000	300-800	250-350	180-250	50-120
Masa (kDa)	400000	10000-80000	5000-10000	2300	175-360
% proteínas	1,5-2,5	5-10	15-20	20-25	40-55
% fosfolípidos	7-9	15-20	22	15-20	20-35
% colesterol	1-3	5-10	8	7-10	3-4
% triacilglicéridos	84-89	50-65	22	7-10	3-4
% ésteres de colesterol	3-5	10-15	30	35-40	12
Principales apolipoproteínas	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

(Voet, Voet & Pratt, 2016).

Para que el colesterol proveniente de la dieta pueda ser absorbido por los enterocitos, debe ser previamente solubilizado en micelas formadas por ácidos biliares, fosfolípidos, tri, di y monoacilglicéridos y en el caso de que se encuentre formando un éster con un ácido graso hidrolizado. La absorción del

colesterol en la mucosa intestinal a nivel del borde en cepillo, está facilitada por el transportador Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) (Sané et al., 2006). Este transportador colocaliza con otros dos transportadores de la familia *ATP-binding cassette* (ABC), ABCG5 y ABCG8, que promueven la excreción de colesterol libre en exceso hacia el lumen intestinal. La actividad de estos transportadores mantiene constante la concentración intracelular de colesterol libre (Hui & Howles, 2005). El colesterol absorbido por los enterocitos y que no es expulsado, es esterificado en el retículo endoplasmático a través de la enzima colesterol aciltransferasa (ACAT) y empaquetado, en lipoproteínas denominadas quilomicrones junto con triacilglicéridos y fosfolípidos, que luego pasan a la linfa (**Figura 5**).

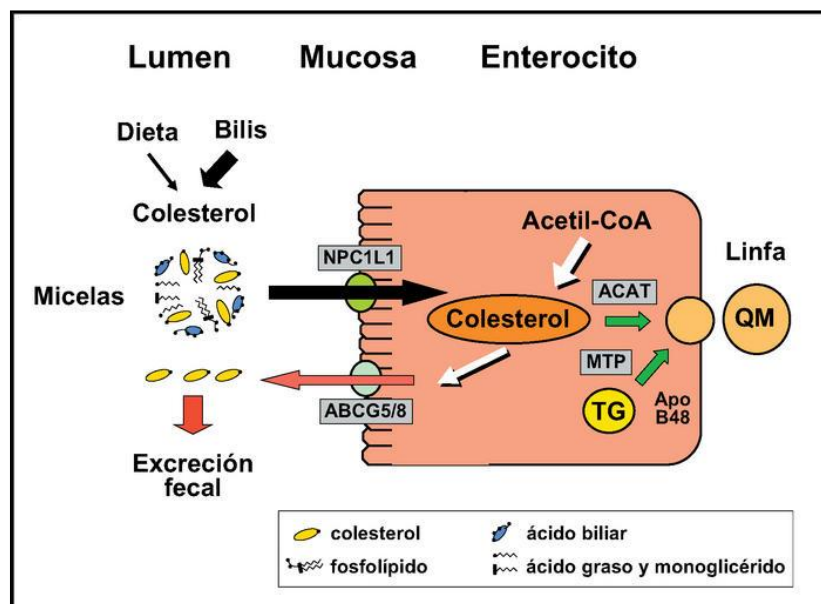


Figura 5 Esquema del flujo del colesterol en el enterocito, QM: quilomicrones, TG: triacilglicéridos, ACAT: colesterol aciltransferasa, MPT: proteína microsomal transportadora de triacilglicéridos, ApoB48: apolipoproteína B-48, NPC1L1: transportador Niemann-Pick C1-Like 1 y ABCG5/8: transportador *ATP-binding cassette* subfamilia G (Ugarte, Sanchez Tuero, Beaufort, Alvarez & Menéndez, 2010).

Luego que los quilomicrones son exportados hacia el torrente linfático son volcados al torrente sanguíneo a nivel de la vena subclavia por el conducto linfático derecho y el conducto torácico. Una vez en el torrente sanguíneo, la

lipoproteína lipasa (LPL) presente en los lechos capilares hidroliza algunos de los triacilglicéridos presentes en los quilomicrones convirtiéndolos en remanentes de quilomicrones (QMr). Estos QMr son secuestrados por el hígado y convertidos en lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (**Figura 6**). Las lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL, son fuente de ácidos grasos que proveen energía al músculo o son almacenados en el tejido adiposo. A medida que avanza la hidrólisis de los triacilglicéridos por la lipoproteína lipasa, las VLDL se convierten en partículas de lipoproteínas de baja densidad, LDL, ricas en colesterol y fosfolípidos. Las LDL son responsables de distribuir el colesterol en los tejidos periféricos y sus niveles en sangre están directamente relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Arnold & Kwiterovich, 2003; Röhrl & Stangl, 2018). Estas lipoproteínas son captadas por células que necesitan colesterol mediante receptores específicos (LDLR), e internalizadas por endocitosis. Una vez dentro de la célula, el colesterol es liberado hacia la membrana plasmática, el retículo endoplasmático y las mitocondrias (**Figura 6**). Cuando existe un exceso de colesterol en los tejidos extrahepáticos, las células lo entregan a lipoproteínas de alta densidad HDL del torrente sanguíneo por medio de los transportadores ABCA1/G1. Estas lipoproteínas son sintetizadas en el hígado y son las responsables de transportar el exceso de colesterol hacia los tejidos que utilizan esta molécula como precursor biosintético o nuevamente hacia el hígado donde el colesterol es eliminado por un proceso de transporte reverso. Para ello las HDL circulantes son captadas por el hígado mediante el receptor específico SR-B1 (*scavenger receptor class B type 1*). Una vez que las HDL están en la célula hepática, el colesterol es convertido en ácidos biliares y almacenado como bilis en la vesícula biliar. Luego la bilis es volcada al intestino delgado y los ácidos biliares pueden ser reabsorbidos y reciclados, o excretados vía heces. Por otro lado, existen evidencias de una vía alternativa de eliminación del colesterol, denominada excreción del colesterol transintestinal (TICE), en la que el

colesterol sanguíneo sería eliminado a través del intestino. Esta vía está aún en estudio y se desconocen sus mecanismos (Dietschy & Wilson, 1970; Ros, 2000; Vučić & Cvetković, 2016).

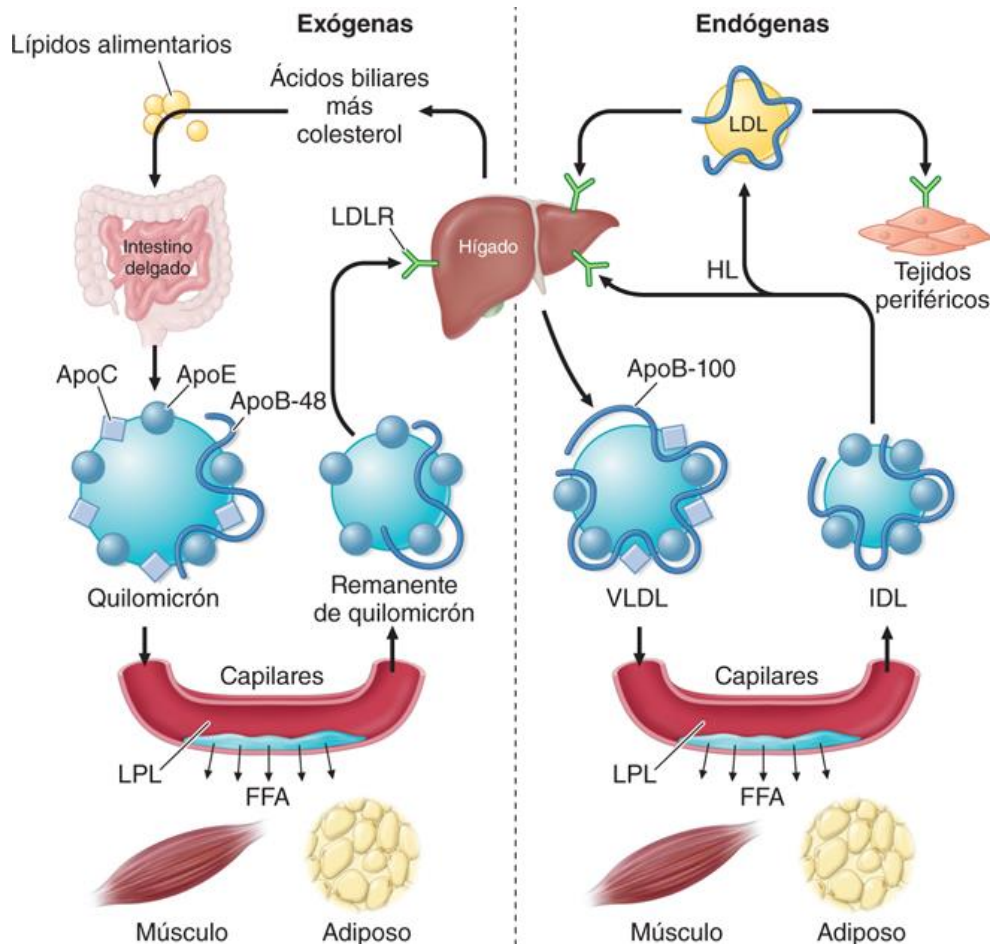


Figura 6 Flujo de colesterol desde y hacia el hígado mediado por distintas lipoproteínas. Las apolipoproteínas nombradas representan a cualquier componente de la familia a la que pertenecen. Lipoproteína lipasa (LPL), ácidos grasos libres (FFA), lipoproteína de baja densidad (LDL), receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), lipoproteína de densidad intermedia (IDL) (Kasper et al., 2019).

1.2 Dislipemias: etiología y su implicancia en las enfermedades no transmisibles

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades no transmisibles son afecciones de larga duración con una progresión generalmente lenta. Entre

ellas, se encuentran los infartos de miocardio o los accidentes cerebrovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas como la neumopatía obstructiva o el asma y la diabetes (Hunter & Reddy, 2013).

Las enfermedades no transmisibles afectan a todos los grupos etarios, regiones y países. Aunque suelen asociarse a los grupos de edad más avanzada, los datos muestran que 15 millones de las muertes atribuidas a estas enfermedades se producen en personas cuyas edades se encuentran entre los 30 y los 69 años. Más del 85 % de estas muertes “prematuras” ocurren en países de medianos y bajos ingresos.

Los principales factores de riesgo que aumentan la incidencia de las enfermedades no transmisibles se relacionan con hábitos de la población. Entre ellos podemos mencionar el consumo de dietas no saludables, la inactividad física, la exposición al humo del tabaco y/o el consumo nocivo de alcohol. Las dietas no saludables y la inactividad física pueden inducir tensión arterial elevada, aumento de glucosa y lípidos en sangre y obesidad (Ministerio de Salud de la Nación, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2012).

Entre las afecciones que inciden en el riesgo de padecer alguna enfermedad no transmisible, como por ejemplo cardiopatías o accidentes cerebrovasculares, se encuentran las dislipemias. Este término hace referencia a cualquier alteración en la síntesis, transporte o metabolismo de las lipoproteínas que modifique la concentración plasmática de colesterol total o de triacilglicéridos.

En función de su etiología, las dislipemias pueden clasificarse en primarias o secundarias. Las primarias se deben a mutaciones en los genes que codifican las proteínas responsables del metabolismo lipoproteico, generando niveles elevados de triacilglicéridos y/o de colesterol en sangre, mayores a 150 y 200 mg/dL respectivamente, o niveles bajos de HDL, inferiores a 50 mg/dL. En función del tipo de apolipoproteína o receptor en el que haya ocurrido el defecto, pueden encontrarse distintos tipos de dislipemias primarias (Furgione et al., 2009):

- 1) Hipercolesterolemia primaria causante de niveles elevados de LDL por defectos en el receptor de LDL o en su ligando, la Apo B-100.
- 2) Hipertriacilgliceridemia primaria, ocasionada por varias alteraciones como sobreproducción de VLDL, defectos en la Apo E, mutaciones en la lipoproteína lipasa, Apo C-II o Apo C-III.
- 3) Hiperlipidemias mixtas como la disbetalipoproteinemia familiar producto de un defecto en la Apo E.
- 4) Hipoalfalipoproteinemias, donde bajos niveles de HDL y deficiencia de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa son causados por defectos genéticos en varios *loci* cromosomales que controlan la expresión de la apolipoproteína Apo A-I y de la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT).
- 5) Hipobetalipoproteinemia familiar, donde una mutación del gen que codifica la Apo B-100 provoca un bajo nivel plasmático de LDL y Apo B-100. Clínicamente se manifiesta con aumento de las enzimas hepáticas, intolerancia oral y malabsorción intestinal a las grasas e hígado graso.
- 6) Abetalipoproteinemia, donde una mutación en el gen MTP que codifica a una proteína microsomal transferidora de triacilglicéridos que contribuye a la carga de lípidos de la ApoB-100 en hígado e intestino provoca bajos niveles de VLDL y LDL con ausencia de Apo B-100.
- 7) Enfermedad de retención de quilomicrones (ERC) que se caracteriza por ausencia de Apo B-48 en plasma generando malnutrición y retardo en el crecimiento. Se produce por una mutación en el gen SAR1B que codifica para una proteína implicada en el transporte de los quilomicrones desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi, provocando una acumulación de vesículas de transporte pre-quilomicrones en el citoplasma del enterocito.

Las dislipemias de origen secundario son las más frecuentes y se asocian a un amplio espectro de situaciones fisiológicas, desórdenes metabólicos y patologías. La dislipidemia secundaria más frecuente es la asociada a la diabetes mellitus. En estos casos, pueden presentarse distintos perfiles lipoproteicos anómalos. El hipotiroidismo es la segunda causa de dislipidemia secundaria, y en él la alteración más frecuente es la elevación del nivel de LDL. Otras causas relevantes de hiperlipidemia secundaria que se expresan con fenotipos diferentes son la enfermedad renal, las hepatopatías crónicas y agudas, la obesidad, el síndrome de Cushing, las hipergammaglobulinemias, el consumo excesivo de alcohol y el uso de algunos fármacos, tales como diuréticos tiazídicos, glucocorticoides, anticonceptivos orales, beta bloqueadores, inhibidores de la proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana o ciclosporinas (Boldova Aguar, Cenarro Lagunas, Gonzalvo Liarte & González García, 2004).

En las dislipemias primarias, los tratamientos no sólo consisten en medidas dietéticas y farmacológicas sino también en terapéuticas específicas y complejas, que pueden llegar a incluir trasplante de hígado o aféresis de LDL. En cambio, en las dislipemias secundarias el tratamiento se orienta hacia la causa de base que genera la alteración lipídica que, como hemos mencionado en el párrafo anterior, puede ser de diverso origen. En estos casos, se emplean medidas farmacológicas que intentan corregir la patología de base, dietas específicas y se indica la realización de actividad física (Brites, Gómez Rosso, Meroño, Boero & Rivera, 2010; Furgione et al., 2009).

1.3 Efecto de los componentes de la dieta sobre el metabolismo de los lípidos

Existe una gran cantidad de publicaciones que describen el efecto de los distintos componentes aportados por la dieta sobre el metabolismo de los

lípidos. Estos componentes podrían actuar a distintos niveles ya sea en el tracto gastrointestinal o, luego de ser absorbidos, en algún órgano diana.

García-Díez, García-Mediavilla, Bayón & González-Gallego (1996) estudiaron el efecto que ejerce la pectina, un tipo de fibra soluble presente en semillas de amaranto como así también en otros tipos de semillas, frutas y verduras, en un ensayo con animales. Estos autores describieron que cuando los animales fueron alimentados con una dieta rica en pectina, aumentó la excreción de ácidos biliares por heces, con una concomitante disminución de los niveles de colesterol en hígado y sangre. García-Díez et al. (1996) atribuyeron la disminución del contenido de colesterol hepático a su conversión en ácidos biliares a fin de mantener los niveles de ácidos biliares constantes y propusieron que la pectina ejerce su efecto hipocolesterolémico aumentando la viscosidad dentro del lumen intestinal, disminuyendo la cantidad de colesterol disponible para ser absorbido y/o capturando ácidos biliares. Asimismo, Kushi, Meyer & Jacobs (1999) luego de analizar una gran cantidad de estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos, Inglaterra, Finlandia e Irlanda, relacionaron el consumo de cereales y legumbres con la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, dando particular importancia a la fibra dietética aportada.

Algunas proteínas alimentarias al ser ingeridas y atacadas por las enzimas del sistema digestivo liberan péptidos bioactivos. Estos péptidos pueden ejercer distintos efectos biológicos como por ejemplo actuar sobre el metabolismo del colesterol. Hasta el momento los mecanismos propuestos para estos efectos son variados. Beynen (2011) asoció el efecto de la incorporación de proteínas de soja a la dieta de animales de laboratorio con un aumento en la excreción fecal y de la síntesis de ácidos biliares, un incremento en la excreción de esteroides neutros y el aumento del número de receptores hepáticos de Apo B-100 y E. Además, observó un descenso en la concentración de colesterol en el hígado. Ruiz, Ancona & Campos (2014) estudiaron el efecto de proteínas y péptidos dietarios

provenientes de la soja, la clara de huevo, el trigo sarraceno, la leche y el pescado sobre el metabolismo del colesterol. Estos autores observaron una disminución de la solubilidad micelar de colesterol en ensayos *in vitro* y un aumento en la excreción fecal de colesterol *in vivo*. Ruiz et al. (2014) describieron en un *review* sobre proteínas y péptidos de origen vegetal dos péptidos hipocolesterolemiantes comerciales provenientes de soja, LunaSoy® y LunasinXP®, capaces de ejercer un efecto similar a las estatinas, y reducir los niveles de HMG-CoA reductasa a través de la disminución de su expresión génica. Marques et al. (2015) estudiaron la actividad de péptidos provenientes de proteínas de caupí sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulada. Hallaron que estos péptidos tienen la capacidad de disminuir la solubilidad micelar del colesterol e inhibir la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa *in vitro*. Nagaoka, Masaoka, Zhang, Hasegawa & Watanabe (2002) analizaron el efecto que ejerce la ovomucina, una proteína que se encuentra en la clara de huevo, sobre la solubilidad micelar del colesterol y sobre el metabolismo del colesterol en ratas y en células Caco-2 utilizadas como sistema modelo del epitelio intestinal. Sus resultados indican que esta proteína tiene la capacidad de disminuir la solubilidad micelar del colesterol y de captar ácidos biliares *in vitro*, mientras que aumenta la excreción por heces de esteroides en ratas y disminuye la captación de colesterol por las células Caco-2. Boachie, Yao & Udenigwe (2018) y Howard & Udenigwe (2013) analizaron los trabajos existentes sobre los posibles mecanismos a través de los cuales los péptidos liberados en la digestión modulan el metabolismo del colesterol a nivel intestinal. Uno de los mecanismos propuestos es que los péptidos interfieren con el colesterol durante la formación de las micelas o compiten con éste por un lugar en la monocapa de la micela una vez que ya está formada. Otro mecanismo es que estos péptidos interaccionen con los ácidos biliares, impidiendo su participación en la formación de las micelas o evitando su reabsorción. Por último, un tercer mecanismo es que estos péptidos

interaccionen con los transportadores de colesterol en la membrana de los enterocitos impidiendo la interacción con el ligando natural. En conjunto estos tres mecanismos afectarían el metabolismo del colesterol incrementando la excreción de esteroides vía heces y por lo tanto desbalanceando el flujo enterohepático de los mismos. Así, al disminuir la reabsorción de ácidos biliares, el hígado necesitaría utilizar mayor cantidad de colesterol para sintetizarlos y luego verterlos en la bilis.

1.4 Amaranto: características fenotípicas, fisiológicas y composición nutricional de sus semillas

El amaranto (*Amaranthus* spp.), como la quinoa (*Chenopodium quinoa*) y el trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), es considerado un pseudocereal porque tiene características fenotípicas y fisiológicas tanto de los cereales (*Poaceae*) como de las legumbres (*Fabaceae*). Los cereales son plantas monocotiledóneas en las que durante la germinación su cotiledón sirve como el principal órgano fotosintético en las primeras etapas del desarrollo de las plántulas. En contraste, las leguminosas son plantas dicotiledóneas con un sistema vascular ramificado cuyas semillas están encerradas en vainas. Pueden crecer como arbustos pequeños, por ejemplo, los porotos (*Phaseolus vulgaris*) y los garbanzos (*Cicer arietinum*), o como plantas verticales ramificadas como la soja (*Glycine max*). Las semillas del amaranto se desarrollan en panículas que se asemejan a espigas de cereales y su tallo central crece de manera vertical, alcanzando alturas de 3 a 5 m. Las inflorescencias axilares y terminales están dispuestas en espigas o panículas cilíndricas (Olán et al., 2012). Al igual que las leguminosas, el amaranto es una planta dicotiledónea. Desarrolla múltiples tallos secundarios en los que crecen las panículas más pequeñas, tiene una vascularización ramificada de hoja ancha y algunas especies silvestres parecen arbustos pequeños. Como el maíz y la caña de azúcar, el amaranto es una planta anual

clasificada como C4, en la que el primer producto fotosintético es un compuesto de cuatro carbonos. La combinación en el amaranto de características anatómicas y del metabolismo C4 da como resultado una mayor eficiencia de fijación de dióxido de carbono en una amplia gama de entornos de estrés por temperatura y humedad. Esto le otorga al amaranto una amplia adaptabilidad geográfica. Sus semillas son lisas, brillantes y ligeramente aplanadas, de forma lenticular. Su tamaño varía entre 0,9 y 1,7 mm de largo y 1,0 y 1,3 mm de ancho y su peso entre 1000 y 3000 semillas/g (**Panel A, Figura 7**). La mayor parte de la semilla es el embrión, que consiste en una radícula y los cotiledones. El embrión está rodeado por el endospermo y es el principal órgano de almacenamiento de las proteínas de la semilla, contenidas en cuerpos proteicos empaquetados junto con lípidos intercalados en la matriz (**Paneles B y C, Figura 7**). También, aunque en menor cantidad, podemos encontrar cuerpos proteicos dentro del endospermo y del perispermo almidonoso (Velarde-Salcedo, Bojórquez-Velázquez & Barba de la Rosa, 2019).

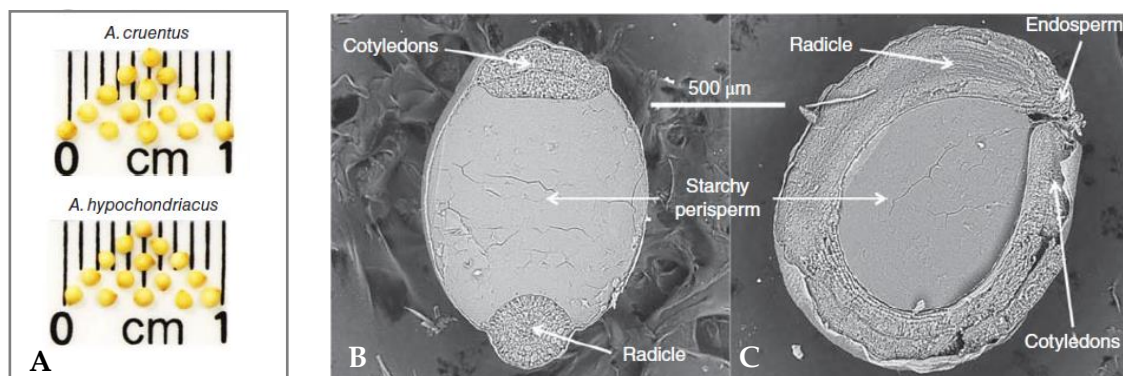


Figura 7. Semillas de amaranto. Panel A Fotografías de semillas de dos variedades de amaranto *cruentus* e *hypochondriacus*. Paneles B y C Microscopía electrónica de barrido de una semilla de *A. hypochondriacus*, corte axial (B) y corte longitudinal (C), mostrando sus partes: perispermo almidonoso (*Starchy perisperm*), radícula (*Radicle*), cotiledones (*Cotyledons*) y endospermo (*Endosperm*) (Velarde-Salcedo et al., 2019).

Desde el punto de vista nutricional, las semillas de amaranto presentan una composición única y atractiva ya que contienen más proteínas, lípidos y

minerales que el maíz, el trigo, el sorgo y algunas especies de arroz, aunque una menor cantidad de almidón (**Tabla 2**). Como en la mayoría de los cereales y pseudocereales, el componente más abundante de las semillas de amaranto es el almidón, que puede variar entre 65 y 72 %. Los gránulos de almidón tienen un tamaño pequeño, 1-3 μm , y su forma varía entre las especies, angular y poligonal en *A. hypocondriacus* y esférica en *A. cruentus* (Fan, 2017).

Tabla 2 Composición centesimal de amaranto y algunos cereales.

Componente ^a	Amaranto ^b	Maíz ^c	Trigo ^c	Arroz ^d
Proteína	14,9–19,3	7,1–8,2	10,5–14,5	1,9–4,8
Lípidos	6,9–9,1	3,5–3,9	1,6–1,9	0,6–6,8
Almidón	65,5–71,7	84,3–86,3	79,0–84,0	87,6–94,6
Fibra cruda	2,8–7,4	2,0–2,3	2,5–2,6	2,1–2,4
Cenizas	2,6–4,4	1,1–1,3	1,4–2,0	1,2–2,1

^a porcentajes en base seca, ^bBressani, 1994; ^cLee, Nam & Kong, 2016; ^dOko & Ugwu, 2011; ^{c,d}Velarde-Salcedo et al., 2019.

El valor nutricional o la calidad nutricional de las proteínas alimentarias varía con la composición de aminoácidos, la proporción de aminoácidos esenciales, la susceptibilidad a la hidrólisis durante la digestión y los efectos del procesamiento (Friedman, 1996). El alto valor nutricional de las proteínas de la semilla de amaranto se debe a su composición aminoacídica, ya que la proporción de aminoácidos esenciales es cercana a la recomendada por la OMS para la alimentación humana (**Tabla 3**). Además presentan un valor de digestibilidad alto (90 %) similar al del trigo y del maíz, y un valor biológico del 86 %, lo que indica una buena disponibilidad de los aminoácidos esenciales (Friedman, 1996; Pedersen, Kalinowski & Eggum, 1987).

Las semillas de amaranto contienen más lípidos que la mayoría de los cereales (**Tabla 2**). Su aceite tiene aproximadamente 25 % de ácidos grasos saturados, 75 % de ácidos grasos insaturados (**Tabla 4**), y una fracción insaponificable rica en tocoferoles y escualeno.

Las semillas de amaranto pueden presentar entre 8 y 16 % de fibra dietética, valores comparables al contenido de fibra en el trigo pero superiores al del maíz

(Lamothe, Srichuwong, Reuhs & Hamaker, 2015). En general, la fibra dietética de amaranto está compuesta por xiloglucanos y polisacáridos pécticos. Los monosacáridos que forman parte de la fibra dietética insoluble, que corresponde al 78 % de la fibra dietética total, son ácido galacturónico, arabinosa, galactosa, xilosa y glucosa. La fibra soluble (22 %) está formada por glucosa, ácido galacturónico y arabinosa (Lamothe et al., 2015).

Tabla 3 Perfil aminoacídico de distintas variedades de amaranto.

Aminoácido ^a	Variedades de amaranto			FAO/OMS ^d	
	<i>hypocondriacus</i>	<i>cruentus</i>	<i>caudatus</i>	Adulto	Niño
Histidina	5,1	5,4	1,6		
Cisteína	3,0	2,9	2,3		
Isoleucina	3,3	5,2	3,8	3,0	3,2
Leucina	5,4	5,3	6,1	5,9	6,3
Lisina	4,6	5,3	6,1	1,6	5,2
Metionina	1,4	1,7	2,9		
Fenilalanina	4,1	3,8	3,7		
Treonina	3,4	5,3	3,8	0,9	2,7
Triptófano	1,8	0,81	1,1	0,5	7,0
Tirosina	3,5	3,2	2,8		
Valina	3,7	4,1	4,4	1,3	4,1
Met + Cis ^b	4,1	4,6	4,7	2,2	2,5
Phe + Tyr ^c	7,7	7,1	6,2	3,8	4,6

^a los valores están expresados como g de aminoácido/100g de proteína, ^b sumatoria de aminoácidos azufrados, ^c sumatoria de aminoácidos aromáticos y ^d recomendación de consumo de aminoácidos esenciales (Dodok, Modhir, Buchtová, Halásová & Poláček, 1997; Huerta-Ocampo & Barba de la Rosa, 2011; Millward, 2012).

Finalmente, la fracción polifenólica de las semillas de amaranto está constituida mayoritariamente por tres polifenoles: rutina, isoquercetina y nicotiflorina.

Tabla 4 Ácidos grasos mayoritarios presentes en distintas variedades de amaranto.

	% Ácidos grasos						
	Saturados			Insaturados			
	TOTAL	C16:0	C18:0	TOTAL	C18:1	C18:2	C18:3
<i>A. hypocondriacus</i>	23,0	18,1	4,6	77,0	26,7	49,4	0,9
<i>A. cruentus</i>	27,9	20,3	3,8	72,1	19,4	51,4	1,3
<i>A. caudatus</i>	23,2	19,4	3,8	76,8	25,3	50,9	0,6

(Velarde-Salcedo et al., 2019). Algunas especies de amaranto contienen trazas de ácidos grasos 14:0, 16:1, 20:0, 20:1 y 22:0, que no se tuvieron en cuenta al momento de calcular los porcentajes presentados en la Tabla por ser transientes (Jahaniaval, Kakuda & Marcone, 2000).

La rutina se encuentra presente en concentraciones de 10,1 $\mu\text{g/g}$ de harina y la nicotiflorina de 7,2 $\mu\text{g/g}$ de harina (Barba de la Rosa et al., 2009). También contiene ácidos fenólicos como el ácido p-hidroxibenzoico (1,2–2,2 $\mu\text{g/g}$ de harina), ácido siríngico (0,7–0,8 $\mu\text{g/g}$ de harina) y ácido vanílico (1,5–1,8 $\mu\text{g/g}$ de harina).

1.5 Amaranto como alimento y fuente de componentes bioactivos

Existen alrededor de 60 especies diferentes de amaranto, aunque no todas se consumen como alimento. Las hojas de *Amaranthus blitus*, *A. tricolor*, *A. cruentus*, *A. dubius*, *A. edulis* y *A. hypochondriacus* se usan en ensaladas y sopas. Los granos de *A. caudatus*, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. hybridus* y *A. mantegazzianus* se usan en panes, tortas, galletas, dulces y sopas, mientras que especies como *A. retroflexus*, *A. viridis* y *A. spinosus*, no son aptas para el consumo humano (Caselato-Sousa & Amaya-Farfán, 2012). Para ser consumidas, las semillas de amaranto se procesan de diversas maneras, una de las más populares es en forma de grano expandido o popeado. Otros procesos incluyen el hervido, extruido, tostado, incorporado en copos (hojuelas) y pastas y horneado en galletas (Bressani, De Martell & De Godínez, 1993). En México, el *A. cruentus* se utiliza para fabricar una golosina llamada "alegría", en la que se emplea el grano popeado (Irving, Betschart & Saunders, 1981). En Asia, se utiliza la semilla de amaranto como una alternativa culinaria al trigo, fácil de incorporar a la cocina tradicional (Dixit, Azar, Gardner & Palaniappan, 2011).

En los últimos años, se ha evaluado a la semilla de amaranto como fuente de compuestos bioactivos. Entre las propiedades estudiadas, cabe mencionar su acción sobre el metabolismo del colesterol, como agente antioxidante, anticancerígeno, antialérgico y antihipertensivo, entre otras. La mayoría de estas actividades se explican por la presencia de péptidos bioactivos con efectos antitumoral, antihiperlipidémico, antihipertensivo o antitrombótico (Caselato-

Sousa & Amaya-Farfán, 2012; Silva-Sánchez et al., 2008). También, algunos autores atribuyen efectos biológicos a la fracción lipídica, como por ejemplo propiedades antioxidantes e hipolipemiantes (Berger et al., 2003; He & Corke, 2003). Además algunos flavonoides específicos presentes en la semilla de amaranto, como la rutina y algunos ácidos fenólicos como el ácido gálico, el ácido hidroxibenzoico y el ácido vanílico presentan efectos antioxidantes (Paško et al., 2009).

En nuestro laboratorio desde hace más de una década, se estudian varias de las actividades mencionadas en el párrafo anterior. En particular, en nuestro grupo de investigación nos encontramos trabajando sobre los potenciales efectos bioactivos que presentan las proteínas de reserva del amaranto luego de ser hidrolizadas por distintas enzimas proteolíticas, sometidas a un proceso de digestión gastrointestinal simulada o habiendo sido consumidas por animales de laboratorio. Estas actividades se han estudiado utilizando sistemas *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Se han hecho, entre otros, los siguientes aportes:

- ✧ Nardo (2017) y Lado, Burini, Rinaldi, Añón & Tironi (2015) estudiaron mediante herramientas bioinformáticas y ensayos *in vitro* e *in vivo* la capacidad que tienen las globulinas de amaranto y sus respectivos digeridos de inhibir la enzima HMG-CoA reductasa y de modificar el metabolismo del colesterol en animales alimentados con una dieta rica en colesterol.
- ✧ García Fillería & Tironi (2017) y Orsini Delgado et al. (2016) estudiaron la actividad antioxidante que presentan las proteínas y los péptidos de amaranto. Evaluaron esta actividad utilizando sistemas *in vitro* como la capacidad de secuestrar radicales peroxilos (ORAC), hidroxilos y peroxinitritos como así también la capacidad de quelar metales (HORAC). También evaluaron estos mismos efectos *in vitro* utilizando cultivos de células de epitelio intestinal (Caco-2) donde investigaron la

capacidad que tiene el amaranto de modular las diferentes rutas metabólicas que protegen al organismo del estrés oxidativo y la capacidad que tienen estas células de absorber y modificar a los péptidos de amaranto. Finalmente, también investigaron estas actividades utilizando modelos animales.

- ✧ Sabbione, Nardo, Añón & Scilingo (2016) y Sabbione, Rinaldi, Añón & Scilingo (2016) estudiaron la capacidad antitrombótica de los péptidos y proteínas de amaranto. Evaluaron esta actividad en ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* y encontraron fracciones peptídicas con un elevado efecto antitrombótico y la capacidad de atravesar el epitelio intestinal.
- ✧ Fritz, Vecchi, Rinaldi & Añón (2011), Quiroga, Aphalo, Nardo & Añón (2017), Suárez, Aphalo, Rinaldi, Añón & Quiroga (2020) y Vecchi & Añón (2009) estudiaron la capacidad antihipertensiva de los péptidos y proteínas de amaranto. Evaluaron esta actividad mediante herramientas bioinformáticas y ensayos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* y observaron que las proteínas y los péptidos de amaranto tienen la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas convertidora de angiotensina (ECA) y renina, y de disminuir la presión arterial en un modelo animal que es espontáneamente hipertenso. En particular lograron identificar dos tetrapéptidos ALEP y VIKP responsables de este efecto hipotensor.

Como ya hemos mencionado en la **sección 1.3**, se han descrito distintos mecanismos por los cuales los componentes de la dieta pueden afectar el metabolismo de los lípidos. En particular, distintas fracciones del grano de amaranto pueden modificar el metabolismo de los lípidos en diversos modelos de animales hipercolesterolémicos o alimentados con dietas ricas en lípidos como ratas, hámsteres, conejos y pollos (Mendonça, Saldiva, Cruz & Arêas, 2009; Silva-Sánchez et al., 2008; Soares, Mendonça, de Castro, Menezes & Arêas, 2015). Estos estudios muestran que el amaranto modifica los niveles de

excreción de esteroides en materia fecal, cambia los niveles de lipoproteínas en sangre y los perfiles lipídicos hepáticos. Estos efectos se atribuyen al escualeno y a los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la fracción lipídica del amaranto, a los péptidos que se liberan luego de la digestión de las proteínas de amaranto y a la fibra presente en este grano (Berger et al., 2003; Chaturvedi, Sarojini & Devi, 1993; Chávez-Jáuregui et al., 2010; Grajeta, 1999; Plate & Arêas, 2002). Los ácidos grasos poliinsaturados de la semilla de amaranto disminuyen los niveles de triacilglicéridos y VLDL en plasma y el escualeno inhibe la vía del mevalonato, disminuyendo la síntesis *de novo* del colesterol (Nagaoka, Nakamura, Shibata & Kanamaru, 2010; Ruiz et al., 2014; Tiengo, Motta & Netto, 2011; Weththasinghe, Liyanage, Vidanarachchi, Perera & Jayawardana, 2014). Aún no se han estudiado los mecanismos por los cuales la fibra y las proteínas de amaranto ejercen su efecto sobre el metabolismo del colesterol a nivel intestinal.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

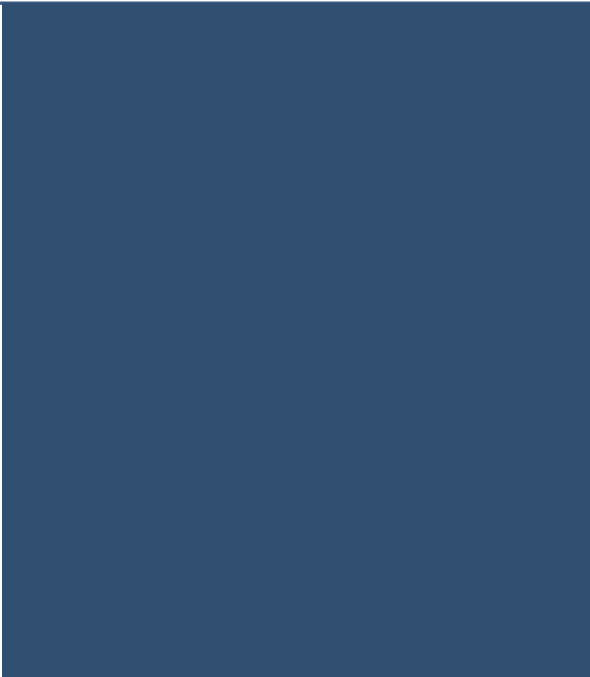
En función de lo descrito en la sección anterior formulamos la siguiente hipótesis: “Las proteínas y la fibra de amaranto modulan el metabolismo del colesterol por medio de su interacción con ácidos biliares y desplazamiento de colesterol en micelas”.

2.2 Objetivo general

Nuestro objetivo general es estudiar mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* cómo los componentes del amaranto modulan el metabolismo del colesterol por medio de la interacción con ácidos biliares y/o su desplazamiento de micelas.

2.3 Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar harina y aislado proteico de amaranto y someterlos a un proceso de digestión gastrointestinal simulada.
- Estudiar la capacidad que tienen la harina, el aislado proteico y sus digeridos de modificar el contenido de colesterol de micelas modelo y de interaccionar con ácidos biliares en ensayos *in vitro*.
- Estudiar la actividad moduladora del amaranto en el metabolismo del colesterol en ensayos *in vivo*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Semillas de amaranto

Se utilizaron semillas de amaranto (*Amaranthus mantegazzianus* línea AMAN-G1/3), cosechadas en 2015 en Río Cuarto, Córdoba, Argentina. También fueron utilizadas semillas de la variedad *hypocondriacus* (antorcha CV), cosechadas en Río Cuarto en 2014.

3.2 Obtención de harina, aislado proteico de amaranto y sus digeridos

3.2.1 Obtención de harina de amaranto (HA)

Las semillas de amaranto se molieron empleando un molino ciclónico (modelo 3010-019, UDY, Estados Unidos), y utilizando una malla metálica de separación de 1 mm. Las harinas así obtenidas fueron conservadas a 0 °C hasta su utilización en frascos de vidrio con tapa.

3.2.2 Obtención de aislado proteico de amaranto (AA)

El aislado proteico de amaranto se preparó a partir de la harina obtenida según se describió en el punto anterior. Para desgrasarla se mezcló con n-hexano en una relación 10 % p/v; esta mezcla se dejó agitando durante 5 horas a temperatura ambiente y luego 19 horas más en reposo, logrando 24 horas de contacto entre la harina y el solvente. La harina desgrasada se separó del solvente mediante filtración con vacío utilizando un embudo de Büchner. El retenido obtenido se dejó durante 12 horas bajo campana a efectos de evaporar los restos de solvente. A continuación, se preparó una dispersión de la harina desgrasada en agua ajustando el pH a 9 con hidróxido de sodio 2 M y agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. La dispersión así obtenida se centrifugó a $9000 \times g$ durante 20 minutos a 10 °C, utilizando una centrífuga (Beckman

Avanti-J, Beckman Coulter, Estados Unidos). Se descartó el precipitado obtenido, y el sobrenadante fue ajustado a pH 5 con ácido clorhídrico 2 M, punto isoeléctrico promedio de las globulinas de amaranto. La dispersión obtenida fue nuevamente centrifugada a $9000 \times g$ durante 20 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. El precipitado se dispersó en agua y el pH se ajustó a 7 con hidróxido de sodio 0,1 M. La dispersión se congeló a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ y se liofilizó (HETO FD4, Lab Equipment, Dinamarca). El sólido obtenido se molió con mortero y se conservó a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización (Martínez & Añón, 1996) (**Figura 8**).

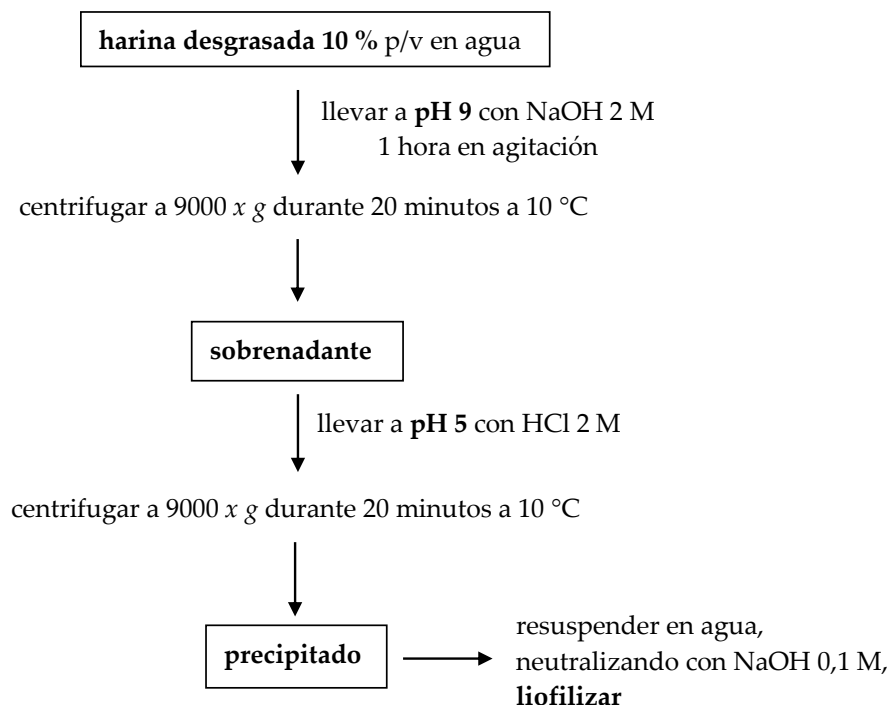


Figura 8 Esquema de obtención de AA a partir de HA desgrasada.

3.2.3 Obtención de digeridos mediante digestión gastrointestinal simulada

Ambas muestras obtenidas, harina y aislado proteico de amaranto, se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal simulada, siguiendo los protocolos de Gawlik-Dziki, Dziki, Baraniak & Lin, (2009), Minekus et al. (2014) y Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg & Sips, (2005). Se

dispersaron 300 mg de HA o AA liofilizado en 6 mL de fluido símil saliva (fosfato monoácido de sodio 0,02 M, fosfato diácido de potasio 0,001 M, cloruro de sodio 0,005 M, 60 mg de α -amilasa de *Bacillus subtilis* \approx 380 U^a/mg pH 6,8) a 37 °C agitando por 5 minutos. A continuación, se agregaron 12 mL de fluido símil jugo gástrico (2,5 g/L pepsina, 1:15000 5X unidades NF^b, cloruro de sodio 0,03 M, pH 2) a 37 °C y se mantuvo en agitación por 60 minutos. Luego, se agregaron 12 mL de fluido símil duodenal (3 g/L pancreatina porcina comercial 4X-100 USP^c unidades/mg, carbonato de sodio 0,1 M pH 7) a 37 °C, continuando la agitación durante 60 minutos. Por último, se inactivaron todas las enzimas calentando durante 10 minutos a 80 °C. La harina de amaranto digerida (HAD) y el aislado de amaranto digerido (AAD) así obtenidos se congelaron a -80 °C, se liofilizaron, se molieron utilizando mortero y se conservaron en un desecador a temperatura ambiente hasta su utilización. Las definiciones de las unidades enzimáticas, ^a, ^b y ^c se detallan en la **sección 4**.

3.3 Caracterización de las muestras

3.3.1 Composición centesimal de las muestras

El contenido de proteínas de todas las muestras se determinó mediante el método de micro Kjeldahl (Nkonge & Ballance, 1982). Para esto se colocaron cantidades suficientes de muestra en tubos digestores junto con 3 mL de ácido sulfúrico concentrado y 1 g de catalizador, preparado mezclando sulfato de cobre y sulfato de sodio, en relación 1:10. Se incluyeron tubos con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina (Sigma, Estados Unidos), a fin de construir una curva de calibración, y como patrones de contenido de nitrógeno se emplearon sulfato de amonio y urea. Los tubos se colocaron en un digestor eléctrico (Foss, Tecator 2040, España) y se calentaron de manera progresiva desde temperatura ambiente hasta 400 °C. Esta temperatura se mantuvo hasta que en los tubos se observó una solución traslúcida color verde esmeralda, lo

que indica que la digestión húmeda ha finalizado. Cuando los tubos llegaron a temperatura ambiente el contenido se trasvasó cuantitativamente a matraces de 50 mL, los que se llevaron a volumen utilizando agua destilada. El contenido de amonio se determinó empleando una técnica colorimétrica basada en la reacción de Berthelot con modificaciones (Nkonge & Ballance, 1982). Se midió la absorbancia de las muestras a 660 nm utilizando un lector de placas (Synergy HT, BioTek, Estados Unidos). Para determinar el contenido de proteínas se utilizó el factor de conversión 5,85 g proteína/g nitrógeno (Bressani, 1994; Velarde-Salcedo et al., 2019). El contenido de proteínas se expresó como gramos de proteína cada 100 gramos de muestra.

El contenido de humedad se determinó utilizando el método indirecto (Association of Official Analytical Chemists, 2006). Para eso se colocaron cantidades suficientes de muestras en cápsulas de porcelana previamente calcinadas a 550 °C y se registró el peso inicial. Las cápsulas se colocaron en estufa (DKN600, Yamato, Estados Unidos) a 100 °C hasta peso constante. La cantidad de agua perdida por las muestras se obtuvo por diferencia entre el peso de muestra inicial y el peso luego de alcanzar un valor constante. El contenido de humedad se expresó como gramos de agua cada 100 gramos de muestra.

Para determinar el contenido de cenizas, se partió de las muestras secas, obtenidas en la determinación del contenido de humedad. Los residuos secos se carbonizaron bajo campana sobre triángulo de pipas utilizando un mechero Bunsen hasta que se detuvo la emanación de humo. A continuación, las cápsulas que contenían las muestras carbonizadas se colocaron en una mufla y se calentaron a 550 °C hasta la obtención de cenizas blancas (Association of Official Analytical Chemists, 2006). El contenido de cenizas se calculó por diferencia de peso entre la muestra pesada previamente a la determinación de humedad y el residuo inorgánico obtenido una vez que las muestras fueron

llevadas hasta cenizas blancas. El contenido de minerales se expresó como gramos de cenizas cada 100 gramos de muestra.

El contenido de glúcidos se determinó utilizando el método de Antrona-sulfúrico (Association of Official Analytical Chemists, 2006; Morris, 1948). Las muestras se sometieron a una hidrólisis a reflujo durante 2 horas con ácido clorhídrico 1,2 M a fin de lograr hidrolizar los enlaces O-glucosídicos y obtener muestras más homogéneas para analizar. Se utilizó una curva de calibración realizada con glucosa (Sigma, Estados Unidos) como patrón. El contenido de glúcidos se expresó como gramos de glucosa cada 100 gramos de muestra.

El contenido de lípidos se determinó utilizando el método de Soxhlet (Association of Official Analytical Chemists, 2006; Dobush, Ankney & Krementz, 1985). Las muestras previamente pesadas se colocaron dentro de cartuchos de papel de filtro y se pusieron en contacto con éter etílico como solvente de extracción. Finalmente, el solvente se evaporó y se determinó el contenido de lípidos por diferencia de peso entre el balón que contenía los lípidos y el balón vacío. El contenido de lípidos se expresó como gramos de lípidos cada 100 gramos de muestra.

3.3.2 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó dosando los grupos amino libres mediante el método del ortoftaldehído (OPA) descrito por Nielsen, Petersen & Dambmann (2001).

Reactivos

Buffer del ensayo: borato de sodio 0,15 M, 0,15% p/v SDS, pH 9,5.

Reactivo OPA: OPA 5,97 mM en el buffer de ensayo, ditiotreitól (DTT) 5,7 mM.

La curva de calibración se construyó a partir de una solución de leucina (Sigma, Estados Unidos) 1 mg/mL. La técnica consiste en adicionar 750 μ L del reactivo de OPA sobre 100 μ L de la muestra, agitar durante 5 segundos, dejar reposar 2

minutos y finalmente medir la absorbancia a 340 nm, para lo cual se utilizó un lector de placas.

El grado de hidrólisis fue calculado con la siguiente expresión:

$$GH\% = \frac{(NH_{2t} - NH_{2t0})}{NH_{2 \text{ totales}}} \times 100$$

donde,

NH_{2t} : grupos amino libres de la muestra, a tiempo de hidrólisis t

NH_{2t0} : grupos amino libres de la muestra sin hidrolizar, a tiempo cero de hidrólisis

$NH_{2 \text{ totales}}$: grupos amino totales presentes en la proteína

$NH_{2 \text{ totales}} = NH_{2 \infty} - NH_{2t0}$

$NH_{2 \infty} = (1/PM \text{ aa promedio}) \times (1 + f_{LYS}) \times C \text{ prot.}$ Corresponde a los grupos amino libres de una muestra completamente hidrolizada

PM aa promedio: promedio de los pesos moleculares de los aminoácidos de las proteínas de la muestra. Para las proteínas de amaranto, se considera 130 g/mol

f_{LYS} : proporción de lisina en las muestras (1/15) (Bressani et al., 1993)

C prot: concentración de proteína de la muestra utilizada en el ensayo (g/L)

3.3.3 Electroforesis

La electroforesis fue empleada para conocer los pesos moleculares de las proteínas/polipéptidos de las muestras estudiadas a fin de caracterizarlas. Se emplearon electroforesis en distintas condiciones: desnaturizante (SDS-PAGE), desnaturizante en condiciones reductoras en presencia de 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE+2-ME), con o sin tricina dependiendo del tamaño molecular de los péptidos a separar.

3.3.3.1 Reactivos generales

SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

Buffer de electrodo: trihidroximetil aminometano-HCl (Tris-HCl) 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3, dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1 % p/v.

Buffer del gel apilador: Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS 0,1 % p/v.

Buffer del gel separador: Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, SDS 0,1 % p/v.

N',N',N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED): concentración final 0,1 % v/v en las soluciones destinadas a preparar los geles separador y apilador.

Persulfato de amonio al 10 % p/v: concentración final 0,4 % v/v en la solución para preparar el gel apilador y 0,06 % v/v en la del gel separador.

Buffer de muestra: Tris-HCl 0,185 M, pH 8,8, glicerol 12,5 % v/v, SDS 0,1 % p/v, y azul de bromofenol 0,05 % p/v con o sin 2-ME 5 % v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

Tricina SDS-PAGE y Tricina SDS-PAGE+2-ME

Buffer de electrodo anódico: Tris-HCl 0,2 M, pH 8,9.

Buffer de electrodo catódico: Tris-HCl 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1 % p/v, pH 8,25.

Buffer de gel: Tris-HCl 3 M, SDS 0,3 % p/v, pH 8,45.

Solución AB₃: 48 g acrilamida + 1,5 g bisacrilamida, en 100 mL de agua.

Solución AB₆: 46,5 g acrilamida + 3 g bisacrilamida, en 100 mL de agua.

N',N',N',N'tetrametiletilendiamina (TEMED): se agregó a las soluciones con las que se obtuvieron los geles en el momento de su preparación, concentración final 0,1 % v/v.

Persulfato de amonio al 10 % p/v: se colocó en las soluciones con las que se prepararon los geles, a concentración final 0,075 % v/v en el gel apilador, 0,05 % v/v en el gel espaciador y 0,03 % v/v en el gel separador.

Buffer de muestra: Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerol 12 % p/v, SDS 4 % p/v, Serva blue-G 0,01 % p/v, pH 6,8, con o sin 2-ME 5 % v/v, para obtener condiciones reductoras o no reductoras, respectivamente.

Solución fijadora: agua/metanol/ácido acético (40:50:10).

Tinción con Coomassie Brilliant Blue

Solución colorante: Coomassie Brilliant Blue R-250, 0,192 % p/v disuelto en agua/metanol/ácido acético (10:10:4).

Solución decolorante: agua, etanol y ácido acético en proporción 65:25:10 v/v.

Tinción con plata

Solución fijadora: 60 mL de acetona 50 % v/v, 1,5 mL de ácido tricloroacético 50 % p/v y 25 μ L de formaldehído 37 % v/v.

Solución de pretratamiento A: acetona 50 % v/v.

Solución de pretratamiento B: 100 μ L de tiosulfato de sodio 10 % p/v en 60 mL de agua bidestilada.

Solución de impregnación: 0,8 mL de nitrato de plata 20 % p/v, 0,6 mL de formaldehído 37 % v/v y 60 mL de agua bidestilada.

Solución de revelado: 1,2 g de carbonato de sodio, 25 μ L de formaldehído 37 % v/v, 25 μ L de tiosulfato de sodio 10 % p/v y 60 mL de agua bidestilada.

Solución de detención: ácido acético glacial 1 % v/v.

3.3.3.2 Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon solubilizando la proteína liofilizada en buffer de muestra (5-10 mg/mL) o, en el caso de soluciones o dispersiones proteicas, mezclando convenientemente las mismas con buffer de muestra 4x. Cuando se utilizaron condiciones desnaturizantes y reductoras en la separación electroforética, las muestras preparadas en el buffer de muestra conteniendo 2-ME, se trataron a 100 °C durante 1 minuto.

Antes de ser colocadas en el gel correspondiente, las muestras fueron centrifugadas a $14000 \times g$ durante 10 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una microcentrífuga (Z 326 K, HERMLE, Alemania). Con el fin de que las bandas se observen de manera correcta con la tinción con Coomassie Brilliant Blue los sobrenadantes se sembraron a razón de 20-30 μg de proteína/calle.

3.3.3.3 Proteínas patrón de masa molecular

Se utilizaron diferentes proteínas patrón de masa molecular. En las electroforesis SDS-PAGE, se usaron patrones de bajo peso molecular (LMW, GE-Healthcare, Estados Unidos) que incluyen las siguientes proteínas: fosforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactoalbúmina (14,4 kDa). En las electroforesis de Tricina-SDS-PAGE, se emplearon además de los LMW, patrones de muy bajo peso molecular (VLMW, BIO-RAD, Estados Unidos). Las proteínas incluidas en esta mezcla son: triosa-fosfato isomerasa (26,6 kDa), mioglobina (16,95 kDa), α -lactoalbúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,51 kDa), cadena β de la insulina (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa).

3.3.3.4 Desarrollo de los geles y condiciones de corrida

Las electroforesis se realizaron en geles preparados entre placas de vidrio de 10 cm de ancho \times 7 cm de largo, empleando separadores de 1 mm que determinaron el espesor del gel. Se empleó un equipo BIO-RAD, modelo mini-protean TETRA (GE-Healthcare, Estados Unidos).

SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

Se utilizaron geles de concentración de acrilamida 12 % p/v para el gel separador, y de 4 % p/v para el gel apilador. Se utilizó el sistema de buffers descrito por Laemmli (1970). Las electroforesis se realizaron a una corriente

constante de 30 mA/gel, requiriendo aproximadamente 1 hora y 30 minutos para completar la corrida. El voltaje máximo admitido fue 200 V.

Tricina-SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE+2-ME

Se utilizó el sistema electroforético discontinuo descrito por Schägger & von Jagow (1987) en el cual los geles están formados por tres regiones:

- Gel apilador: 0,0825 mL de solución AB₃/mL buffer de gel.
- Gel espaciador: 0,2 mL de solución AB₃/mL buffer de gel.
- Gel separador: 0,33 mL de solución AB₆/mL buffer de gel.

Las electroforesis se realizaron a voltaje constante, 30 V, hasta que las proteínas atravesaron el gel apilador. Luego la diferencia de potencial se aumentó a 90 V requiriéndose entre 4 y 5 horas para completar las corridas.

3.3.3.5 Fijación, coloración y decoloración de los geles

SDS-PAGE y SDS-PAGE+2-ME

Una vez realizada la corrida los geles se fijaron y tiñeron durante 12 horas con 50 mL de solución colorante (**sección 3.3.3.1**, *Tinción con Coomassie Brilliant Blue*). Luego se colocaron en solución decolorante a temperatura ambiente.

Tricina-SDS-PAGE y Tricina-SDS-PAGE+2-ME

Una vez finalizada la corrida, los geles se colocaron en la solución fijadora (**sección 3.3.3.1**) durante 45 minutos, luego se adicionó 50 mL de solución colorante (**sección 3.3.3.1**, *Tinción con Coomassie Brilliant Blue*) y se tiñeron durante 12 horas. Finalmente se decoloraron a temperatura ambiente.

En los casos en los que se realizó la tinción con plata (**sección 3.3.3.1**, *Tinción con plata*) se siguió el protocolo descrito por Blum, Beier & Gross (1987). Los geles se colocaron durante 5 minutos en la solución fijadora. Posteriormente se lavaron y enjuagaron varias veces con agua bidestilada. Después se colocaron en las soluciones para realizar los pretratamientos A y B durante 5 minutos y 1 minuto, respectivamente (**sección 3.3.3.1**). Una vez enjuagados se colocaron en

la solución de impregnación durante 8 minutos. Después de enjuagarlos nuevamente, se agregó la solución reveladora durante el tiempo necesario para revelar la imagen (1 minuto aproximadamente). La reacción se detuvo manteniendo los geles en contacto con ácido acético glacial 1 % v/v durante 1 minuto.

3.3.3.6 Obtención de imágenes y análisis de los geles

Los perfiles electroforéticos de las muestras se digitalizaron utilizando un scanner. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa Image J (Rueden et al., 2017; Schindelin et al., 2012), que permite obtener las distancias recorridas por las proteínas separadas en los geles. Utilizando la mejor relación entre la distancia recorrida por las proteínas patrón y su masa molecular, se obtuvieron las rectas a partir de las cuales se estimaron los pesos moleculares de los polipéptidos y/o de las proteínas de las muestras estudiadas.

3.3.4 Caracterización cromatográfica

El tamaño molecular de las proteínas de amaranto fue estudiado mediante cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica ha brindado además información sobre los efectos del proceso de digestión gastrointestinal simulada que se ha empleado en este trabajo de tesis. Los ensayos mencionados se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida rápida para proteínas FPLC, utilizando dos columnas de exclusión molecular de diferente rango de separación. Además se empleó cromatografía líquida de alta eficacia HPLC utilizando una columna de hidrofobicidad para obtener fracciones proteicas con diferentes características.

3.3.4.1 Cromatografía rápida para proteínas (FPLC)

Equipo

Se utilizó un equipo de FPLC ÄKTA Purifier (GE-Healthcare, Inglaterra) que consta de los siguientes módulos: controlador UPC-900 (GE-Healthcare, Inglaterra), inyector manual INV-907 (GE-Healthcare, Inglaterra), bomba binaria P-900 (GE-Healthcare, Inglaterra), detector UV de longitud de onda fija de 210 nm (GE-Healthcare, Inglaterra) y colector de fracciones automático Frac-920 (GE-Healthcare, Inglaterra).

Preparación de las muestras

Las muestras previamente liofilizadas (AA, AAD, HA, HAD) se solubilizaron a razón de 5 mg/mL de proteína en buffer fosfato 50 mM, cloruro de sodio 0,15 M pH 7 o pH 8 según correspondía. Para este fin, las dispersiones se agitaron a temperatura ambiente, durante 1 hora a 700 rpm. Luego se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se filtraron a través de una membrana de 0,45 μm . Las muestras filtradas fueron inyectadas en la columna utilizando un bucle de 500 μL .

Desarrollo

Las cromatografías se realizaron a temperatura ambiente utilizando dos columnas de exclusión molecular. Una de ellas separa moléculas de mayor tamaño, mientras que la otra resuelve péptidos pequeños y aminoácidos libres. Las muestras sin digerir fueron estudiadas utilizando la columna Superose 6 10/300 GL (código 17517201, GE-Healthcare, Estados Unidos), rango de separación 5000 a 5000000 Da, y la columna Superdex peptide 10/300 GL (código 17517601, GE-Healthcare, Estados Unidos), rango de separación 100 a 7000 Da. Todos los buffers utilizados se filtraron a través de una membrana de nylon de 0,45 μm de tamaño de poro. La elución se realizó con el mismo buffer que el utilizado para solubilizar las muestras, buffer fosfato 50 mM, cloruro de

sodio 0,15 M, pH 8 cuando se empleó la columna Superose 6 y pH 7 al utilizar la columna Superdex peptide. Para ambas columnas se emplearon un flujo de 0,5 mL/min y un volumen total de 36 mL correspondiente a 1,5 volúmenes de columna. Durante el desarrollo de la cromatografía se registró la absorbancia del eluato a 210 nm.

Calibración

La columna Superdex peptide se calibró utilizando azul dextrano para determinar el volumen muerto (V_0), aprotinina (6500 Da), vitamina B12 (1850 Da) y ácido hipúrico (179 Da). Se graficó el logaritmo de la masa molecular de los patrones utilizados en función del volumen de elución de cada uno de ellos; del ajuste de los puntos se obtuvo la ecuación que se muestra a continuación, mediante la que se determinó la masa molecular de las especies proteicas separadas en las cromatografías.

$$\log MM = 4,84 - 3,30 \times K_{av} \quad (r^2=0,9398),$$

donde $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, V_e es el volumen de elución, V_t el volumen total y V_0 el volumen muerto.

La columna Superose 6 se calibró utilizando azul dextrano para determinar el volumen muerto (V_0), ribonucleasa (13700 Da), ovoalbúmina (43000 Da), albúmina (67000 Da) y tiroglobulina (669000 Da). Se graficó el logaritmo de la masa molecular de los patrones utilizados en función del volumen de elución de cada uno de ellos, ajustando los puntos a la ecuación de una recta que se muestra a continuación, mediante la que se determinó la masa molecular de las especies proteicas separadas en las cromatografías.

$$\log MM = 4,185 - 4,5539 \times K_{av} \quad (r^2=0,974),$$

donde $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, V_e es el volumen de elución, V_t el volumen total y V_0 el volumen muerto.

3.3.4.2 Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)

Equipo

Se utilizó un equipo de HPLC que consta de los siguientes módulos: sistema de inyección automático Waters 717 plus Autosampler (Waters, Estados Unidos), inyector manual U6K (Waters, Estados Unidos), controlador Waters 600 E Multisolvent Delivery System (Waters, Estados Unidos), detector Waters 996 Photodiode Array (Waters, Estados Unidos), celda termostática Waters TCM (Waters, Estados Unidos) y colector de fracciones automático Fraction Colector (FC203B, Gilson Inc., Estados Unidos).

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon solubilizando proteína proveniente del aislado de amaranto digerido (25 mg/mL) en buffer fosfato 35 mM (fosfato monoácido de potasio 33,3 mM, fosfato diácido de potasio 1,7 mM, pH 7,8) en las condiciones indicadas en la **sección 3.3.4.1**. Las muestras filtradas fueron inyectadas en la columna utilizando una jeringa de 2500 μ L y un bucle de 2000 μ L.

Desarrollo

Las cromatografías se realizaron en el equipo HPLC, descrito anteriormente, a 35 °C utilizando una columna Sunfiere Prep C8, 5 μ m, 10 x 250 mm (Waters, Estados Unidos) que permite separar los componentes de la muestra en función de su hidrofobicidad. Todos los solventes fueron filtrados a través de una membrana de nylon de 0,45 μ m de tamaño de poro antes de ser utilizados. Para la separación de los componentes, se empleó un sistema binario de solventes, soluciones A y B, y se aplicó un gradiente lineal (**Tabla 5**, Gradiente 1) con un flujo de 5,2 mL/min. El tiempo de desarrollo fue 100 minutos y la presión de la columna se mantuvo entre 2000 y 2400 psi. Se registró la absorbancia del eluato a 210 y a 280 nm, longitudes de onda de absorción del enlace peptídico y de los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina, respectivamente.

Las soluciones A y B empleadas se prepararon con diferente proporción de acetonitrilo y agua, 2 y 98 % v/v para A y 65 y 35 % v/v para B, respectivamente, y en ambas se agregó ácido trifluoroacético (TFA) 0,065 % v/v en agua.

Luego del minuto 55 los cambios de fase móvil realizados tuvieron como objeto lavar y regenerar la columna.

Las corridas cromatográficas fueron colectadas en 3 fracciones de distinta hidrofobicidad, fracción I (FI), fracción II (FII) y fracción III (FIII). Para la primera fracción se colectaron los eluatos comprendidos entre el minuto 0 y 7, la segunda entre el 7 y 29 y la tercera entre el 29 y 48.

Tabla 5 Solventes utilizados en la cromatografía líquida de alta resolución HPLC-RP.

Tiempo de elución (min)	% A	% B	
0 a 3	100	0	Isocrática
3 a 55	100	0	Gradiente 1
	$\% A = 105,77 - 1,92 \times t \text{ (min)}$ $\% B = -5,77 + 1,92 \times t \text{ (min)}$		
	0	100	
55 a 75	0	100	Isocrática
75 a 83	0	100	Gradiente 2
83 a 100	100	0	Isocrática

3.3.5 Fibra dietética de amaranto

3.3.5.1 Obtención de fibra dietética

El contenido de fibra dietética de las muestras se determinó utilizando un kit Megazyme Total dietary fibre K-TDFR 05/12 (Megazyme, Irlanda), siguiendo los protocolos 32-05.01 y 985.29 de la Association of Official Analytical Chemists (2006).

Reactivos

- Buffer fosfato 0,08 M, pH 7,5 (fosfato monoácido de sodio 1,4 g/L, fosfato diácido de sodio 9,68 g/L)
- Hidróxido de sodio 0,275 M
- Ácido clorhídrico 0,325 M
- Etanol 95 % y 78 % v/v
- Acetona
- Enzimas: α -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa. Las actividades de las enzimas utilizadas se encuentran descritas en **sección 4**
- Celite 545

Procedimiento

Se pesó 1,000 g de muestra por duplicado, teniendo la precaución de que las pesadas no difirieran en más de 20 mg, y se colocó cada una en un vaso de precipitados tipo Berzelius de 400 mL. Luego se agregaron 50 mL de buffer fosfato pH 7,5 y se ajustó el pH a $6,0 \pm 0,1$ con ácido clorhídrico 0,1 M. A cada muestra se le agregaron 50 μ L de α -amilasa termoestable. Los vasos se colocaron en un baño termostático (GDE digestor enzimático, Multiagitador 6, VELP, Italia) a 100 °C durante 15 minutos y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. El pH en cada vaso se ajustó a $7,5 \pm 0,1$ con hidróxido de sodio 0,275 M y a continuación se agregaron 100 μ L de la solución de proteasa. Las muestras se incubaron a 60 °C durante 30 minutos con agitación continua y transcurrido ese tiempo, se enfriaron a temperatura ambiente. Una vez que el pH se ajustó a $4,5 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico 0,325 M, se agregaron 200 μ L de amiloglucosidasa a cada vaso y se incubaron en el mismo equipo durante 30 minutos a 60 °C. Los digeridos obtenidos se filtraron a través de un crisol (CSF6, VELP, Italia), al cual previamente se le agregó una masa conocida de tierra de diatomeas, Celite, como material filtrante. El residuo retenido sobre el material filtrante contiene la fibra insoluble. Al líquido filtrado se le agregaron

280 mL de etanol 95 % a 60 °C, se mantuvo 1 hora a temperatura ambiente a fin de precipitar la fibra que permanecía soluble en la solución acuosa. Luego se procedió a filtrar nuevamente en crisoles con Celite. Los residuos retenidos fueron lavados 3 veces con 20 mL de etanol 78 %, 2 veces con 10 mL de etanol 95 % y 2 veces con 10 mL de acetona. Finalmente, se dejaron secar en estufa a 105 °C durante toda la noche. Para calcular el contenido de fibra, a cada residuo se le determinó peso seco, contenido de proteínas por el método de Kjeldahl y cenizas por calcinación, como se indicó previamente (**sección 3.3.1**).

El contenido de fibra fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra} = m_m - m_p - m_c$$

donde,

m_m = masa muestra

m_p = masa de proteínas en el retenido

m_c = masa de cenizas en el retenido

Todas las masas se expresaron en g.

3.3.5.2 Caracterización de la fibra dietética por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Obtención de las muestras

Fibra dietética

A fin de caracterizar los polisacáridos presentes en las fracciones de fibra dietética soluble e insoluble de las muestras, se modificó el protocolo de obtención (**sección 3.3.5.1**), para contar con la fibra libre de tierra de diatomeas (Celite). Después de la digestión enzimática, el residuo se obtuvo por centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos a 20 °C. El precipitado obtenido contiene la fibra insoluble. El sobrenadante se trasvasó cuantitativamente a un vaso de precipitados, y la fibra soluble se precipitó como se describió en el apartado anterior. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 5000 x g a

20 °C. Ambos residuos se congelaron a -80 °C, se liofilizaron (Rificor modelo L-A-B4-C, Argentina) y se reservaron a 4 °C hasta su utilización.

Almidón de amaranto

El almidón de amaranto fue obtenido a partir de la harina según la metodología descrita por Perez, Bahnassey & Breene (1993). La harina de amaranto se colocó en una solución de hidróxido de sodio 0,0625 M, en una relación 50 % p/v durante 24 horas a 5 °C. La dispersión obtenida se filtró a través de un tamiz de acero inoxidable de abertura 80 mesh (177 μm de diámetro). El residuo retenido en el tamiz se volvió a dispersar con la solución de hidróxido de sodio y se filtró nuevamente utilizando el mismo tamiz. Los líquidos obtenidos se juntaron y se filtraron primero a través de un tamiz de 200 mesh (74 μm de diámetro) y luego a través de un tamiz de 270 mesh (53 μm de diámetro). Finalmente, el filtrado se centrifugó a $4500 \times g$ durante 20 minutos a 10 °C. El precipitado contiene el almidón, sólido blanco en la parte inferior del tubo, además de un sólido de color marrón ubicado en la superficie, que fue descartado. El precipitado de almidón limpio se dispersó en agua, se neutralizó a pH 7 con ácido clorhídrico 2 M, y se secó en estufa de convección forzada a 37 °C durante 24 horas. El material seco fue molido, pasado por tamiz de 80 mesh de abertura y almacenado a 4 °C hasta su uso.

Obtención de los espectros

Los espectros FTIR de las muestras liofilizadas se registraron en el rango de 4000–500 cm^{-1} utilizando un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) el cual permite un muestreo muy conveniente, debido a que no requiere calentamiento, prensado o molienda de las muestras, permite ahorrar tiempo y evitar un tratamiento que podría conducir a cambios estructurales no deseados de las muestras (Fellah, Anjukandi, Waterland & Williams, 2009). Se realizaron 64 barridos espectrales, con una resolución de 4 cm^{-1} , en un espectrómetro Thermo Nicolet iS10 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

3.4 Ensayo *in vivo*

3.4.1 Modelo animal

Para este ensayo, se utilizaron ratas Wistar macho de 11 a 12 semanas de edad provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

3.4.2 Diseño del ensayo

El protocolo descrito a continuación fue aprobado por el Comité de Bioética y Ética de la Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas (COBIMED) de la Universidad Nacional de la Plata (Protocolo N° T04-02-2015) y está de acuerdo con normas éticas internacionales (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, 2010; European Union Directive for Animal Experiments 2010/63/EU).

Treinta y seis ratas Wistar macho se dividieron en 6 grupos de 6 ratas cada uno. Todos los animales comenzaron a alimentarse con la dieta AIN-93, que ha sido descrita por Reeves, Nielsen & Fahey (1993) y que es aceptada como una dieta completa para animales de este tipo. El peso inicial de los animales empleados en este ensayo estuvo comprendido en un rango estrecho, entre 345 y 377 g.

Luego de una semana de aclimatación con la dieta AIN-93, 5 grupos comenzaron a recibir diferentes dietas, modificando parcialmente la dieta AIN-93, mientras que el sexto grupo, que denominamos dieta base, DB, se alimentó durante el tiempo completo del experimento con la dieta AIN-93 (**Tabla 6**). De los 5 grupos, uno que denominamos grupo control, recibió una dieta preparada adicionando grasa de cerdo (10 % p/p) (Dinamarg S.A., Argentina) y colesterol (2 % p/p) (Sigma, Estados Unidos) a la dieta base. Los 4 grupos restantes fueron distribuidos en dos protocolos de alimentación. En uno de los protocolos experimentales, los animales se alimentaron durante 30 días con dietas en las que se reemplazó el 25 % de la caseína de la dieta AIN-93 por proteína de

amaranto, utilizando aislado proteico (AA) o harina de amaranto (HA) como fuente de proteínas. Estos grupos fueron denominados **AA30** y **HA30**, respectivamente.

En el otro protocolo, los animales fueron alimentados durante 7 días con dietas en la que se reemplazó el 50 % de la caseína de la dieta AIN-93 por proteína de amaranto utilizando aislado o harina. Los grupos se denominaron **AA7** y **HA7**, respectivamente (**Tabla 6**).

Los animales fueron colocados en cajas de acero inoxidable, 3 ratas por caja, en una habitación en la que se controló la iluminación (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad) y la temperatura se mantuvo entre 18 y 20 °C. El alimento y el agua se suministraron *ad libitum*. Todos los días se registró el peso de alimento consumido y, en caso de ser necesario, fue repuesto. Una vez por semana los animales fueron pesados de manera individual.

Tabla 6 Protocolos de alimentación utilizados para el ensayo *in vivo*.

Grupo de animales		Semanas de alimentación			Fuente de proteína de amaranto	Porcentaje de remplazo proteico (%)
Nombres	Número de ratas	AIN-93	Dieta control	Dieta específica		
DB	6	6	-	-	-	-
Control	6	1	5	-	-	-
AA30	6	1	-	4	Aislado	25
HA30	6	1	-	4	Harina	25
AA7	6	1	4	1	Aislado	50
HA7	6	1	4	1	Harina	50

3.4.3 Preparación de las dietas

Las dietas se prepararon en el laboratorio de Nutrición y Bromatología, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina. Fueron formuladas siguiendo las recomendaciones del American Institute of Nutrition, organismo que propuso diferentes dietas para animales en etapa de crecimiento y de mantenimiento. En este ensayo se empleó como dieta base la dieta AIN-93 (**DB, Tabla 7**) para animales en mantenimiento (Reeves et al., 1993). Todas las

dietas se prepararon usando caseína láctea (Dilsa, Argentina), L-cistina (Anedra, Argentina), aceite de soja (Molinos Río de La Plata, Argentina), cloruro de colina (Sigma, Estados Unidos), celulosa microcristalina (Cofem, Perú), dextrina (Cofem, Perú), vitaminas y minerales. La preparación se realizó en tandas de 2 kg utilizando un mezclador mecánico que posee un recipiente que rota y paletas metálicas que generan un mezclado homogéneo. Inicialmente se pesaron y adicionaron los componentes sólidos, se encendió la mezcladora y luego se agregaron los componentes líquidos; la preparación se homogeneizó durante 15 minutos. Finalmente, las dietas se fraccionaron en frascos de 4 kg y se conservaron a 0 °C hasta su utilización.

Tabla 7 Ingredientes utilizados en la formulación de las dietas y aporte calórico teórico.

Formulación de las dietas						
	Control	AA30	HA30	AA7	HA7	AIN-93/ DB
Ingredientes (g/kg)						
Caseína	140	104	105	68	70	140
Dextrina	640,7	640,7	492,7	640,7	344,7	720,7
Aceite de soja	-	-	-	-	-	40
Fibra	50	50	50	50	50	50
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
L-Cisteína	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Mezcla de vitaminas^a	10	10	10	10	10	10
Mezcla de minerales^a	35	35	35	35	35	35
Colesterol	20	20	20	20	20	-
Grasa de cerdo	100	100	100	100	100	-
Aislado de amaranto	-	36	-	72	-	-
Harina de amaranto	-	-	183	-	366	-
Aporte energético^b	4202,8	4171,1	4200,9	4139,4	4199,1	3802,8

^a mezclas formuladas según AIN-93, ^b (Kcal/kg).

3.4.4 Procesamiento de las muestras biológicas y determinaciones realizadas

3.4.4.1 Muestras biológicas: plasma, hígado y materia fecal

Cada grupo de ratas fue sacrificado una vez alcanzado el tiempo de alimentación previamente estipulado (**Tabla 6**). Antes del sacrificio, que se

realizó a las 8:00 am, los animales fueron sometidos a ayuno durante 12 horas luego se anestesiaron con pentobarbital/diazepam mediante inyección intraperitoneal (25 mg/mL y 0,25 mg/mL respectivamente). Una vez anestesiados, fueron colocados en la mesa de cirugía y anticoagulados mediante una inyección intraperitoneal conteniendo 0,05 mL de heparina pura. A continuación, se les practicó una incisión a lo largo del vientre y se canuló la aorta abdominal. Desde la cánula se extrajo la totalidad de la sangre, la que fue colectada en tubos cónicos tipo Falcon de 15 mL, previamente heparinizados. El plasma se obtuvo por centrifugación de la sangre a $1500 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente y se conservó a 4 °C hasta su procesamiento, que se realizó en el transcurso del día de obtención.

Además del plasma, se extrajo el hígado de cada animal. Una vez realizada la ablación, el hígado fue cuidadosamente limpiado, se le retiraron los restos de otros tejidos, se lavó, se pesó, y se fraccionó en pequeños trozos, los que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Todos los hígados fraccionados fueron conservados a -80 °C hasta su utilización.

Con el objeto de recoger la materia fecal, cada animal fue colocado en una jaula metabólica durante la última semana del ensayo. La materia fecal se colectó todos los días de la semana, se pesó y se congeló a -80 °C. Las heces fueron posteriormente liofilizadas, molidas y almacenadas a 20 °C hasta su posterior uso.

3.4.4.2 Determinaciones

En plasma

Se determinó el contenido de triacilglicéridos (TAG), colesterol y lipoproteínas de alta y baja densidad (LDL y HDL).

La cuantificación de los TAG se llevó a cabo utilizando un kit enzimático TG color GPO/PAP AA (Wiener Laboratorio SAIC, Argentina). El plasma fresco, 5 µL, se mezcló con 500 µL de reactivo en tubos eppendorf de 2 mL (libres de

glicerol); la mezcla de reacción se incubó a 37 °C (Thermomixer comfort, Eppendorff, Alemania) durante 5 minutos. A continuación, se trasvasó una alícuota (200 µL) de cada mezcla de reacción a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 505 nm, utilizando un lector de placas. En cada determinación, se incluyó un blanco y un estándar en los que se reemplazó el plasma por agua y por la solución estándar incluida en el kit enzimático, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. El cálculo del contenido de TAG en sangre se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{TAG (g/L)} = (M-B) \times f$$

donde

$$f = (2,00 \text{ g/L}) / (S-B)$$

M= absorbancia de la muestra de plasma

B= absorbancia del blanco

S= absorbancia del estándar

2,00 g/L = concentración del estándar

Para cuantificar lipoproteínas de alta densidad o lipoproteínas de baja densidad, se colocaron 50 µL de plasma fresco, en tubos eppendorff de 500 µL, y se adicionó 25 µL del reactivo precipitante de LDL o HDL dependiendo de cuál sería determinada (LDL reactivo precipitante, HDL reactivo precipitante, Wiener Laboratorio SAIC, Argentina). Los tubos se agitaron por inversión durante 20 segundos y se incubaron 15 minutos en baño de agua a 25 °C. Luego de centrifugarlos a 1500 x g a 4 °C durante 15 minutos, los sobrenadantes fueron inmediatamente separados y colocados en tubos limpios.

La determinación de la concentración en plasma de cada una de las lipoproteínas y del colesterol total se llevó a cabo utilizando el kit enzimático Colestat enzimático AA/liquida, (Wiener Laboratorio SAIC, Argentina). Para ello, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL (libres de glicerol), 5 µL del sobrenadante de la precipitación de alguna de las lipoproteínas o de plasma fresco, respectivamente, y 500 µL de reactivo; la mezcla de reacción se incubó a

37 °C durante 5 minutos. A continuación, se trasvasó una alícuota (200 µL) de cada mezcla de reacción a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 505 nm. En cada determinación, se incluyó un blanco donde el plasma fue reemplazado por agua y un estándar donde el plasma fue reemplazado por una solución de colesterol incluida en el kit enzimático. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. El cálculo del contenido de colesterol (Col) o LDL o HDL en sangre se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Col o LDL o HDL (g/L)} = (M-B) \times f$$

donde

$$f = (2,00 \text{ g/L}) / (S-B)$$

M= absorbancia de la muestra de plasma

B= absorbancia del blanco

S= absorbancia del estándar

2,00 g/L = concentración del estándar

En hígado

En hígado se determinó el contenido de lípidos totales, colesterol, fosfolípidos y triacilglicéridos.

Para determinar el contenido de lípidos totales, 1 g de hígado se homogeneizó en 20 mL de la mezcla de Folch, preparada con 2 partes de cloroformo y 1 de metanol (Dobush et al., 1985; Folch, Lees & Sloane Stanley, 1957). El homogenato se trasvasó cuantitativamente a una probeta esmerilada, se agregaron 2 mL de agua destilada, se agitó por inversión y se dejó en reposo durante toda la noche para lograr la separación completa de las fases. Luego se retiró la fase acuosa superior y se filtró el extracto clorofórmico utilizando papel de filtro con sulfato de sodio anhidro para retener los restos de agua. Para determinar el contenido de lípidos totales (LT), se pesaron los lípidos extraídos luego de evaporar la fase clorofórmica a sequedad y se refirió este valor a la masa de hígado.

El residuo obtenido se suspendió utilizando una solución de Tritón X-100 (5 g/L). El contenido de colesterol y triacilglicéridos se determinó utilizando los kits enzimáticos antes mencionados.

La determinación del contenido de fosfolípidos (FL) se realizó después de digerir la materia orgánica con ácido perclórico y de cuantificar fósforo mediante una reacción colorimétrica (Chen, Toribara & Warner, 1956). Para ello, se colocaron 60 μ L de la suspensión de lípidos en Tritón X-100 en tubos de vidrio con tapa y se agregaron 50 μ L de ácido perclórico. Se dejó que la mezcla reaccione durante toda la noche a 300 °C. Junto con las muestras, se incluyó un blanco de reacción que sólo contenía la solución de Tritón X-100. Asimismo, se construyó una curva de calibración, cubriendo un rango de concentración de fósforo entre 5 y 80 mM, a partir de una solución madre de fosfato de sodio 0,1 M; los tubos recibieron el mismo tratamiento térmico en presencia de ácido perclórico. Para la determinación colorimétrica, se colocaron 900 μ L de una solución de molibdato de amonio 3,1 mM, ácido ascórbico 81,8 mM y ácido sulfúrico 0,43 M en cada uno de los tubos de reacción y se incubaron a 45 °C durante 20 minutos. A continuación, se trasvasó una alícuota (200 μ L) de cada mezcla de reacción a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 820 nm. Se calculó el contenido de FL interpolando las absorbancias obtenidas para las muestras en la curva de calibración construida.

En materia fecal

En la materia fecal de los animales, se determinaron el colesterol total y el contenido de ácidos biliares.

Para cuantificar el colesterol excretado por materia fecal se trataron 200 mg de heces liofilizadas con 2 mL de una mezcla de hidróxido de sodio 10 M y 96 % etanol (1:2 v/v). La suspensión se homogeneizó por agitación en vórtex y se incubó a 70 °C durante 45 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 \times g a 20 °C. Los lípidos insaponificables se

extrajeron del sobrenadante solubilizándolos en 1 mL de hexano repitiendo el procedimiento 3 veces. Los 3 extractos obtenidos se juntaron en un tubo y se lavaron con etanol 70 % (v/v) hasta neutralidad. Luego se evaporaron a sequedad (Concentrador Plus, Eppendorff, Alemania) y el sólido resultante se resuspendió en 500 μ L de una mezcla de acetonitrilo/isopropanol (70:30 v/v), agitando durante 75 minutos a 600 rpm a 25 °C. El contenido de colesterol se determinó mediante cromatografía RP-HPLC, utilizando la mezcla de solventes acetonitrilo/isopropanol antes mencionada como fase móvil. Para realizar las cromatografías, se empleó una columna C18 Symmetry (5 μ m, 4,4 \times 150 mm), a un flujo de 1 mL/min y 35 °C. La absorbancia del eluato a 210 nm se registró utilizando un detector de arreglo de diodos (Waters, Estados Unidos). El contenido de colesterol de cada muestra se obtuvo por interpolación del área del pico correspondiente en la curva de calibración construida utilizando un patrón de colesterol puro (Sigma, Estados Unidos) preparado a diferentes concentraciones 0,10-0,15-0,20-0,30 y 0,50 mg/mL.

Los ácidos biliares se extrajeron a partir de las muestras de materia fecal tratadas de la manera indicada en el apartado anterior. Una vez obtenidos los lípidos insaponificables, se agregaron 8 mL de cloruro de sodio 20 % p/v y se acidificó con ácido clorhídrico 6 M. Los ácidos biliares se extrajeron con éter etílico, utilizando 5 mL de solvente, en tres pasos de extracción. El volumen total correspondiente a los 3 extractos se colocó en un tubo, se evaporó el solvente a sequedad y el residuo se resuspendió en 500 μ L de una mezcla metanol:ácido acético 0,01 M (70:30). El contenido de ácidos biliares se determinó mediante RP-HPLC, utilizando como fase móvil la mezcla de solventes metanol:ácido acético. Se empleó una columna C18 Phenosphere Next (5 μ m, 4,6 \times 250 mm), eluyendo a un flujo de 1 mL/min a 35 °C. Para cuantificar los ácidos biliares, se utilizó un detector de índice de refracción (410 Refractómetro, Waters, Estados Unidos). Se determinó el contenido total de

ácidos biliares utilizando ácido cólico como patrón interno (Manes & Schneider, 1971; Setchell, Lawson, Tanida & Sjovall, 1983; Zhu & Brown, 1990).

3.5 Ensayos *in vitro*

3.5.1 Cambios en el contenido de colesterol de micelas modelo

La exclusión del colesterol de las micelas modelo se determinó según el ensayo descrito por Nagaoka et al. (2001) con modificaciones.

Obtención de las micelas modelo

Las micelas modelo se prepararon por sonicación. Un volumen de 5 mL de taurocolato sódico (6,6 mM), colesterol (0,5 mM), ácido oleico (1 mM), fosfatidilcolina (0,6 mM), cloruro de sodio (132 mM) y fosfato sódico (15 mM) a pH 7,4, fue sonificado durante 2 minutos, alternando pulsos de 10 segundos de duración a 50 % de intensidad con 10 segundos sin sonicar (Sonics Materials VC-505-220, Fisher Scientific, España). Las micelas se prepararon en presencia o ausencia de las muestras de amaranto y se incubaron durante 2 horas a 37 °C con agitación. Luego se centrifugaron a 70000 \times g durante 1 hora a 20 °C.

Ensayo de desplazamiento de colesterol

Para cada una de las muestras obtenidas, HA, AA, HAD y AAD, se prepararon micelas con 0,01 a 5,00 mg de proteína/mL. Se cuantificaron el colesterol libre en el sobrenadante (ColS) y el colesterol micelar presente en el precipitado (ColP), mediante RP-HPLC. En la determinación se empleó la misma técnica cromatográfica descrita para cuantificar el colesterol contenido en las heces de las ratas.

El porcentaje de desplazamiento de colesterol de las micelas se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de desplazamiento} = \left(\frac{\text{ColS}}{\text{ColS} + \text{ColP}} - \frac{\text{ColS blanco}}{(\text{ColS} + \text{ColP}) \text{ blanco}} \right) \times 100$$

donde el blanco corresponde a las micelas modelo formadas en ausencia de amaranto.

Se graficó el porcentaje de desplazamiento de colesterol *vs* logaritmo de la concentración de proteínas expresada en mg/mL utilizando el software GraphPad Prism 6. Los datos así graficados fueron ajustados por medio de un modelo matemático no lineal, que utiliza una ecuación sigmoidea de dosis respuesta con pendiente variable, y a partir de ese ajuste se calculó la concentración de proteínas que produce el 50 % del desplazamiento de colesterol máximo alcanzado, IC50. Los valores de IC50 calculados se expresaron como la media \pm la desviación estándar.

Medida del tamaño de las micelas por medio de ensayos de dispersión dinámica de luz

El tamaño de partícula de las micelas modelo preparadas sin y con amaranto (1 mg/mL de proteína) se determinó utilizando un espectrómetro de correlación de fotones que permite medir el tamaño de partículas entre 0,6 nm y 6 μ m. Los equipos utilizados, Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) emplean un láser de 633 nm y se encontraban en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, INIFTA, (CONICET-UNLP) y en el Departamento de Industrias, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 37 °C. Para esto se colocó 1 mL de muestra dentro de una cubeta y se dejó dentro del equipo durante 5 minutos a fin de que se equilibre (Rupp, Steckel & Müller, 2010).

Las curvas que representan la intensidad (%) de la luz dispersada en función del diámetro de partícula (nm) se obtuvieron utilizando el software GraphPad Prism 6, y el índice de polidispersidad directamente del Zetasizer NanoZS.

Los valores informados en este trabajo de tesis corresponden al menos al promedio de tres muestras independientes.

3.5.2 Estudio de la interacción entre ácidos biliares y proteínas o péptidos de la semilla de amaranto mediante resonancia plasmónica de superficie

Fundamentos de la técnica

La técnica de SPR, *surface plasmon resonance*, se utilizó para estudiar la interacción entre las proteínas y los péptidos de amaranto con colesterol y ácidos biliares, empleando un equipo BIAcore T100 (GE-Healthcare, Estados Unidos) en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) y el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, IDEHU (CONICET-UBA).

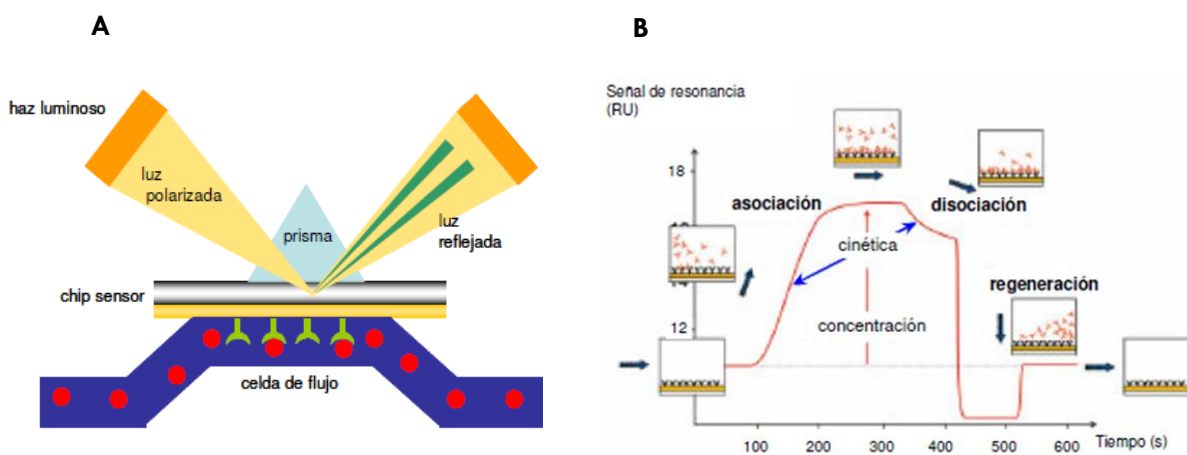


Figura 9 Panel A Esquema del fenómeno de la resonancia plasmónica de superficie. Se muestran el chip sensor, el sistema óptico y la celda de flujo. El ligando unido a la superficie del chip se representa en verde y el analito en solución como círculos rojos. Panel B. Esquema de las interacciones que se establecen entre el ligando unido a la superficie del chip y el analito en solución durante un ensayo de resonancia plasmónica de superficie. La línea roja representa el registro de las unidades de resonancia en función del tiempo o sensograma (Pérez Escoda, 2007).

Esta técnica permite registrar en tiempo real los procesos de interacción que se dan entre dos moléculas, una de ellas denominada ligando, unida a la superficie del sensor, y otra que circula en solución a la que se denomina analito (Malmqvist, 1999; Markey, 2000). El equipo cuenta con un sistema de detección compuesto por una parte óptica y por un chip sensor (**Panel A, Figura 9**). El chip es un dispositivo formado por una superficie de vidrio sobre la que se ubica una lámina de oro de 50 nm de espesor y una matriz hidrofóbica de 100

nm de espesor derivatizada con dextrano carboximetilado (Chip CM5 GE-Healthcare, Estados Unidos). El sistema óptico hace incidir luz infrarroja polarizada sobre la superficie del chip no modificada del sensor; la luz reflejada es analizada en un detector de diodos. El fenómeno de resonancia se produce cuando un haz de luz ilumina la interfase entre dos medios, la lámina de oro y la solución que fluye, que poseen distintos índices de refracción. La onda evanescente creada por la reflexión total interna interacciona con los electrones oscilantes o plasmones del metal, causando una disminución en la intensidad de la luz reflejada. El ángulo de resonancia al que se da este fenómeno es sensible al índice de refracción de la solución próxima al metal (Karlsson, 2004; Nagata & Handa, 2013). El biosensor registra y traduce las variaciones del ángulo de resonancia en función del tiempo en forma de unidades de resonancia arbitrarias, RU; el registro que se muestra en el **Panel B** de la **Figura 9**, se denomina sensograma. En la superficie del chip donde se encuentra inmovilizado el ligando comienza a llegar el analito que fue inyectado; esto produce un aumento en la señal debido a la interacción o asociación que se establece entre el ligando y el analito. Cuando comienza a fluir buffer, la señal comienza a disminuir y se registra la disociación. Finalmente, fluye una solución regeneradora que limpia la superficie y el sensograma muestra una señal que corresponde al retorno a la línea de base inicial.

El equipo permite estudiar tanto fenómenos de afinidad como cinéticos, dependiendo del sistema y de la zona del sensograma que se analice. Las constantes cinéticas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se estudian al comienzo y al final del sensograma, donde las señales dependen directamente de las interacciones que se forman y que se rompen entre ligando y analito. Para realizar estudios de equilibrio y evaluar la afinidad entre analito y ligando, se determina la constante de disociación del sistema (K_D), inversa a la afinidad, en la zona intermedia del sensograma donde la señal depende de la concentración del analito (Markey, 2000).

Diseño experimental e inmovilización de las muestras

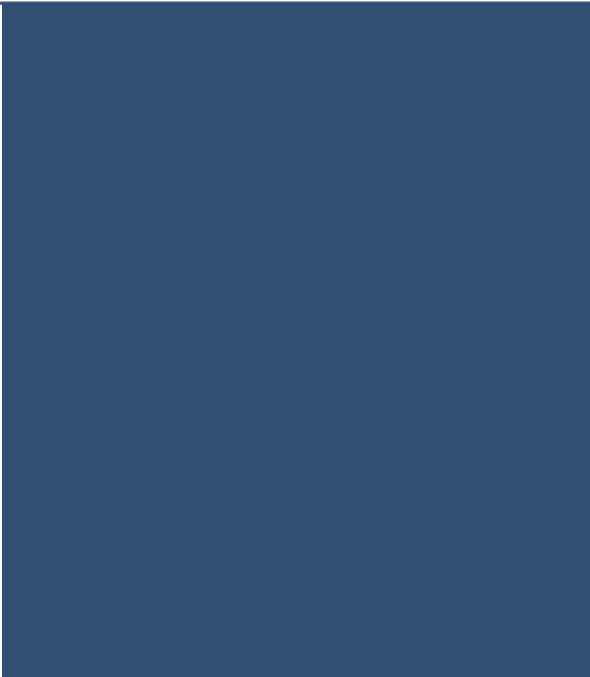
Se estudió la interacción entre las proteínas y/o los péptidos provenientes de las muestras de amaranto, AA y AAD, y el colesterol y tres ácidos biliares, taurocólico, cólico y deoxicólico. Se realizó un ensayo preliminar para establecer el pH más adecuado para inmovilizar las proteínas o los péptidos sobre la superficie del chip. Para eso se tomaron 10 μl de la solución proteica, 1,5 mg/mL, y se llevaron a un volumen final de 150 μl en buffer acetato de sodio 100 mM a pHs 4, 4,5, 5 y 5,5. A continuación la mezcla se hizo impactar sobre la superficie del chip CM5, se evaluó la respuesta en las diferentes condiciones y se seleccionó la condición con la que se obtuvo la señal óptima.

Para obtener la solución de proteínas o péptidos se empleó el mismo buffer, se realizó una dispersión 25 mg/mL e incubó durante 1 hora a 25 °C y se dializó durante toda la noche empleando una membrana de diálisis de 1000 Da de corte (Spectra/Por, Estados Unidos). El sobrenadante obtenido luego de centrifugar la dispersión a 3500 \times g durante 10 minutos a temperatura ambiente se inmovilizó a través de uniones covalentes sobre la superficie del chip CM5 previamente activada con NHS y EDC (N-hidroxisuccinimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbiimida). La activación de la superficie permite el acoplamiento químico de las proteínas y/o los péptidos al chip a través de los grupos amino libres. La inmovilización de las proteínas o péptidos se realizó circulando la dispersión sobre la superficie activada durante 7 minutos a un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Posteriormente se bloquearon los sitios que quedaron libres en la superficie del chip haciéndolos reaccionar con etanolamina a pH 8 durante 7 minutos, empleando un flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 25 °C. La unión de las proteínas y/o de los péptidos al chip se verificó al detectar en el equipo una lectura adecuada en unidades arbitrarias RU.

La asociación entre las proteínas o péptidos de amaranto y los analitos ensayados, colesterol y ácidos biliares, se realizó estableciendo el contacto entre ambos durante 60 segundos a un flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. La disociación se realizó

también durante 60 segundos con igual flujo, pero empleando buffer fosfato 100 mM pH 7. Las soluciones de los analitos, colesterol y ácidos biliares, fueron preparadas a las concentraciones deseadas en buffer fosfato 100 mM pH 7.

La interacción entre las proteínas y/o los péptidos y los analitos se analizó utilizando el software BIAevaluation 4.1 (GE-Healthcare, Estados Unidos).



4. MATERIAL
SUPLEMENTARIO
DE MATERIALES
Y MÉTODOS

4. MATERIAL SUPLEMENTARIO DE MATERIALES Y MÉTODOS

Definiciones de las unidades enzimáticas que expresan las actividades de las enzimas utilizadas.

Obtención de digeridos mediante digestión gastrointestinal simulada

- α -amilasa proveniente de *Bacillus subtilis*, \approx 380 U/mg (Sigma, Estados Unidos). Una unidad es la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de maltosa por minuto a 25 °C y pH 6,9.
- Pepsina, 1:15000 5X unidades NF (MP Biomedicals Fisher Scientific SL, España). Una unidad de pepsina es la cantidad de enzima que digiere 3000 unidades de albúmina de huevo coagulada, a 52 °C y pH entre 2 y 3.
- Pancreatina porcina comercial, 4X-100 USP unidades/mg (MP Biomedicals Fisher Scientific SL, España). una unidad USP de actividad amilasa está contenida en la cantidad de pancreatina que hidroliza almidón a una velocidad inicial de 0,16 μ Eq de enlace glicosídico por minuto a pH 6,8 y 25 °C.
- Una unidad USP de actividad de proteasa está contenida en la cantidad de pancreatina que hidroliza caseína a una velocidad inicial tal que libera péptidos no precipitables por ácido tricloroacético por minuto que presentan la misma absorbancia a 280 nm que 15 nmoles de tirosina a pH 7,5 y 40 °C.
- Una unidad USP de actividad de lipasa está contenida en la cantidad de pancreatina que libera 1,0 μ Eq de ácido graso por minuto a pH 9,0 y 37 °C.

Obtención de fibra dietética de amaranto

- α -amilasa termoestable (Megazyme, Irlanda) \approx 3000 U/mL. Una unidad de α -amilasa es la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil-maltoheptaósido bloqueado en presencia de un exceso de α -glucosidasa, por minuto a pH 6,0 y 40 °C.
- Proteasa (Megazyme, Irlanda) \approx 350 Unidades de tirosina/mL. Una unidad es la cantidad de proteasa que hidroliza caseína para producir un color debido a la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, equivalente a un μ mol (181 μ g) de tirosina por minuto, a pH 7,0 y 40 °C.
- Amiloglucosidasa (Megazyme, Irlanda) \approx 3300 U/mL. Una unidad de actividad de amiloglucosidasa es la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol de D-glucosa por minuto a partir de almidón soluble, a pH 4,5 y 40 °C.



5. RESULTADOS
Y DISCUSIÓN
PARTE I



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, Parte I

5.1 Ensayos *in vivo*

Al ser ingeridos, ciertos granos como avena, soja y chía ejercen efectos hipolipidémicos en los consumidores. Estos efectos han sido adjudicados a distintos componentes de estas semillas y dependen de la dosis suministrada y del período de consumo. Anderson et al. (1984) y Sun et al. (2019) han descrito que la fibra presente en la avena ejerce un efecto directo sobre la excreción de colesterol por vía fecal. En soja se han encontrado varios péptidos que inhiben la síntesis del colesterol (Aiello et al., 2018; Moumita et al., 2018), mientras que Ayerza & Coates (2005) y Ogunremi, Sanni & Agrawal (2015) adjudicaron un marcado efecto hipocolesterolemiante a los lípidos ricos en ácidos grasos ω -3 presentes en la chía. En el caso del amaranto los efectos descritos en la bibliografía sobre el metabolismo de los lípidos son heterogéneos, y varían dependiendo del modelo animal, del tiempo del experimento y de la especie o de los componentes de amaranto ensayados. Por esto, nos propusimos estudiar el efecto de la incorporación de amaranto en una dieta alta en grasa y rica en colesterol, en forma de harina (HA) o de aislado proteico (AA) sobre el perfil lipídico en plasma y en hígado y la excreción de colesterol y ácidos biliares en materia fecal, en ratas Wistar.

5.2 Alimentación de los animales

5.2.1 Dietas, formulación y composición

Para desarrollar este experimento, decidimos alimentar a los animales con la dieta base de mantenimiento (**DB**) formulada en el Instituto Americano de Nutrición, denominada AIN-93M (Reeves et al, 1993) y otra dieta control (**Control**) en la cual se cambió y aumentó la fuente de materia grasa y el

contenido de colesterol. La **DB** contiene 4 % p/p de aceite de soja como fuente de lípidos, mientras que la **Control** fue formulada con 10 % p/p de grasa de cerdo. Además, en la dieta **Control** se adicionó 2 % p/p de colesterol. Para analizar el efecto que tienen el tiempo de ingesta, la cantidad de proteína de amaranto suministrada y otros componentes que acompañan a las proteínas, se eligieron harina y aislado como fuentes proteicas de amaranto. Se diseñaron dos esquemas de alimentación. En uno de ellos los animales fueron alimentados durante 30 días con una dieta en la cual se reemplazó el 25 % de la caseína de la dieta **Control** por proteína proveniente de harina o aislado proteico de amaranto. Las dietas y los grupos de animales se denominaron **HA30** y **AA30**, (**Tabla 6**). En el segundo esquema, los animales fueron alimentados durante 7 días con una dieta en la cual se reemplazó el 50 % de la caseína de la dieta **Control** por proteína proveniente de harina o aislado proteico de amaranto. Los grupos de animales se denominaron **HA7** cuando fueron alimentados durante 7 días con harina de amaranto como fuente proteica y **AA7** cuando fueron alimentados con aislado proteico de amaranto (**Tabla 6**).

Previo a preparar las dietas según los esquemas descritos en el párrafo anterior, caracterizamos la harina y el aislado proteico de amaranto que se usaron como fuente de proteína. Para esto obtuvimos ambas muestras según lo descrito en las **secciones 3.2.1** y **3.2.2** y determinamos su composición centesimal, según lo descrito en la **sección 3.3.1**. Todas las determinaciones se realizaron al menos 3 veces para cada una de las muestras y los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 8**.

Los componentes mayoritarios de la harina de amaranto son los hidratos de carbono, 69,0 % (**Tabla 8**), en particular el almidón. Según Stone & Lorenz (1984) el contenido de almidón de amaranto varía entre 48 y 69 %, dependiendo de la especie.

Tabla 8 Composición centesimal de harina y aislado proteico de amaranto.

Composición % b.h.	HA	AA
Proteínas	13,6±0,8	80,7±0,7
Glúcidos	69,0±0,2	8,3±0,2
Humedad	8,22±0,04	8,55±0,03
Cenizas	2,4±0,2	2,6±0,2
Lípidos	7,3±0,3	1,2±0,3

b.h base húmeda. Los valores expresan la media ± el desvío estándar, gramos de componente cada 100 gramos de muestra y son el promedio de al menos 3 determinaciones independientes

Además de almidón, la fracción glucídica de las semillas de amaranto contiene azúcares libres, tales como sacarosa (0,41-0,87 %), glucosa (0-0,67 %), rafinosa (0,13-0,32 %), fructosa (0-0,45 %), estaquiosa (0,012-0,15 %) y maltosa (0-0,66 %) (Ačanski & Vujić, 2014; Lorenz & Gross, 1984). De todos estos glúcidos, sólo el $8,3 \pm 0,2$ % acompaña a las proteínas en el aislado proteico de amaranto (**Tabla 8**).

En este grupo de sustancias, se encuentra también la fibra dietética presente en la harina y en el aislado proteico de amaranto. La fibra dietética está compuesta por glúcidos complejos que no pueden ser digeridos ni absorbidos en el intestino delgado, pero que cumplen un papel muy importante en la nutrición debido a que modifican la motilidad intestinal, actúan como prebióticos y ejercen efectos biológicos sobre los sistemas cardiovascular e inmune (Ötles & Ozgoz, 2014). Como se mencionó en la **sección 1.4**, las semillas de amaranto contienen entre 8 y 16 % de fibra dietética. La fibra dietética de amaranto se compone de xiloglucanos y polisacáridos pécticos que varían en cantidades y estructuras dependiendo de la fracción de fibra dietética. La fibra dietética insoluble, que corresponde al 78 % de la fibra dietética total, está compuesta por ácido galacturónico, arabinosa, galactosa, xilosa y glucosa. Los monosacáridos producto de la hidrólisis completa de la fibra dietética soluble (22 % respecto a

la fibra dietética total) son glucosa, ácido galacturónico y arabinosa. La composición de la fibra dietética de amaranto es diferente a la de los cereales y se asemeja más a la de las frutas, verduras y leguminosas (Lamothe et al., 2015). En el presente trabajo de tesis, cuantificamos la fibra dietética empleando un kit comercial tal como se describió en la **sección 3.3.5**. Para esta determinación realizamos una serie de incubaciones con enzimas (alfa-amilasa, proteasas y beta-glucosidasa) que simulan el proceso digestivo. Al finalizar este proceso y luego de una precipitación utilizando etanol, obtuvimos la fibra dietética total presente en la muestra analizada. Además del contenido de fibra dietética total determinamos el contenido de fibra dietética soluble e insoluble. El contenido de fibra dietética total de la harina fue $10,8 \pm 0,4$ %, donde el $8,6 \pm 0,9$ % corresponde a la fracción insoluble y el 2,2 % a la fracción soluble. Estos valores representan el 79 % y el 20 % de la fibra dietética total respectivamente y están en concordancia con los descriptos en bibliografía (Lamothe et al., 2015). Al determinar la fibra dietética total en el aislado proteico encontramos que fue $4,8 \pm 0,8$ %, donde $4,1 \pm 0,1$ % corresponde a la fracción insoluble y 0,7 % a la fracción soluble. Es llamativo que el 85 % de la fibra dietética presente en el aislado proteico de amaranto corresponda a la fracción insoluble. Posiblemente los polisacáridos que componen esta fracción de fibra dietética insoluble estén interactuando con las proteínas de amaranto cuando son solubilizadas a pH 9 y coprecipiten con ellas cuando son insolubilizadas en su punto isoeléctrico para obtener el aislado proteico.

El contenido de proteínas de la harina de amaranto fue $13,6 \pm 0,8$ % (**Tabla 8**). En el amaranto el endospermo del grano contiene el 35,0 % de la proteína total, mientras que el germen y la cobertura de la semilla contienen el 65 % restante. Esta distribución es bastante diferente a la que presentan el maíz, el sorgo y el arroz, por ejemplo, en donde el germen contribuye con una pequeña proporción, entre 12,5 y 18,5 % del contenido proteico total, y el endospermo con el 81,5 al 87,5 % (Bressani, 1989). En la harina de amaranto, se encuentran

presentes albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas en porcentajes variables (Janssen et al., 2017). Las diferencias cuantitativas están asociadas con el método de obtención de las fracciones, aunque pueden influir la variedad de amaranto analizada y las condiciones del cultivo (Bressani, 1989; Velarde-Salcedo et al., 2019).

El aislado proteico obtenido en este trabajo de tesis a partir de la harina de amaranto contiene $80,7 \pm 0,7$ % de proteínas (**Tabla 8**), valor 6 veces mayor al contenido proteico de la harina. Este valor coincide con los habitualmente obtenidos en nuestro laboratorio (Avanza, Puppo & Añón, 2006; Nardo, 2017; Orsini Delgado et al., 2016; Sabbione, 2015; Sabbione et al., 2016). Los aislados proteicos obtenidos contienen albúminas, globulinas y glutelinas. Las albúminas presentan dos fracciones de diferente coeficiente de sedimentación entre 1,4 y 2S y alrededor de 4,6S (Velarde-Salcedo et al., 2019). Las globulinas, mayoritarias en el aislado proteico, están compuestas principalmente por tres fracciones 11S, 7S y la denominada globulina-P (Martínez, Castellani & Añón, 1997; Quiroga, Martínez, Rogniaux, Geairon & Añón, 2009). La fracción 11S es más abundante que la 7S (Barba de la Rosa, Gueguen, Paredes-Lopez & Viroben, 1992). Las glutelinas constituyen el segundo grupo cuantitativamente más importante en el aislado proteico. Las globulinas 11S, globulina-P y glutelinas presentan características similares a las de las leguminas. Las leguminas son un grupo de proteínas de almacenamiento en semillas, ampliamente distribuidas entre angiospermas y gimnospermas. Generalmente están conformadas por hexámeros y los monómeros están compuestos por un polipéptido ácido llamado A y otro más pequeño de naturaleza básica denominado B. Los dos polipéptidos derivan de una preproteína única que se escinde postraduccionalmente para producir la subunidad A-B característica de esta familia de proteínas, en la cual los polipéptidos obtenidos quedan unidos por un puente disulfuro (Quiroga, Martínez & Añón, 2007).

La fracción proteica de AA y HA fue analizada mediante electroforesis SDS-PAGE (**Figura 10**).

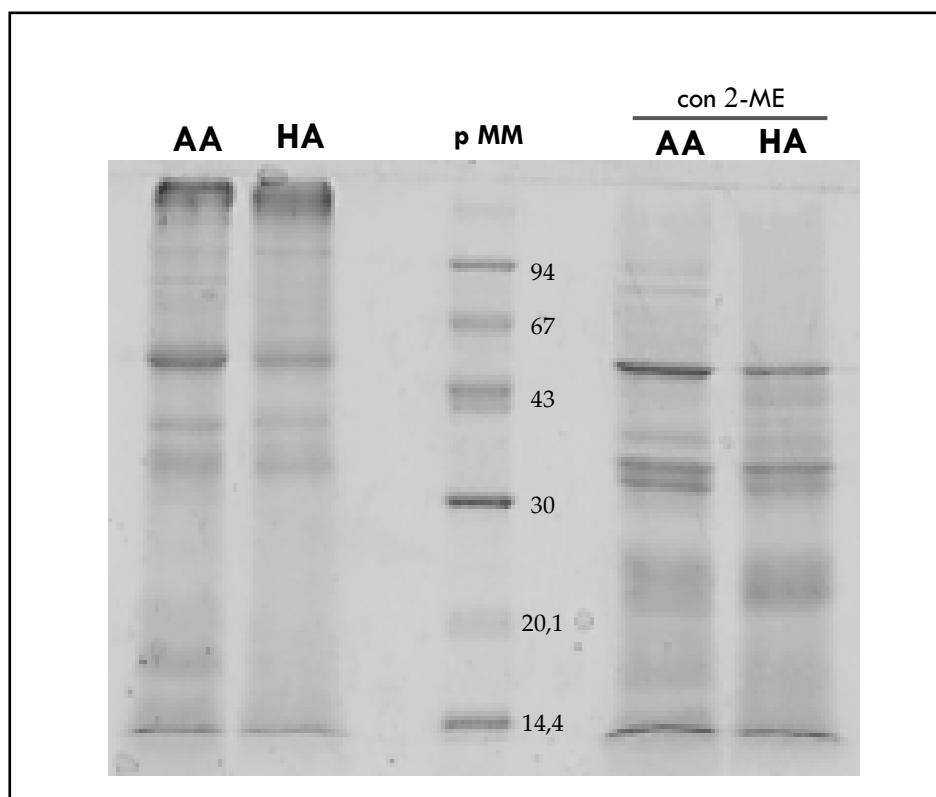


Figura 10 Electroforesis SDS-PAGE de aislado (AA) y harina (HA) de amaranto en condiciones no reductoras y reductoras (con 2-ME). La calle central corresponde a proteínas patrón de bajo peso molecular.

El aislado de amaranto mostró el perfil electroforético típico (**calle AA, Figura 10**) en concordancia con lo informado por otros autores (Abugoch, Martínez & Añón, 2010). Se observaron bandas de masa molecular de 67 kDa, constituyentes de la globulina 7S, de 56-54 kDa correspondientes a las subunidades A-B de la globulina 11S y al polipéptido P-54 de la globulina-P; bandas de aproximadamente 30 kDa y 20 kDa correspondientes a polipéptidos A y B libres de la globulina 11S, y bandas de masa molecular menor a 20 kDa, que pueden corresponder a la fracción albúminas (Castellani, Martínez & Añón, 1998; Martínez et al., 1997; Quiroga et al., 2009; Quiroga, Martínez, Rogniaux, Geairon & Añón, 2010; Quiroga et al., 2007). También se detectaron especies de alta masa molecular en la zona superior del gel que se corresponden con la

existencia de agregados solubles en el buffer de muestra bajo las condiciones de ensayo. Estos agregados desaparecen cuando las muestras se tratan con 2-mercaptoetanol. En condiciones reductoras, se intensifican las bandas pertenecientes a los polipéptidos A, cuyas masas moleculares se encuentran entre 32 y 34 kDa, y las que corresponden a los polipéptidos B, de masas moleculares entre 20 y 22 kDa, que se generan como consecuencia de la ruptura del puente disulfuro que los mantenía unidos formando la subunidad A-B. Los perfiles correspondientes a la harina de amaranto son muy similares a los discutidos previamente para el aislado proteico; solo se observan diferencias en la intensidad de las especies polipeptídicas correspondientes a la fracción globulinas.

Otros componentes presentes en la harina y en el aislado proteico de amaranto son los lípidos, aunque minoritarios respecto a las proteínas, hidratos de carbono y fibra dietética. El amaranto, tal como se mencionó previamente, contiene 2 a 3 veces más lípidos que el maíz, el trigo, el sorgo y algunas variedades de arroz (Velarde-Salcedo et al., 2019). Estos lípidos están compuestos mayoritariamente por triacilglicéridos que se encuentran libres y, fosfolípidos y glucolípidos que se encuentran interaccionando con otras moléculas. Entre el 72 y el 84 % de los ácidos grasos presentes en las semillas de amaranto son insaturados. Los ácidos grasos más abundantes son el ácido linoleico (18:2), el ácido oleico (18:1) y el ácido palmítico (16:0) que representan aproximadamente un 50, 24 y 20 % del total respectivamente (**Tabla 4**). También es una fuente de tocoferoles α , β , γ y δ (13,3; 26,8; 5,7 y 19,5 mg/100 g de semilla, respectivamente) y de fitoesteroles como β -sitoesterol, campesterol, estigmasterol y brassicasterol (497,7; 20,7; 306,6 y 21,0 mg/100 g de semillas, respectivamente) (Marcone, Kakuda & Yada, 2003; Pina-Rodriguez & Akoh, 2009). Los fitoesteroles son moléculas que tienen una estructura química similar al colesterol, presentan muy baja absorción intestinal, bloquean la absorción del colesterol y tienen efecto sobre los niveles de LDL circulantes. Este efecto se

debe a que tienen la capacidad de desplazar colesterol de las micelas y aumentar la expresión de una proteína que transporta colesterol desde el interior del enterocito hacia el lumen intestinal (Jakulj et al., 2005; Marcone et al., 2003; Ostlund & Lin, 2006; Pina-Rodriguez & Akoh, 2009; Von Bergmann, Sudhop & Lütjohann, 2005). El componente mayoritario de la fracción insaponificable presente en los lípidos de amaranto es el escualeno que representa alrededor del 6-8 % de los lípidos totales. Esta es una cantidad considerablemente mayor a la presente en otros granos de cereales (0,03 %) o girasol (0,01 %). El escualeno, como precursor del colesterol, inhibe la HMG-CoA reductasa evitando la síntesis del colesterol (He & Corke, 2003).

La harina de amaranto utilizada en este trabajo de tesis contiene $7,3 \pm 0,3$ % de lípidos, mientras que el aislado proteico sólo posee $1,2 \pm 0,3$ % (**Tabla 8**), ya que se obtuvo a partir de harina desgrasada. No se realizaron determinaciones respecto a la composición de las distintas clases de lípidos presentes en la harina o en el aislado proteico de amaranto.

Tabla 9 Composición centesimal de las dietas experimentales.

Componente/dieta	Control	AA30	HA30	AA7	HA7	DB
Proteínas	14,3±0,6 ^{ns}	14,5±1,1 ^{ns}	14,7±0,5 ^{ns}	14,7±1,2 ^{ns}	14,5±1,0 ^{ns}	14,8±0,5 ^{ns}
Lípidos	10,5±1,6 ^{ns}	11,7±0,0 ^{ns}	11,2±0,0 ^{ns}	11,8±0,1 ^{ns}	11,5±0,1 ^{ns}	3,2±0,1 [§]
Glúcidos ^ε	67,1	65,5	64,8	63,2	62,2	73,3
Agua	4,9±0,1	4,8±0,3	6,1±0,0	7,6±0,1	8,4±0,2	5,3±0,4
Cenizas	3,2±0,0	3,5±0,3	3,2±0,0	2,7±0,0	3,4±0,0	3,4±0,0

Los valores se expresan en % p/p y corresponden a la media \pm el desvío estándar. ^ε el contenido de glúcidos en las dietas se determinó por diferencia ns: diferencia no significativa, [§] diferencia significativa (Test de Tuckey, $p < 0,05$)

Utilizando las materias primas, harina y aislado proteico de amaranto, anteriormente descritas se prepararon las distintas dietas con las que fueron alimentados los animales (**sección 3.4.3, Tabla 7**). Asimismo, se determinó la composición centesimal de las dietas luego de ser formuladas, los valores obtenidos para cada uno de los macrocomponentes fueron los esperados. Los datos se presentan en la **Tabla 9**.

5.2.2 Consumo de alimento y crecimiento de los animales

En la **Tabla 10**, se muestran el consumo diario de alimento, la ganancia de peso de los animales y la eficiencia alimentaria para los diferentes grupos bajo ensayo. A excepción de los animales que integraron el grupo **HA7** en el que la ingesta fue significativamente menor que en el resto de los grupos, en promedio 35 % más baja, todos consumieron entre 15 y 19 g de alimento por día. Aunque la ingesta de los animales del grupo **HA7** fue menor, esta diferencia no se reflejó ni en la ganancia de peso que experimentaron los animales durante el ensayo ni en los valores de eficiencia alimentaria (**Tabla 10**).

Es importante destacar que aunque todos los grupos, excepto el que consumió la dieta base (**grupo DB**), fueron alimentados con dietas con alto contenido de grasa (21,5 % de las calorías totales aportadas por grasa) no se observaron diferencias significativas en el aumento de peso entre los grupos respecto al del **Control**. Estos datos concuerdan con numerosos estudios que han evaluado la relación que existe entre una dieta alta en grasa y el efecto fisiológico que tiene sobre los animales. Estos estudios consideran que una dieta alta en grasa es aquella en la cual la grasa aporta entre el 20 y el 40 % de las calorías totales de la dieta (Águila, Loureiro, Pinheiro & Mandarim de Lacerda, 2002; Buettner, Schölmerich & Bollheimer, 2007; Gill, Smith, Wissler & Kunz, 1989; Peckham, Entenman & Carroll, 1962). Peckham et al. (1962) estudiaron el efecto que tiene una dieta alta en grasa sobre la composición del cuerpo y el tejido adiposo de 125 ratas; iniciaron el estudio cuando los animales tenían 3,5 semanas de vida y lo finalizaron a las 76 semanas de edad. Estos investigadores describieron que recién luego de 12 semanas de ensayo se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento, siendo mayor el peso de los animales que consumieron la dieta alta en grasa. Buettner et al. (2007) compararon las curvas de crecimiento de un grupo de ratas Wistar alimentadas con una dieta que contenía una cantidad de grasa de cerdo que aportaba el 42 % de las calorías

totales, con otro grupo en el que las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar, en la cual la grasa aportaba el 11 % de las calorías. Observaron que recién luego de 4 semanas de alimentación estos dos grupos se diferenciaban significativamente, siendo mayor el peso de los animales alimentados con la dieta conteniendo grasa de cerdo. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis concuerdan con lo descripto previamente. En nuestro ensayo, el aumento de peso de los animales fue similar en todos los grupos lo cual puede deberse a dos factores: por un lado, las calorías aportadas por la grasa presente en las dietas se ubican en el límite inferior entre las dietas denominadas altas en grasa y, por el otro, el tiempo de ensayo en el cual los animales consumieron esta dieta fue solo de 4 semanas.

Tabla 10 Cantidad de alimento ingerido, peso y eficiencia alimentaria en los grupos de animales estudiados.

	Grupos de animales					
	Control	AA30	HA30	AA7	HA7	DB
Ingesta diaria (g/día)	17,4±0,5	16±0,8 ^{ns}	18,2±0,8 ^{ns}	15,2±0,9 ^{ns}	11,7±0,6 [*]	19±1 ^{ns}
Ingesta total (g)	3136	2883	3276	638	492	3504
Peso corporal (g)						
Inicial	377±18	345±9	328±16	346±11	322±5	369±17
Final	432±16	395±9	373±9	374±8	368±7	399±22
Variación de peso (g)	55±28	50±13 ^{ns}	45±26 ^{ns}	28±16 ^{ns}	46±12 ^{ns}	29±13 ^{ns}
Ganancia de peso por día (g/día)	1,8±0,8	1,6±0,4 ^{ns}	1,5±0,8 ^{ns}	0,9±0,5 ^{ns}	1,5±0,4 ^{ns}	0,6±0,3 ^{ns}
^a Eficiencia alimentaria %	11±5	10±3 ^{ns}	8±4 ^{ns}	6±3 ^{ns}	13±3 ^{ns}	5±2 ^{ns}

*($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$), ****($p < 0,0001$) diferencia significativa comparada con el **Control**; ns: diferencia no significativa comparada con el **Control** (análisis de varianza, ANOVA seguido del test de *Dunnett*) los valores expresan la media y el error estándar de la media. ^aEficiencia alimentaria % = (ganancia de peso/ingesta de alimento) x 100

5.3 Perfiles lipídicos en plasma, hígado y materia fecal

5.3.1 Animales alimentados por largo tiempo con una dieta conteniendo proteínas de amaranto en baja proporción

La ingesta de la dieta alta en grasa (dieta **Control**) produjo un incremento del colesterol (**Panel A, Figura 11**) y una disminución de HDL plasmáticos (**Tabla 11**) respecto a la dieta **DB**, del orden del 12 y 13 %, respectivamente. Cuando se estudiaron los parámetros hepáticos del grupo de animales alimentados con la dieta **Control**, se detectó un aumento notable del peso del hígado respecto a los que consumieron la dieta **DB** (35 %). El contenido de fosfolípidos, lípidos totales y colesterol hepáticos también se incrementó respecto de los animales del grupo **DB**, 70, 125 y 20 %, respectivamente (**Tabla 11, Panel B, Figura 11**). Los animales que ingirieron la dieta **Control** consumieron lípidos que contenían 44,5 y 11,7 % de ácidos grasos saturados (SFA) y poliinsaturados (PUFA) respectivamente; en cambio los que ingirieron la dieta **DB**, recibieron 15,0 y 62,5 % de ácidos grasos saturados y poliinsaturados respectivamente (**Tabla 12**). Así la relación PUFA/SFA cambió de 0,3 para la dieta **Control** a 4 para la dieta **DB** (**Tabla 12**). Además, con relación a la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados, el grupo **Control** recibió el doble de lo que ingirió el grupo que consumió la dieta **DB** (**Tabla 12**). Es difícil comparar estos datos con la bibliografía existente debido a la gran diversidad de modelos y dietas utilizados en los ensayos. Sin embargo, podemos decir que los datos obtenidos en este trabajo de tesis muestran las mismas tendencias que las descritas por otros autores, quienes informan que al aumentar la cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados a expensas de los poliinsaturados, aumentan los niveles de colesterol y lípidos totales en hígado y los niveles de colesterol en plasma (Chang & Huang, 1990; Chang & Huang, 1999; Kris-Etherton, Ho & Fosmire, 1984).

Los animales que consumieron la dieta base, grupo **DB**, excretaron $0,36 \pm 0,07$ mg de colesterol/día/g de comida por heces, en tanto los del grupo **Control** excretaron 9,5 veces más (**Panel C, Figura 11**). Asimismo, los animales pertenecientes al grupo **Control** excretaron un 50 % más de ácidos biliares que los pertenecientes al grupo **DB** (**Panel D, Figura 11**).

Tabla 11 Parámetros lipídicos en hígado y plasma de los animales alimentados con el esquema de reemplazo proteico de largo plazo.

	Grupos de animales			
	Control	AA30	HA30	DB
HÍGADO				
Peso (g)	12,4±0,8	11,2±0,3 ^{ns}	11,8±0,8 ^{ns}	8,9±0,6 ^{**}
Fosfolípidos – FL (mg/100 mg de hígado)	1,93±0,09	1,7±0,06 ^{ns}	1,86±0,07 ^{ns}	1,13±0,07 ^{****}
Triacilglicéridos – TAG (mg/100 mg de hígado)	1,1±0,1	1,02±0,07 ^{ns}	0,95±0,05 ^{ns}	1,08±0,07 ^{ns}
Lípidos totales – LT (mg/100 mg de hígado)	14±1	9±1 ^{**}	13±0,8 ^{ns}	6,2±0,5 ^{****}
PLASMA				
Volumen de sangre (mL)	9,4±0,3	8,7±0,4 ^{ns}	9,1±0,7 ^{ns}	7,7±0,8 ^{ns}
HDL (g/L)	0,34±0,01	0,37±0,01 ^{ns}	0,37±0,01 ^{ns}	0,39±0,01 ^{**}
LDL (g/L)	0,33±0,01	0,35±0,01 ^{ns}	0,33±0,00 ^{ns}	0,33±0,01 ^{ns}
TAG (g/L)	1,38±0,03	1,41±0,03 ^{ns}	1,29±0,02 ^{ns}	1,4±0,1 ^{ns}

HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad, TAG: triacilglicéridos. *(p<0,05), **(p<0,005), ***(p<0,0005), ****(p<0,0001) diferencia significativa comparada con el **Control**; ns: diferencia no significativa comparada con el **Control** (análisis de varianza, ANOVA, seguido del test de *Dunnnett*)

El plasma de los animales del grupo **AA30**, alimentados por un período prolongado con la dieta alta en grasa que contenía caseína y aislado proteico de amaranto (75:25) presentó el mismo contenido de HDL, LDL y triacilglicéridos (**Tabla 11**) y un nivel de colesterol ligeramente superior, 7 %, al del grupo **Control** (**Panel A, Figura 11**). El contenido de lípidos totales (**Tabla 11**) y de colesterol en el hígado de estos animales fue 36 y 96 % menor (**Panel B, Figura 11**), respectivamente, al del grupo **Control**, mientras que el de triacilglicéridos y

el de fosfolípidos fue equivalente en ambos grupos (**Tabla 11**). En heces, los animales excretaron mayor cantidad de colesterol y ácidos biliares, 23 y 25 % respecto a los del grupo **Control**, respectivamente (**Paneles C y D, Figura 11**).

Los animales del grupo **HA30**, que se diferencian de los anteriores en que el aporte de proteína de amaranto se hizo en forma de harina en lugar de aislado proteico, mostraron un comportamiento totalmente diferente.

Tabla 12 Porcentaje de ácidos grasos aportados por las dietas base y control.

Ácidos Grasos	Dieta	
	Base	Control
14:0	0,52	3,68
14:1 n-9	-	0,89
16:0	11,38	25,98
16:1	-	3,4
17:0	-	0,96
18:0	3,12	13,92
18:1 n-9	22,49	39,46
18:2 n-6	55,48	10,39
18:3 n-3	7,01	1,32
ΣSFA	15,0	44,5
ΣMUFA	22,5	43,7
ΣPUFA	62,5	11,7
PUFA/SFA	4	0,3
MUFA/SFA	1,5	1
PUFA/MUFA	3	0,3

ΣSFA: sumatoria del % de ácidos grasos saturados; ΣMUFA: sumatoria del % de ácidos grasos monoinsaturados; ΣPUFA: sumatoria del % de ácidos grasos poliinsaturados

Los niveles de HDL, LDL, triacilglicéridos (**Tabla 11**) y colesterol en plasma (**Panel A, Figura 11**) no se diferenciaron de los correspondientes al grupo **Control**, como así tampoco el contenido de lípidos totales, triacilglicéridos y fosfolípidos presentes en hígado (**Tabla 11**). La cantidad de colesterol en hígado fue casi la mitad que la detectada para el grupo **Control**, 53 % más baja (**Panel B, Figura 11**). Los animales de este grupo, **HA30**, excretaron mayor cantidad de colesterol y ácidos biliares en materia fecal, 108 y 110 % más que los animales del grupo **Control** (**Paneles C y D, Figura 11**).

Aunque existe una pequeña diferencia en el contenido de proteína de amaranto presente en las dietas **AA30** y **HA30**, 2,9 y 2,5 g/100 g de dieta respectivamente, difieren básicamente en el contenido de fibra dietética. Mientras **HA30** posee aproximadamente 1,9 % de fibra dietética, **AA30** contiene solo 0,04 %. Estas dietas también difieren en el aporte de lípidos provenientes de amaranto, el cual fue de 0,043 y 1,3 % para **AA30** y **HA30**, respectivamente. Al comparar los resultados hallados en los animales alimentados con **AA30** y **HA30**, observamos diferencias tanto en los niveles de colesterol en plasma e hígado como en su excreción por heces. Los datos obtenidos sugieren que la presencia de fibra promueve la excreción de colesterol y ácidos biliares por heces ya que los animales del grupo **HA30** excretan 68 % más de colesterol y 40 % más de ácidos biliares por vía fecal que los del grupo **AA30**. Los productos resultantes de la digestión gastrointestinal de las proteínas de amaranto, péptidos de diferente tamaño y composición, pueden alterar el metabolismo lipídico y afectar la excreción de colesterol por heces tal como se observa en el grupo **AA30**. Estos productos sumarían su efecto al que ejerce la fibra en los animales alimentados con harina de amaranto.

García-Díez et al. (1996) estudiaron el efecto de la fibra soluble sobre la excreción de ácidos biliares por heces en ratas Wistar. Estos autores utilizaron dos grupos de animales: uno alimentado con una dieta libre de fibra y otro con agregado de pectina. Observaron que la presencia de pectina en las dietas produjo un aumento en la excreción de ácidos biliares, que fue un 168 % más elevada que la que presentaron los animales que consumieron la dieta libre de fibra. Buhman, Furumoto, Donkin & Story (1998) hallaron efectos similares a los descritos por García-Díez et al. (1996) utilizando Psyllium como fuente de fibra soluble natural en lugar de pectina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo de tesis respaldando el concepto de que la fibra dietética incrementa la excreción de colesterol y ácidos biliares por heces, tal

como se observa en los resultados obtenidos con el grupo de animales alimentados con harina de amaranto.

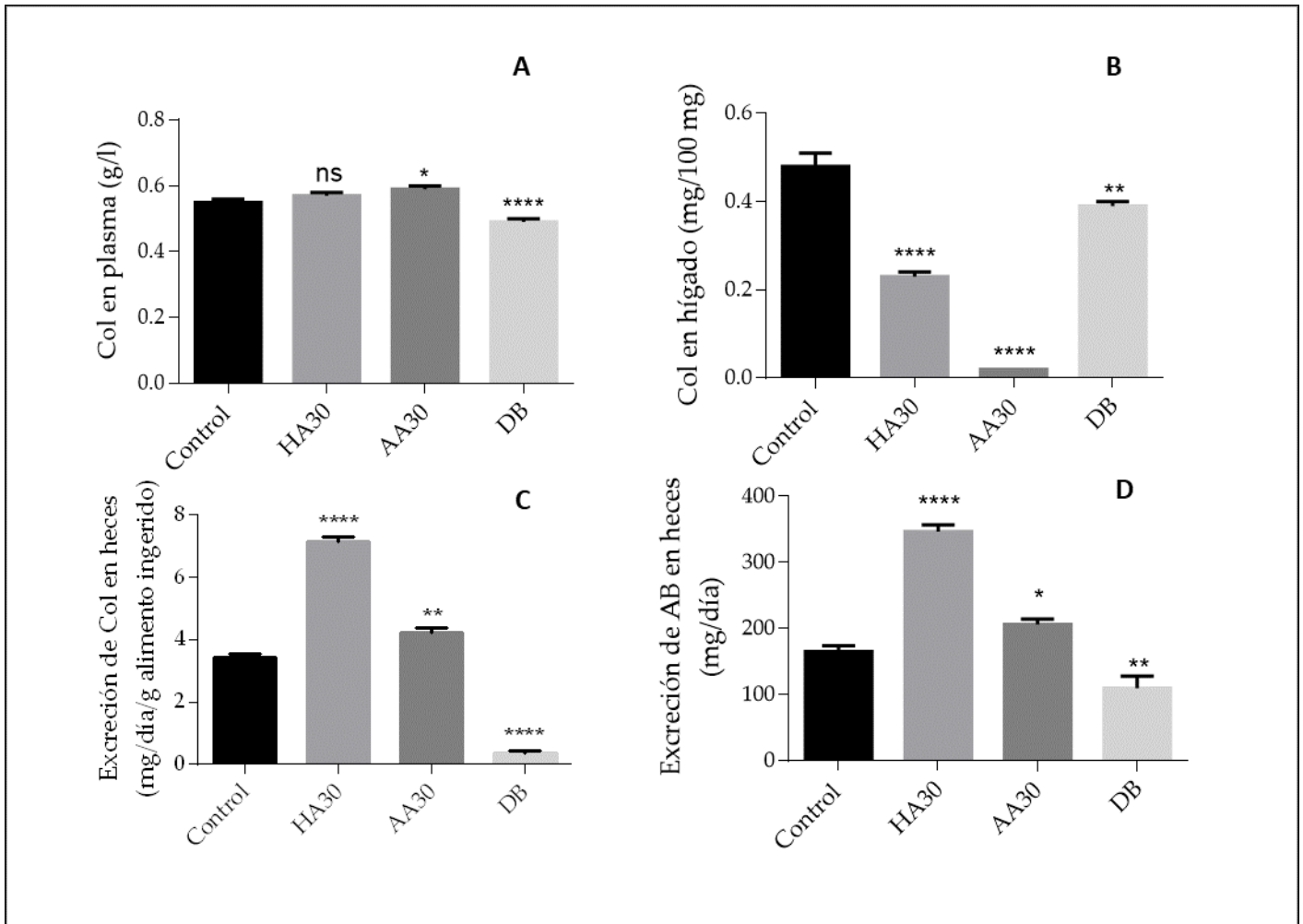


Figura 11 Cuantificación de colesterol y ácidos biliares en animales alimentados durante 30 días con dietas que contienen como fuente de proteína, harina de amaranto (HA30) o aislado de amaranto (AA30), reemplazando el 25% de la caseína de la dieta base. Colesterol en plasma (Panel A), en hígado (Panel B), en heces (Panel C) y ácidos biliares en heces (Panel D). *($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$), ****($p < 0,0001$) diferencia significativa comparada con el **Control**; ns: diferencia no significativa comparada con el **Control** (análisis de varianza, ANOVA, seguido del test de *Dunnett*).

La fibra dietética presente en el amaranto, rica en glúcidos pécticos, podría aumentar la viscosidad en el lumen intestinal o interaccionar con los ácidos biliares, mientras que los péptidos que se generan durante la digestión de las proteínas de amaranto podrían captar ácidos biliares. Estos péptidos

interaccionarían con los ácidos biliares mediante uniones no covalentes mayormente del tipo hidrofóbica (Kongo-Dia-Moukala, Zhang & Claver Irakoze, 2011; Tanaka, Aso & Sugano, 1984; Zhuang, Li, Cai, Wang & Lei, 2017). Sin embargo, estos mecanismos aún no han sido elucidados de manera completa. Si bien no se puede descartar el efecto de los componentes de la fracción de lípidos de amaranto en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, éste debería ser mínimo ya que los animales ingieren entre 16 y 18 g de alimento por día, con 0,2 y 0,007 g de lípidos de amaranto en las dietas **HA30** y **AA30**, respectivamente. Algunos autores han estudiado el efecto que tienen los lípidos de amaranto sobre el metabolismo del colesterol en ratas. Shin, Heo, Lee & Kim (2004) analizaron el efecto de la incorporación de harina, aceite y escualeno provenientes de amaranto en las dietas con las que alimentaron ratas Sprage-Dawley. Estos autores, a diferencia de nuestro ensayo, utilizaron como fuente de lípidos aceite de maíz en la dieta control y 1 % de colesterol. Realizaron un primer ensayo en el cual durante 4 semanas administraron a un grupo de animales harina de amaranto a razón de 300 g/kg de dieta, reemplazando de este modo el 20 % de la caseína por proteína de amaranto. Otro grupo de animales recibió aceite de amaranto a razón de 90 g/kg de dieta en lugar de aceite de maíz. Observaron que, en el grupo que consumió aceite de amaranto, el nivel de HDL en plasma aumentó 61 %, mientras que la excreción de colesterol y ácidos biliares vía heces se incrementó 135 y 114 %, respectivamente, respecto al grupo que consumió harina de amaranto. Estos autores sugirieron que el efecto sobre el metabolismo del colesterol se debió a la fracción lipídica insaponificable del amaranto ya que la composición de ácidos grasos del aceite de amaranto no difiere de la del aceite de maíz utilizado en la dieta control, atribuyeron el efecto hipolipemiante al escualeno. En función de este resultado, decidieron administrar escualeno, 200 mg/kg de animal por día, en forma de una solución salina vía endovenosa durante 7 días. En este ensayo, encontraron una disminución de colesterol en hígado y en plasma, 35 y 28 %,

respectivamente, y un aumento en la excreción de colesterol y ácidos biliares vía heces, 67 y 45 %, respectivamente, comparado con el grupo control en el cual solo se administró la solución salina sin escualeno. En nuestro ensayo, los animales que más lípidos de amaranto consumieron fueron los del grupo **HA30**, alrededor de 0,2 g por día. Este valor es 6 veces menor al utilizado en el ensayo de Shin et al. (2004) en el cual los animales consumieron alrededor de 1,3 g de lípidos de amaranto por día. Además, la ingesta diaria de lípidos de los animales **HA30**, 0,2 g, incluye solamente 10 mg de escualeno, cantidad sensiblemente menor a la ensayada por Shin et al. (2004); por ello, podemos inferir que el efecto ejercido por la fracción lipídica en nuestro ensayo podría ser despreciable.

Si bien en la literatura existen numerosos trabajos que analizan el efecto hipocolesterolémico de la adición de proteínas de cereales y pseudocereales a dietas altas en grasa resulta muy difícil realizar una comparación estricta entre los resultados obtenidos y reportados, dado que en todos los casos se emplean diferentes fuentes proteicas y distintos sistemas animales, como también diferentes dietas. A pesar de ello, dichos trabajos muestran una clara tendencia a que las proteínas de origen vegetal modifican el perfil lipídico de los animales, particularmente en hígado, e incrementan la excreción de colesterol y ácidos biliares por heces. En el caso particular de las proteínas de amaranto los trabajos realizados en los que se han utilizado ratas Wistar, con dietas que contienen proteínas de aislados proteicos (Lado et al., 2015) o concentrados proteicos (Escudero, Zirulnik, Gomez, Mucciarelli & Giménez, 2006) y un tiempo de alimentación de 28 a 32 días, muestran resultados similares a los obtenidos en este trabajo de tesis, particularmente aquellos relacionados con la modificación del perfil lipídico en hígado. Escudero et al. (2006) detectaron una reducción en el contenido de LDL y triacilglicéridos en el plasma de las ratas, mientras que en nuestro ensayo estos valores permanecieron iguales a los de los animales del grupo **Control** (Tabla 11). Esta diferencia posiblemente se

relacione con el hecho de que estos autores utilizaron un concentrado proteico de amaranto como única fuente de proteínas en tanto que, en nuestro caso se realizó solo una sustitución del 25 % de la caseína presente en la dieta **DB** por proteína de aislado de amaranto. Es probable que el bajo nivel de reemplazo de caseína realizado en este trabajo de tesis no sea suficiente para contrarrestar el efecto hipercolesterolémico de la caseína, previamente descrito por Beynen (2011). Chaturvedi et al. (1993) analizaron el efecto del reemplazo total de la fuente de proteína, utilizando harina de amaranto (510 g de harina de amaranto/kg de dieta) en lugar de caseína en una dieta alta en grasa (30 % de las calorías totales aportadas por la grasa) con un agregado de 1 % de colesterol y un tiempo de alimentación de 80 días. Estos autores informaron una disminución de 37,6 % de lípidos totales y 43,6 % de colesterol en hígado, y de 51,6 % del colesterol total en plasma. La disminución de colesterol hepático es similar a la obtenida en este trabajo de tesis, aunque no así la observada en lípidos totales hepáticos y colesterol plasmático. Estas discrepancias podrían atribuirse a la diferencia cuantitativa del aporte de harina de amaranto a la dieta, única fuente proteica en el trabajo de Chaturvedi et al. (1993). Estos autores utilizaron 2,8 veces más harina de amaranto que la empleada para alimentar el grupo **HA30**, con el consecuente aumento de la fracción lipídica presente en la harina rica en ácidos poliinsaturados y escualeno (Shin et al., 2004).

Estudios realizados con otros sistemas animales y proteínas diferentes a las de amaranto también muestran resultados concordantes con los obtenidos en este trabajo de tesis con relación a la modificación del perfil lipídico en hígado y a la excreción de esteroides en heces, siendo variables las modificaciones detectadas en el perfil lipídico del plasma. Frota, Mendonça, Saldiva, Cruz & Arêas (2008) estudiaron el efecto del reemplazo de la caseína por harina o aislado proteico de caupí en una dieta alta en grasa (28 % de las calorías totales aportadas por la grasa) utilizando hámsteres como modelo animal. Los animales se alimentaron

durante 3 semanas con una dieta hipercolesterolémica (alta en grasa y con caseína como fuente proteica) y luego durante 4 semanas con las dietas en las cuales se reemplazó la caseína por proteína de harina o de aislado proteico de caupí. Estos autores observaron una disminución de 49 y 20 % del colesterol plasmático de los animales alimentados con harina o aislado de caupí respecto del grupo control. La misma tendencia se observó en los niveles de HDL aunque no así en los triacilglicéridos donde no se detectaron diferencias significativas. Con respecto a la excreción de esteroides, los animales que consumieron harina excretaron 251 y 49 % más de colesterol y ácidos biliares, mientras que los que consumieron aislado proteico solo excretaron mayor cantidad de colesterol, 31 %. Si bien estos autores no estudiaron el perfil de los lípidos hepáticos de los hámsteres, realizaron estudios histológicos mediante la tinción de hematoxilina-eosina. En los preparados histológicos de hígado observaron que los animales alimentados con la dieta control presentaron mayor cantidad de gotas lipídicas citosólicas que los alimentados con harina o aislado proteico de caupí. Este resultado nos brinda información sobre cuál es el efecto que tienen el aislado proteico y la harina de caupí sobre la esteatosis hepática. Estos autores vieron que tanto el aislado proteico como la harina de caupí disminuyeron la esteatosis respecto al grupo control, pero no observaron diferencias significativas entre el efecto del aislado y la harina. La harina y el aislado utilizados por los mencionados autores contenían 15,2 y 2,2 % de fibra dietética y 2,0 y 0,4 % de lípidos respectivamente. Posiblemente el aumento observado en la excreción de esteroides en los animales alimentados con la dieta donde se reemplazó la caseína por proteína de harina de caupí comparado con los alimentados con proteína de aislado se deba a estas diferencias en el contenido de fibra y lípidos. Mendonça et al. (2009) estudiaron el efecto del reemplazo total o parcial de la caseína por aislado proteico de amaranto en hámsteres como modelo animal. Los animales fueron alimentados durante 3 semanas con una dieta hipercolesterolémica, alta en caseína (52 % más que la

dieta control) con un agregado de 1% de colesterol, y luego, durante 4 semanas, con dietas modificadas. En una de ellas se reemplazó 10 % de la caseína por proteína de aislado proteico de amaranto y en la otra se utilizó solamente aislado proteico de amaranto como fuente proteica. A diferencia de nuestro ensayo, estos autores describieron que el reemplazo parcial o total de la caseína por aislado proteico de amaranto, provocó la disminución de los niveles de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos, el aumento de la excreción de colesterol y una disminución en la excreción de ácidos biliares vía heces. Estas diferencias respecto a los resultados obtenidos en nuestro ensayo podrían deberse a que estos autores no utilizaron una dieta alta en grasa. Takao et al. (2005) estudiaron el efecto que tiene el reemplazo parcial de la caseína por aislado proteico de quinoa sobre el metabolismo del colesterol. Utilizaron ratones como modelo animal, que fueron alimentados durante 4 semanas con una dieta control, y otras dos dietas en las que se reemplazó un 2,5 y 5 % de la caseína por aislado proteico de quinoa. Todas las dietas tenían agregado 0,5 % de colesterol. Estos autores observaron una disminución de alrededor de 75 % de colesterol plasmático y un aumento de 65 % de excreción de ácidos biliares vía heces, independientemente del reemplazo proteico. Además, encontraron disminuido el nivel de ARNm de la enzima HMG-CoA reductasa y aumentado el contenido de ARNm de la enzima encargada de la síntesis de ácidos biliares, colesterol-7- α -hidrolasa. A diferencia de nuestro ensayo, el aislado proteico utilizado tiene un alto contenido de lípidos (15,3 %) y es rico en ácidos grasos insaturados, por lo que no se puede descartar que esta fracción esté ejerciendo un efecto importante sobre el metabolismo del colesterol. Grajeta (1999) estudió el efecto de una dieta empleando semillas enteras de amaranto para alimentar ratas Buffalo durante 28 días. La dieta contenía aproximadamente 4 % de fibra dietética de amaranto, 15 % de grasa, proteína de amaranto reemplazando el 20 % de la caseína de la dieta control y 0,5 % de colesterol. Los resultados obtenidos mostraron la reducción del colesterol plasmático y hepático, 10,7 y

20 %, respectivamente, y la disminución de los triacilglicéridos en hígado, 10 %, respecto a ratas Buffalo alimentadas con una dieta control. Este autor atribuyó el efecto hipolipidémico a la fibra dietética presente en la semilla de amaranto y consideró que las proteínas, los tocotrienoles, los ácidos grasos insaturados y la vitamina E presentes en la fracción lipídica podrían influenciar el efecto hipocolesterolémico. Nuestros resultados obtenidos con el grupo **HA30** coinciden con los obtenidos por Grajeta (1999) solamente en la reducción de colesterol hepático respecto al grupo **Control**. Las diferencias encontradas entre ambos estudios podrían deberse a la menor proporción de fibra dietética utilizada en nuestros ensayos, como también al mayor contenido de colesterol de las dietas y/o a que los estudios se realizaron en un sistema animal diferente.

5.3.2 Animales alimentados por corto tiempo con dietas conteniendo proteínas de amaranto en alta proporción

El grupo de animales **AA7**, alimentado por un período corto con una alta proporción de proteínas de amaranto (caseína:AA 50:50), mostró un nivel de colesterol en plasma incrementado respecto al grupo **Control** (18 %, **Panel A, Figura 12**) y un contenido menor de fosfolípidos en hígado (27 %, **Tabla 13**). Los niveles de LDL, HDL y triacilglicéridos en plasma (**Tabla 13**) y de colesterol en hígado (**Panel B, Figura 12**) fueron equivalentes a los del grupo **Control**. No se detectaron diferencias en la excreción de colesterol y ácidos biliares por heces respecto al grupo **Control** (**Paneles C y D, Figura 12**).

La inclusión de harina de amaranto en esta dieta, grupo **HA7**, provocó efectos diferentes en los animales. Sus niveles de LDL, triacilglicéridos y colesterol en plasma fueron menores, en un 12, 14 y 38 % respectivamente, que los correspondientes al grupo **Control** (**Tabla 13, Panel A, Figura 12**) mientras que el contenido de colesterol en hígado disminuyó drásticamente, un 98 %, respecto al grupo **Control** (**Panel B, Figura 12**). Estos animales, además, excretaron un mayor contenido de colesterol y de ácidos biliares por heces que

los animales del grupo **Control**, aproximadamente 77 y 74 % más respectivamente (**Paneles C y D, Figura 12**).

Los animales que fueron alimentados con la dieta **HA7** por corto tiempo recibieron una mayor cantidad de fibra dietética de amaranto que aquellos alimentados con la dieta **AA7** (3,95 y 0,35 % de fibra de amaranto). Además, consumieron mayor cantidad de lípidos provenientes de amaranto por día 0,31 y 0,013 g, respectivamente. Al igual que en el ensayo anterior, los resultados obtenidos sugieren que la fibra dietética de amaranto posee una alta capacidad para interferir con la absorción del colesterol dietario y que las proteínas, luego de sufrir el proceso digestivo, poseen mucho menos efecto, pero pueden tener una acción más específica sobre el metabolismo lipídico.

Tabla 13 Parámetros lipídicos en hígado y plasma de los animales alimentados con el esquema de reemplazo proteico de corto plazo.

	Grupos de animales			
	Control	AA7	HA7	DB
HÍGADO				
Peso (g)	12,4±0,8	11,3±0,3 ^{ns}	11,1±0,9 ^{ns}	8,9±0,6 ^{**}
Fosfolípidos – FL (mg/100 mg de hígado)	1,93±0,09	1,42±0,02 ^{***}	1,73±0,12 ^{ns}	1,13±0,07 ^{****}
Triacilglicéridos – TAG (mg/100 mg de hígado)	1,1±0,1	1,05±0,06 ^{ns}	0,80±0,05 ^{ns}	1,08±0,07 ^{ns}
Lípidos totales – LT (mg/100 mg de hígado)	14±1	15,4±0,9 ^{ns}	12,2±0,9 ^{ns}	6,2±0,5 ^{****}
PLASMA				
Volumen de sangre (mL)	9,4±0,3	9,9±0,2 ^{ns}	6,7±0,3 ^{***}	7,7±0,8 ^{ns}
HDL (g/L)	0,34±0,01	0,33±0,01 ^{ns}	0,34±0,00 ^{ns}	0,39±0,01 ^{**}
LDL (g/L)	0,33±0,01	0,37±0,01 ^{ns}	0,3±0,01 ^{**}	0,33±0,01 ^{ns}
TAG (g/L)	1,38±0,03	1,31±0,03 ^{ns}	1,2±0,03 ^{***}	1,4±0,1 ^{ns}

HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad.

*(p<0,05), **(p<0,005), ***(p<0,0005), ****(p<0,0001) diferencia significativa comparada con el **Control**; ns: diferencia no significativa comparada con el **Control** (análisis de varianza, ANOVA, seguido del test de *Dunnnett*)

Si bien no se puede descartar algún efecto de componentes de la fracción lipídica su incidencia debería ser sumamente baja considerando la ingesta real de los animales por día.

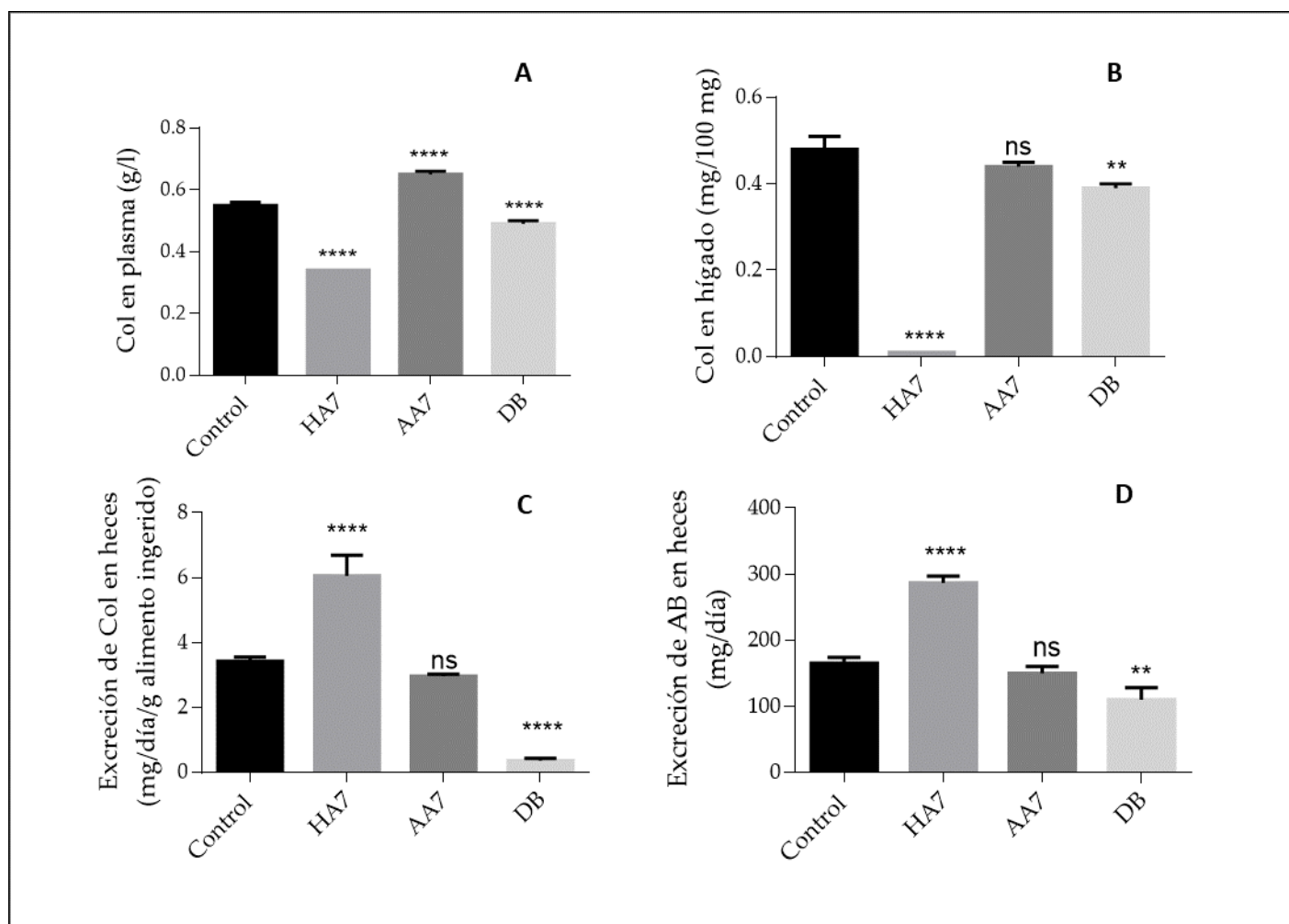


Figura 12 Cuantificación del colesterol y ácidos biliares en animales alimentados durante 7 días con dietas que contienen, como fuente de proteína, harina de amaranto (HA7) o aislado de amaranto (AA7), reemplazando el 50% de la caseína de la dieta base. Col en plasma (Panel A), en hígado (Panel B), en heces (Panel C) y, AB en heces (Panel D). *($p < 0,05$), **($p < 0,005$), ***($p < 0,0005$), ****($p < 0,0001$) diferencia significativa comparada con el **Control**; ns: diferencia no significativa comparada con el **Control** (análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de *Dunnett*).

No se han encontrado en bibliografía estudios en los que se haya analizado el efecto hipocolesterolémico de la ingestión de proteínas de pseudocereales por períodos cortos, adicionadas a dietas altas en grasa. Wang, Shimada, Kato,

Kusada & Nagaoka (2015) emplearon una dieta hipercolesterolémica, 5 % de grasa, 0,5 % de colesterol, 10 % de caseína, aproximadamente 9 % de proteína de salvado de arroz como fuente proteica y 0,6 % de fibra, en ratas Wistar por el término de 10 días. En este ensayo detectaron 45 % menos de colesterol en plasma respecto a animales alimentados solo con caseína y un incremento en la excreción en heces de esteroides neutros y ácidos biliares del orden de 2 y 1,4 veces más que el control, respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo para el grupo **HA7** mostraron la misma tendencia que describen estos autores, aunque en nuestros ensayos los animales recibieron un menor tenor de proteínas y mayor contenido de fibra dietética proveniente de amaranto que la utilizada por Wang et al. (2015). Más aún, los resultados se encuentran reforzados en nuestro estudio por una disminución en los niveles plasmáticos de LDL y triacilglicéridos y de colesterol en hígado (**Tabla 13, Panel B, Figura 12**).

Hasta aquí todos los datos obtenidos en este trabajo de tesis indican que los componentes de las semillas de amaranto y en particular la fibra dietética y las proteínas afectan el metabolismo del colesterol en ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasa y colesterol. Es importante destacar que existe un efecto diferencial en cuanto a los resultados obtenidos para los ensayos en los que se realizó un gran reemplazo proteico durante un período corto respecto a aquellos en los que la proteína se reemplazó en menor porcentaje durante un período más prolongado. Sería de gran importancia poder realizar nuevos ensayos utilizando los esquemas de alimentación con algunas modificaciones: prolongar el tiempo de alimentación para el caso de los grupos de animales en los que se realizó un mayor reemplazo proteico y realizar las mismas determinaciones en plasma e hígado en la primera semana de alimentación en el grupo de animales que fue alimentado durante un periodo prolongado con un menor reemplazo proteico. Estos datos nos darían información sobre el estado en el que se encuentran los animales, si ya han llegado a un estado

estacionario o se encuentran en un estado en donde el metabolismo aún se encuentra respondiendo a los cambios de la alimentación.



6. RESULTADOS
Y DISCUSIÓN
PARTE II



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN, Parte II

6.2 Ensayos *in vitro*

En función de los resultados presentados en el capítulo anterior, donde se comprobó que tanto el aislado proteico como la harina de amaranto tienen efecto sobre el metabolismo del colesterol, nos propusimos elucidar cuál o cuáles serían los mecanismos probables que promueven la excreción de colesterol vía heces.

El intestino desempeña un papel fundamental en la vehiculización y absorción del colesterol dietario, como así también en la recirculación de los ácidos biliares, metabolitos del colesterol, a través de la vía enterohepática. Esto crea una ventana de acción para que los péptidos y la fibra presentes en la dieta puedan actuar sobre el metabolismo del colesterol. Existen evidencias de que estos péptidos actuarían inhibiendo la solubilidad micelar del colesterol e interaccionando con los ácidos biliares a través de interacciones iónicas e hidrofóbicas (Boachie et al., 2018; Howard & Udenigwe, 2013; Udenigwe & Rouvinen-Watt, 2015; Yao, Agyei & Udenigwe, 2018). La capacidad de ejercer estas actividades dependería de la estructura y composición de los péptidos; por ejemplo el péptido IIAEK proveniente de un hidrolizado de β -lactoglobulina disminuye la solubilidad micelar del colesterol debido a que cuenta con un extremo N-terminal hidrófobo (IIA) y un C-terminal hidrofílico (EK) otorgándole una estructura anfipática. Esto da la posibilidad al péptido de interaccionar con los fosfolípidos necesarios para la formación de las micelas (Nagaoka et al., 2001). El péptido VAWWMY derivado de la glicinina de soja tiene la capacidad de captar ácidos biliares debido a los aminoácidos hidrofóbicos Trp y Tyr que componen su estructura, lo cual también afecta a la solubilidad micelar del colesterol (Choi, Adachi & Utsumi, 2002). Estos mecanismos también han sido demostrados en péptidos provenientes de

sericina de seda, una proteína no dietaria (Lapphanichayakool, Sutherawattananonda & Limpeanchob, 2017), y en proteínas de salvado de arroz (Wang et al., 2015). Asimismo, se ha estudiado el efecto que tiene la fibra dietética sobre el metabolismo del colesterol. La presencia de fibra podría aumentar la viscosidad dentro del intestino, lo cual disminuiría la absorción del colesterol (Lairon, 1997). Otra vía de acción de la fibra involucra su fermentación por la flora intestinal con la producción de ácidos grasos de cadena corta, en particular el propionato, que actuaría inhibiendo a la enzima hepática HMG-CoA reductasa (Bugaut & Bentéjac, 1993; Garcia-Diez et al., 1996; Ötles & Ozgoz, 2014; Marlett, 1997).

En este trabajo de tesis decidimos estudiar el efecto que tienen la proteína y la fibra dietética presentes en las semillas de amaranto sobre la solubilidad micelar del colesterol y la interacción entre las proteínas y los ácidos biliares. Debido a que el efecto que ejercen los componentes anteriormente mencionados se produce a nivel del intestino, decidimos someter a las muestras de harina y aislado proteico de amaranto a un proceso simulado de digestión gastrointestinal. Para eso, ambas muestras fueron tratadas utilizando una metodología que se formuló en base a los protocolos descritos por Gawlik-Dziki et al. (2009), Minekus et al. (2014) y Versantvoort et al. (2005). De esta forma obtuvimos la harina (HAD) y el aislado proteico de amaranto (AAD) digeridos.

6.2.1 Determinación de la composición centesimal y caracterización de los digeridos

Previamente a realizar los ensayos *in vitro*, caracterizamos los digeridos HAD y AAD. Para esto obtuvimos ambas muestras (**sección 3.2.3**) y determinamos su composición centesimal (**sección 3.3.1**). Asimismo, se determinó el grado de hidrólisis alcanzado en cada caso (**sección 3.3.2**). Los datos obtenidos se presentan en la **Tabla 14**.

Tabla 14 Composición centesimal y grado de hidrólisis de HAD y AAD.

Composición % b.h.	HAD	AAD
Proteína	12,8±0,9	58,0±0,8
Glúcidos	59,1±0,3	11,3±0,4
Humedad	8,51±0,01	9,60±0,02
Cenizas	16,7±0,4	18,3±0,5
Lípidos £	2,9	2,8
%GH	48±1	44±1

b.h base húmeda. Todos los valores se expresan como la media ± el desvío estándar, gramos de componente cada 100 gramos de muestra, £ el contenido de lípidos se determinó por diferencia.
%GH: grado de hidrólisis.

Los valores de grado de hidrólisis alcanzados para la harina y el aislado proteico de amaranto fueron 48 y 44 %, respectivamente (**Tabla 14**). Estos valores indican que la masa molecular promedio de los péptidos obtenidos es de 270 y 295 Da para la harina y el aislado proteico de amaranto, respectivamente (Benítez, Ibarz & Pagan, 2008) por lo cual, podemos decir que al ser ingeridas las proteínas presentes en la harina o en el aislado proteico de amaranto sufrirían una hidrólisis extensiva. Los grados de hidrólisis reportados en este trabajo de tesis, son comparables a los que obtuvieron Sabbione et al. (2016) y Nardo (2017), 51 y 44 % respectivamente.

Las proteínas del aislado de amaranto han sido previamente estudiadas en nuestro grupo de trabajo mediante cromatografía de exclusión molecular, lo que ha permitido conocer sus masas moleculares (Martínez & Añón, 1996; Scilingo, Molina Ortiz, Martínez & Añón, 2002). Sin embargo, no existen datos previos sobre la harina de amaranto. La **Figura 13** muestra los cromatogramas correspondientes a la separación de las proteínas de la harina y del aislado (HA y AA) utilizando la columna de exclusión molecular Superose 6, cuyo rango óptimo de separación varía entre 5000 y 5000000 Da para proteínas globulares. En la **Figura 13** se observan los cromatogramas obtenidos para el aislado (**línea azul**) y para la harina de amaranto (**línea gris**). El cromatograma del aislado

proteico de amaranto presenta varios picos entre los que se destacan los picos I y II. El pico I, cuyo peso molecular promedio es de 300 kDa, corresponde a unidades hexaméricas de la globulina-P y globulina 11S y a trímeros de globulina 7S de peso molecular promedio 200 kDa. Además, se observa un hombro a la izquierda del pico que corresponde a dímeros de globulina 11S. El pico II corresponde a especies proteicas de menor peso molecular, 9 a 12 kDa, correspondientes principalmente a albúminas y polipéptidos que pertenecen a globulinas y glutelinas de amaranto. Al inicio del perfil cromatográfico se observa un pequeño pico que corresponde a agregados solubles de globulina-P de alto peso molecular. El perfil cromatográfico obtenido para el aislado proteico de amaranto (**línea azul, Figura 13**) es similar al descrito por Martínez & Añón (1996) y por Scilingo et al. (2002). El cromatograma correspondiente a la harina de amaranto presenta dos picos, III y V (**línea gris, Figura 13**), equivalentes a los descritos en el aislado, picos I y II, y un tercer pico cuyo peso molecular promedio es de 63 kDa, al que contribuirían polipéptidos de la globulina 7S y de glutelinas. Los perfiles cromatográficos del aislado y de la harina difieren debido a que durante la preparación del aislado la muestra se enriquece en la fracción globulinas. Si bien no hay datos cromatográficos de harina de amaranto descritos en bibliografía los pesos moleculares de las especies proteicas antes indicados son coincidentes con los detallados en el trabajo de Janssen et al. (2017).

En la **Figura 14** se presentan los cromatogramas obtenidos para el aislado (**línea azul**) y la harina (**línea gris**) de amaranto y sus respectivos digeridos (HAD **línea amarilla** y AAD **línea naranja**) al emplear la columna Superdex peptide 10/300 GL, diseñada para separar péptidos de baja masa molecular como los que se producen durante la digestión gastrointestinal.

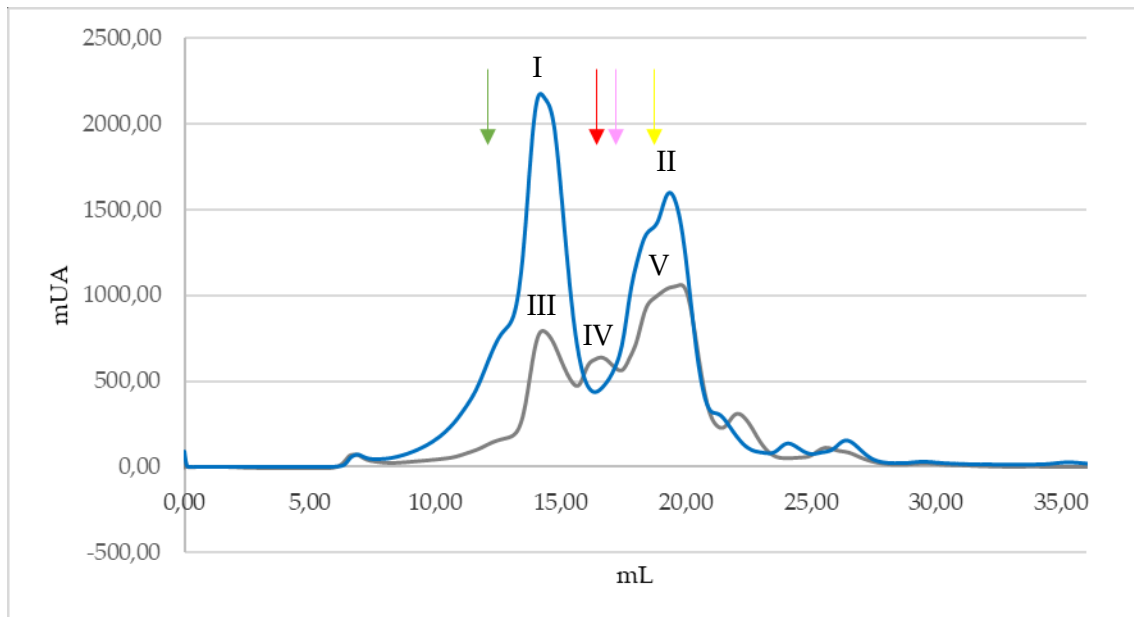


Figura 13 Cromatograma obtenido para harina de amaranto (HA, gris) y aislado proteico de amaranto (AA, azul). Las flechas indican el volumen en el que eluyen los patrones de masa molecular: tiroglobulina (669 kDa, verde), albúmina (67 kDa, rojo), ovoalbúmina (43 kDa, rosa) y ribonucleasa (13,7 kDa, amarillo). Picos: I y III 300 kDa, IV 63 kDa y II y V 19 a 12 kDa.

Su rango de separación por tamaño comprende especies cuyas masas moleculares varían entre 100 y 7000 Da. Los cromatogramas fueron divididos en 3 zonas de interés, roja donde se encuentran moléculas de masas mayores a 6500 Da, verde de masas intermedias y negra de masas moleculares del orden de las de los aminoácidos. Dado que las principales proteínas presentes tanto en HA como en AA están compuestas por moléculas de alto peso molecular, la mayoría de ellas eluyen en la zona roja, cerca del volumen muerto de la columna que se indica con una línea negra vertical en la **Figura 14**.

Estas especies representan el 68 y el 63 % del área total mientras que las especies de masas moleculares menores, zonas verde y negra, representan el 31 y el 36 % para HA y AA, respectivamente. Vemos que luego de someter a un proceso de digestión gastrointestinal simulada a las muestras HA y AA, el porcentaje de especies de alto peso molecular (zona roja) disminuye unas 10 veces, mientras que las especies de peso molecular inferiores a 6500 Da (zona verde) presentes en HAD y AAD aumentan de un 21 a 69 % y de un 26 a 77 %.

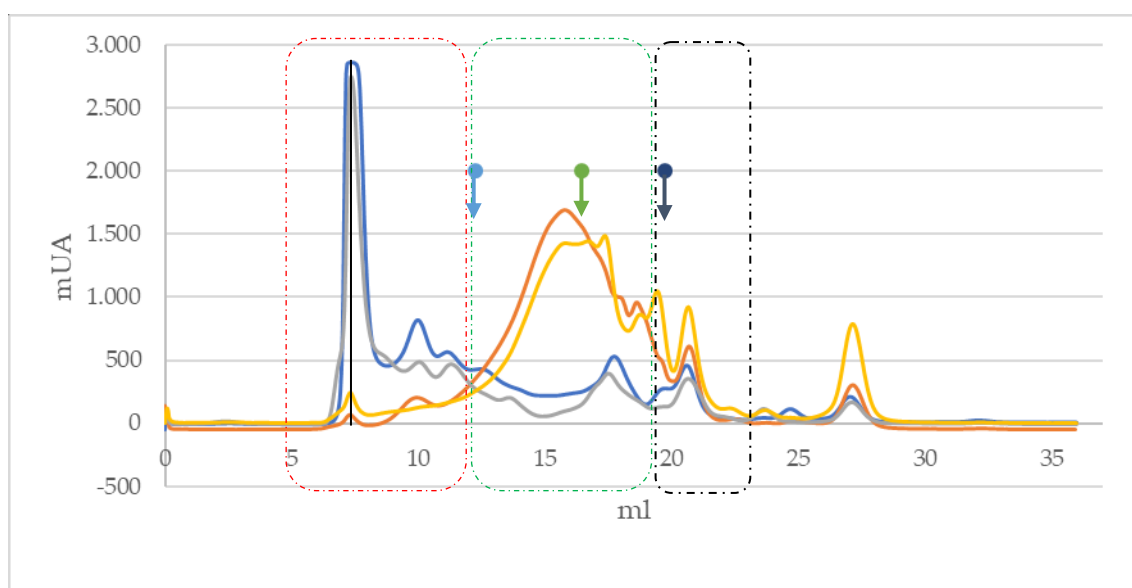


Figura 14 Cromatogramas obtenidos para harina de amaranto (HA, gris), harina de amaranto digerida (HAD, amarillo), aislado proteico de amaranto (AA, azul) y aislado proteico de amaranto digerido (AAD, naranja). Las flechas indican el volumen en el que eluyen los patrones de masa molecular: aprotinina (6500 Da, celeste), vitamina B12 (1855 Da, verde) y ácido hipúrico (179,14 Da, azul); la línea negra indica el volumen muerto de la columna 7,5 mL. Zonas de interés delimitadas por rectángulos rojo 5 a 12 mL, verde 12 a 18 mL y negro 18 a 22 mL.

Estos polipéptidos formados por un número de aminoácidos que varía entre 5 y 35 se originan durante el proceso de digestión gastrointestinal simulada. También se observa que la cantidad de aminoácidos libres (zona negra, masa molecular promedio de 166 Da) aumenta de 10 a 22 % y de 10 a 15 % para la harina y el aislado de amaranto respectivamente.

Las muestras de HA, AA y sus respectivos digeridos fueron también caracterizadas mediante electroforesis Tricina-SDS-PAGE. Esta electroforesis permite separar péptidos de masas moleculares pequeñas para lo cual se emplea un gel compuesto por 3 zonas con diferente tamaño de poro, gel apilador, espaciador y separador preparados con 4, 10 y 16 % de acrilamida-bisacrilamida, respectivamente.

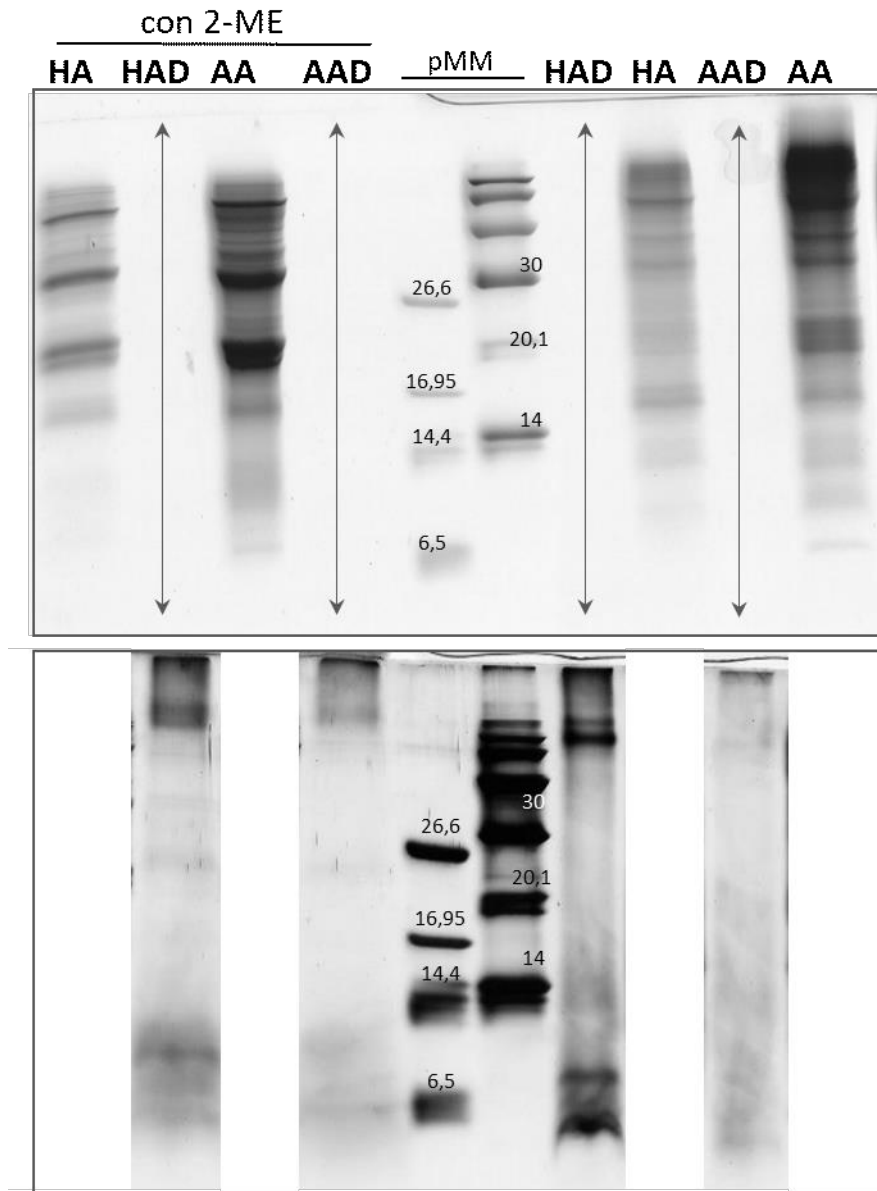


Figura 15 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de aislado (AA), harina (HA), aislado digerido (AAD) y harina digerida (HAD) de amaranto en condiciones reductoras (2-mercaptoetanol) y no reductoras. En las calles centrales se observan las proteínas patrón de muy bajo y bajo peso molecular, pMM. Panel superior tinción con Coomassie Brilliant Blue e inferior tinción con plata.

En el **Panel superior** de la **Figura 15** se presenta el gel teñido con Coomassie Brilliant Blue que revela los perfiles polipeptídicos de AA y HA, mientras que no se visualizan bandas en las calles correspondientes a las muestras digeridas, AAD y HAD. Las especies proteicas presentes, ya descritas en la **Figura 10**, pueden observarse tanto en AA como en HA (**Figura 15**) siendo su distribución en el gel diferente debido a la formulación del mismo.

Con el objeto de visualizar las especies proteicas presentes en las muestras digeridas, el gel fue nuevamente teñido utilizando la tinción de plata que detecta cantidades pequeñas de péptidos/proteínas. Esa imagen se presenta en el Panel inferior de la **Figura 15**. Puede observarse la desaparición de las especies proteicas de masas moleculares superiores a 14 kDa, a excepción de algunos agregados de gran peso molecular que no ingresan en el gel separador. Además, se detecta la aparición de especies de masa molecular menor a 14 kDa que es resultado del proceso de digestión gastrointestinal simulada como ya se ha mencionado al describir los perfiles cromatográficos de la **Figura 14**.

Luego de estudiar las proteínas presentes en las muestras decidimos analizar los componentes de naturaleza glucídica, en particular de la fibra dietética. Teniendo en cuenta que para determinar el contenido de fibra dietética se realiza un proceso similar a una digestión gastrointestinal, decidimos evaluar si existen diferencias al cuantificar la fibra de una muestra que fue sometida a un proceso de digestión gastrointestinal simulada respecto de la misma muestra sin ser sometida a este proceso. Para esto determinamos el contenido de fibra total en harina de amaranto y en harina de amaranto digerida. El contenido de fibra dietética presente en la harina de amaranto digerida fue $9,8 \pm 0,2$ % p/p; este valor no es significativamente distinto al obtenido para la harina de amaranto, $10,8 \pm 0,49$ % p/p (*t-test* $p < 0,05$), lo cual es esperable dado que la fibra constituye la fracción no digerible en los alimentos y, por lo tanto, no debería modificarse por el proceso de digestión gastrointestinal que se empleó.

Como ya hemos mencionado anteriormente Lamothe et al. (2015) estudiaron la composición de la fibra dietética soluble e insoluble presente en las semillas de amaranto. Estos autores reportaron que la fracción insoluble se encuentra compuesta por un 59 % de polisacáridos pécticos (homogalacturonanos y ramnogalacturonanos) que contienen restos de ramnosa donde se anclan cadenas laterales de arabinanos y galactanos; 38 % de xiloglucanos ramificados con di o trisacáridos y bajos porcentajes de celulosa y almidón. Respecto a la

fracción soluble reportaron que contiene entre 60 y 70 % de xiloglucanos ramificados con di o trisacáridos, 34 % de polisacáridos pécticos compuestos por homogalacturonanos y arabinanos y restos de celulosa y almidón.

Los xiloglucanos, un tipo de hemicelulosa, están formados por más de un tipo de monómero. En el caso de la fibra de amaranto están compuestos por un esqueleto de glucosa con algunos residuos de xilosa, galactosa y fucosa (Lamothe et al., 2015).

Con el fin de caracterizar la fracción de fibra de las distintas muestras (**sección 3.3.5.2**) las mismas fueron analizadas mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Para ello, la fibra insoluble y soluble fue obtenida por centrifugación y no por filtración para evitar el uso de Celite como material poroso filtrante ya que absorbe en el IR en la misma zona que la fibra.

Tal como se indicó en la **sección 3.3.5.2** se obtuvieron los espectros de absorción en el IR de las distintas muestras, mediante el equipo Thermo Nicolet iS10 spectrometer en modo transmisión, entre 4000 y 500 cm^{-1} .

Los carbohidratos dan espectros infrarrojos con varias líneas de absorción. En este tipo de moléculas el predominio de los enlaces C-C y C-O y las propiedades mecánicas similares de estos enlaces dan lugar a amplias bandas de absorción infrarroja no resueltas. La especificidad de los carbohidratos surge de la geometría de los numerosos grupos O-H y de la configuración de los enlaces C-O, C-C y C-H en el esqueleto carbonado de base (Naumann, 2000).

Los espectros IR de estas biomoléculas pueden dividirse en tres regiones espectrales específicas: 3500–2700 cm^{-1} , 1800–900 cm^{-1} y 900–600 cm^{-1} . La primera región presenta un primer pico ancho a 3275 cm^{-1} asignado al estiramiento O-H; a 2900 y 2800 cm^{-1} se observan dos picos que se corresponden con el estiramiento asimétrico de CH_2 y el estiramiento simétrico de CH_3 , respectivamente. La segunda región (1800-900 cm^{-1}) presenta una secuencia de picos intensos atribuidos a los modos de deformación fuertemente acoplados de los enlaces C-C, C-O, C-O-H y C-O-C de varios oligosacáridos y

polisacáridos. En esta zona, la señal más intensa es un pico ancho que se observa aproximadamente a 1080 cm^{-1} causado por las vibraciones ν (CC) y ν (CO) y otros dos picos de absorción, uno de los cuales se encuentra alrededor de 1160 cm^{-1} y corresponde al estiramiento de las uniones C–O–C, y el otro en la zona de 1040 cm^{-1} asignado a estiramientos de los enlaces C–C y C–O de las estructuras en anillo presentes en los polisacáridos. La tercera región (900 y 600 cm^{-1}) presenta picos débiles que surgen de vibraciones de hidrógenos y del estiramiento de la unión C–C y C–O pertenecientes a estructuras en anillo (Tabla 15, Figura 16), (Bilba & Ouensanga, 1996; Grube, Bekers, Upite & Kaminska, 2002).

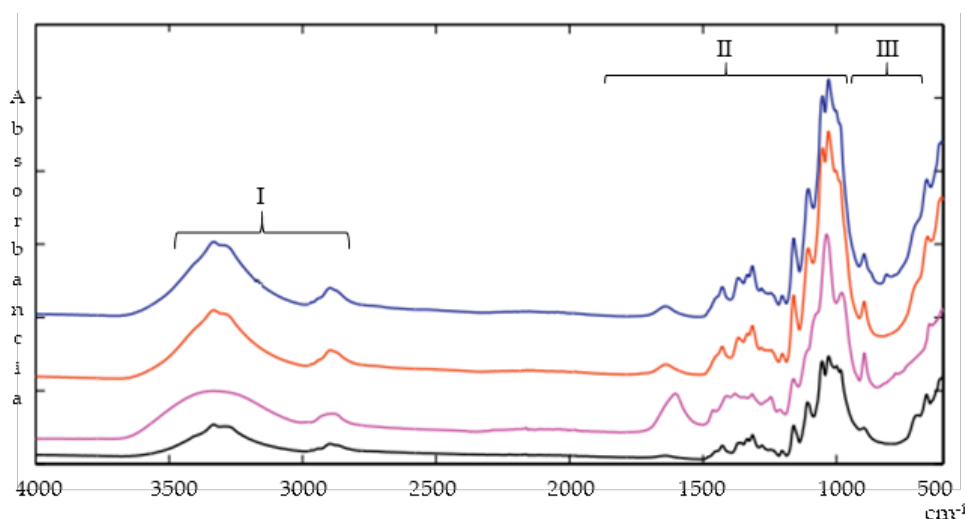


Figura 16 Espectros modelo de absorción infrarroja ente 500 y 4000 cm^{-1} de xilano (lila), celulosa (negro) y pastas de celulosa blanqueada (rojo y azul). Zonas: I 3500 - 2700 cm^{-1} estiramiento O–H, C–H₂ y C–H₃, II 1800 - 900 cm^{-1} deformación C–C, C–O, C–O–H, C–O–C y C=O, III 900 - 600 cm^{-1} estiramiento C–O, C–H y C–C del anillo (Chen, Hu, Jang & Grant, 2015 con modificaciones).

Tabla 15 Señales características de los polisacáridos en los espectros de absorción infrarroja.

Número de onda cm^{-1}	Asignación de la señal	Compuesto/Grupo funcional	Referencias
3275	Estiramiento OH	Polisacárido	1,4,6
2900	Estiramiento asimétrico C-H ₂	Polisacárido	1,2,4,6
2800	Estiramiento simétrico C-H ₃	Polisacárido	4,6
1745	Estiramiento y vibración C=O de alquil ésteres	Pectina	2,3,4
1460	Estiramiento C-O-C anillo de piranosa	Polisacárido	6
1410	Estiramiento simétrico COO ⁻ anillo de piranosa	Carboxilato (grupo éster pectina)	4,5
1370	Deformación C-H ₂	Xiloglucano	3,5
1317	Vibración anillo, deformación simétrica C-H ₂	Pectina, Celulosa	4,5
1235	Estiramiento C-O	Pectina	1,5,6
1160	Estiramiento asimétrico C-O-C	Celulosa (enlace glicosídico)	4,5
1138	Estiramiento asimétrico C-O-C	Xiloglucano (enlace glicosídico)	4,5
1041	Estiramiento C-O y C-C	Anillo, Xiloglucano	3,5,6
944	Vibración anillo	Xiloglucano	5
860	Vibración anillo	Pectina	4,5

(¹Bilba & Ouensanga, 1996; ²Chatjigakis et al., 1998; ³Fellah et al., 2009; ⁴Synytysya, Čopíková, Matějka & Machovič, 2003, .; ⁵Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013; ⁶Yang, Yan, Chen, Lee & Zheng, 2007).

En el **Panel superior, Figura 17**, se muestran los espectros obtenidos para la fibra insoluble de HA y HAD. Se pueden distinguir las señales correspondientes a pectinas, 1745 y 1235 cm^{-1} , a xiloglucanos a 1370, 1317, 1041 y

944 cm^{-1} y a celulosa, 1317 y 1160 cm^{-1} (Chatjigakis et al., 1998; Fellah et al., 2009; Synytsya et al., 2003; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013) (Tabla 15). No se observan diferencias en los espectros obtenidos para la fibra de HA y HAD dado que la digestión no afecta a esta fracción.

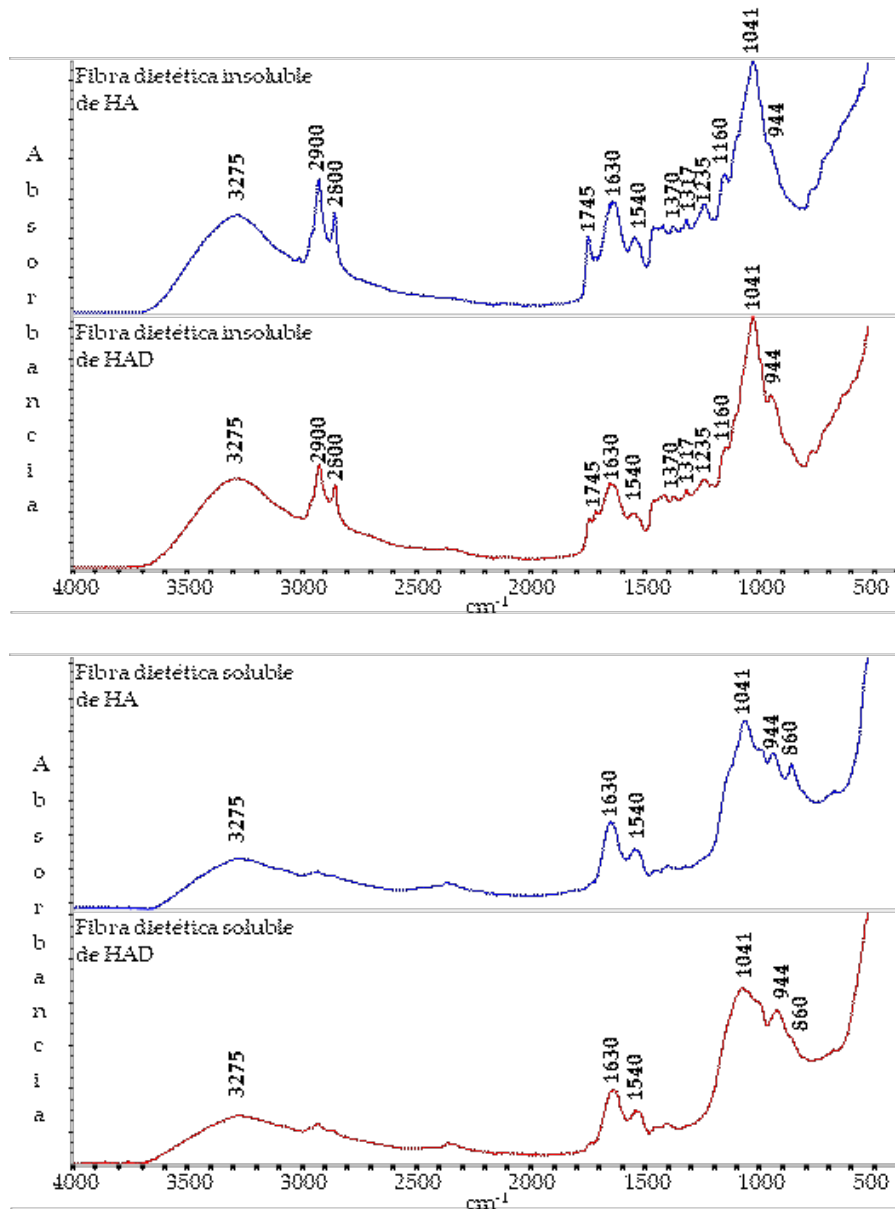


Figura 17 Espectros de absorción infrarroja obtenidos entre 4000 y 500 cm^{-1} . Panel superior fibra insoluble de harina de amaranto (HA) azul, de harina de amaranto digerida (HAD) rojo. Panel inferior fibra soluble de harina de amaranto (HA) azul, de harina de amaranto digerida (HAD) rojo. En negrita se indican los números de onda asignados a los picos identificados.

En el Panel inferior de la misma figura se muestran los espectros correspondientes a la fibra soluble de HA y HAD. En estos espectros sólo se identifican claramente las señales correspondientes a xiloglucanos a 1041 y 944 cm^{-1} y a pectina a 860 cm^{-1} (Fellah et al., 2009; Synytsya et al., 2003; Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013; Yang et al., 2007; **Tabla 15**).

La digestión gastrointestinal no modifica tampoco la fracción de fibra soluble ya que los espectros de ambas muestras son iguales. Tanto la fracción de fibra soluble como insoluble de la harina de amaranto contiene proteínas, los espectros de todas las muestras analizadas presentan las señales correspondientes a amida I y II a 1630 y 1540 cm^{-1} .

Estos resultados concuerdan con la composición descrita por Lamothe et al. (2015) quienes indicaron que pectinas y xiloglucanos son los componentes mayoritarios de la fibra de amaranto predominando las pectinas en la fracción insoluble y los xiloglucanos en la fracción soluble.

La **Figura 18** muestra los espectros FTIR correspondientes a las fracciones de fibra insoluble y soluble de AA y AAD. Al igual que en el caso de la harina de amaranto estos espectros presentan algunas de las señales características de xiloglucanos y pectinas, además de proteínas. El análisis de datos realizado no permite corroborar la mayor proporción de pectinas respecto a xiloglucanos detectada por Lamothe et al. (2015) en la fracción de fibra insoluble del grano de amaranto.

A fin de verificar si el almidón se encuentra presente en la fibra de amaranto, se aisló este componente como se mencionó en la **sección 3.3.5.2** y se analizó mediante FTIR.

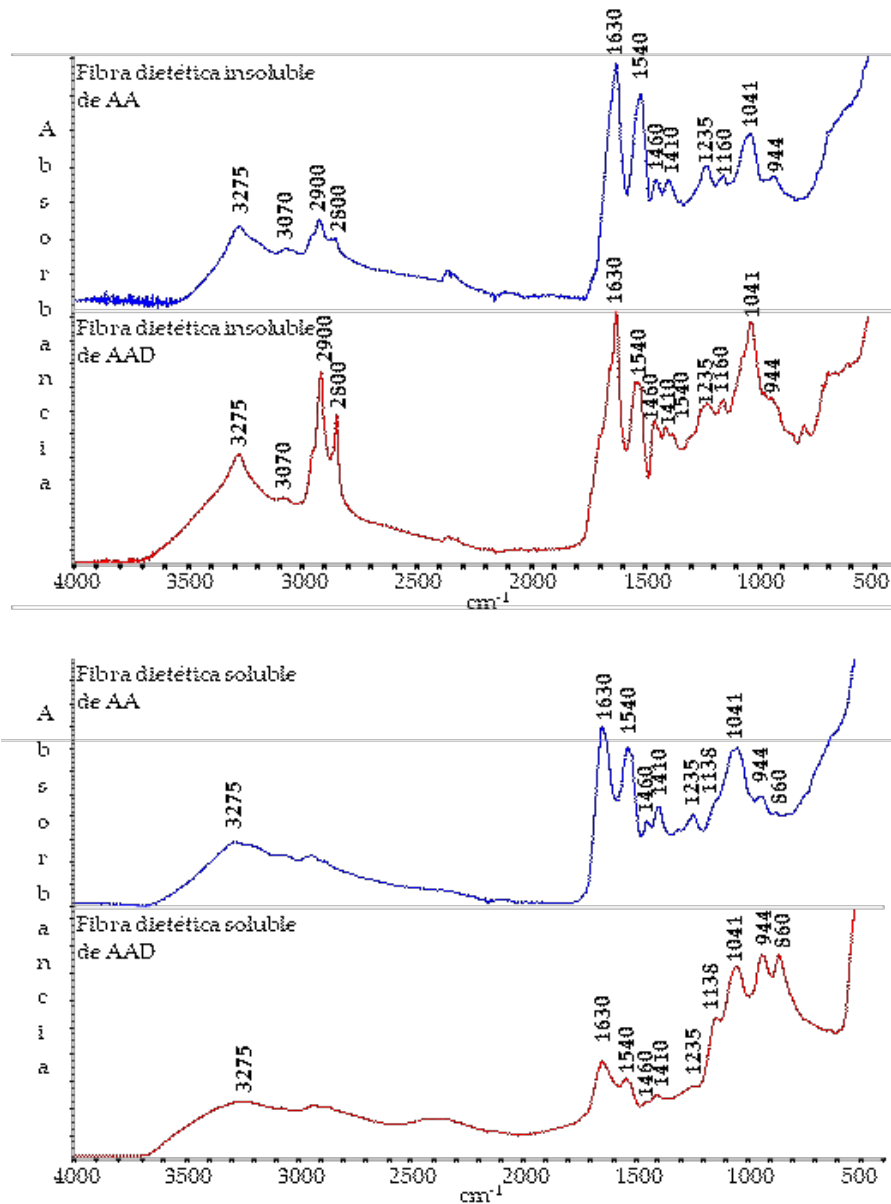


Figura 18 Espectros de absorción infrarroja obtenidos entre 4000 y 500 cm^{-1} . Panel superior fibra insoluble de aislado de amaranto (AA) azul, de aislado de amaranto digerido (AAD) rojo. Panel inferior fibra soluble de aislado de amaranto (AA) azul, de aislado de amaranto digerido (AAD) rojo. En negrita se indican los números de onda asignados a los picos identificados.

El espectro obtenido (**Figura 19**) presenta las señales características de almidones de cereales, maíz y trigo, en los cuales el pico más intenso se encuentra a 1000 cm^{-1} acompañado de otros dos a 1153 y 1082 cm^{-1} . Si bien no puede descartarse la presencia de almidón resistente en la fibra de amaranto su cantidad sería despreciable dado que estas señales no se encuentran presentes en los espectros de las **Figuras 17 y 18**.

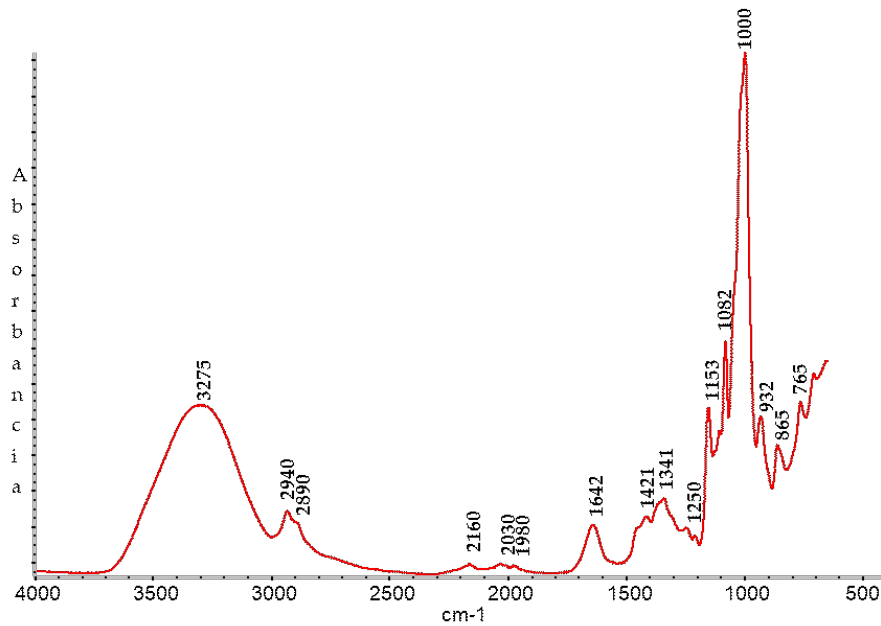


Figura 19 Espectro de absorción infrarroja de almidón de amaranto entre 4000 y 500 cm^{-1} .

6.2.2 Ensayos de inhibición de la solubilidad micelar del colesterol

La incorporación de colesterol dietario en micelas es un paso crítico en su absorción a través de los enterocitos (Hui & Howles, 2005). Hemos comprobado que la excreción de colesterol en heces en animales que consumieron amaranto, particularmente luego de un período relativamente largo de ingesta, aumenta significativamente (**Panel C, Figura 11**). Para explicar el mecanismo por el cual la ingesta de amaranto produce ese efecto, consideramos importante realizar ensayos *in vitro* que permitan estimar la acción potencial de los componentes de amaranto sobre las micelas y la incorporación o exclusión del colesterol en éstas.

Las micelas se prepararon por sonicación de mezclas de colesterol, fosfatidilcolina, taurocolato de sodio y ácido oleico, en ausencia o en presencia de las muestras de amaranto que ensayamos en este trabajo de tesis, AA, HA, AAD y HAD. Para confirmar la formación de las micelas se empleó un espectrómetro de correlación de fotones que permite medir tamaño de partículas entre 0,6 nm y 6 μm . El equipo permite obtener el índice de

polidispersidad (IPD) de las poblaciones analizadas. Si una población es monodispersa el IPD es menor o igual 0,1, si es moderadamente polidispersa variará entre 0,1 y 0,4, y si es altamente polidispersa, será mayor a 0,4.

La **Figura 20** muestra las distribuciones de tamaño de las micelas modelo formadas inmediatamente después de obtenerlas (**línea verde, Figura 20**) y después de 1, 2 y 3 horas de haberlas obtenido (**líneas azul, roja y violeta, Figura 20**). Las micelas recién preparadas presentaron una distribución no normal del tamaño de partículas con un IPD de 0,4, indicando que la población es moderadamente polidispersa.

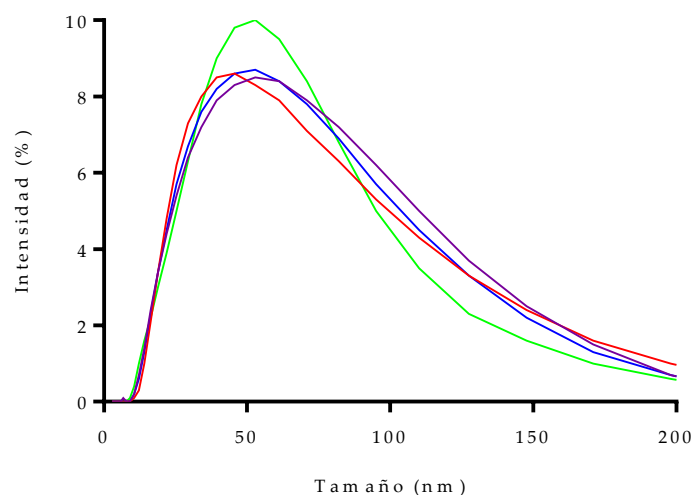


Figura 20 Distribución del tamaño de partícula obtenido para las micelas modelos a 37 °C durante el tiempo de ensayo (3 horas), verde recién preparadas, azul: 1 hora, rojo: 2 horas, violeta 3 horas.

El tamaño correspondiente a la máxima intensidad de la distribución fue $53 \pm 0,01$ nm (**línea verde, Figura 20**). Los resultados muestran que durante los distintos tiempos 0, 1, 2 y 3 horas, se observan leves corrimientos del máximo de la distribución de tamaño y un incremento de las poblaciones de mayor tamaño, superior a 100 nm (**líneas verde, roja, azul y violeta, Figura 20**).

Cuando las micelas se formaron en presencia de AA (**línea roja, Figura 21**), se detectó un desplazamiento de la distribución de tamaño de partículas hacia diámetros mayores que la hallada para las micelas formuladas sin amaranto ($p < 0,05$). El valor del máximo de la distribución fue $71,0 \pm 0,03$ nm, con un IPD de 0,4. En presencia de HA se detectó una distribución de tamaño con al menos 3 poblaciones de partículas entre 40 y 60, 300 y 500 y 700 y 1400 nm, respectivamente (**línea azul, Figura 21**). El IPD obtenido para esta muestra fue 0,6, lo cual indica que esta población es altamente polidispersa. El primer pico (**línea azul, Figura 21**), de baja intensidad, presentó el máximo a $46 \pm 0,02$ nm. Las poblaciones más abundantes fueron las de tamaños superiores a 150 nm.

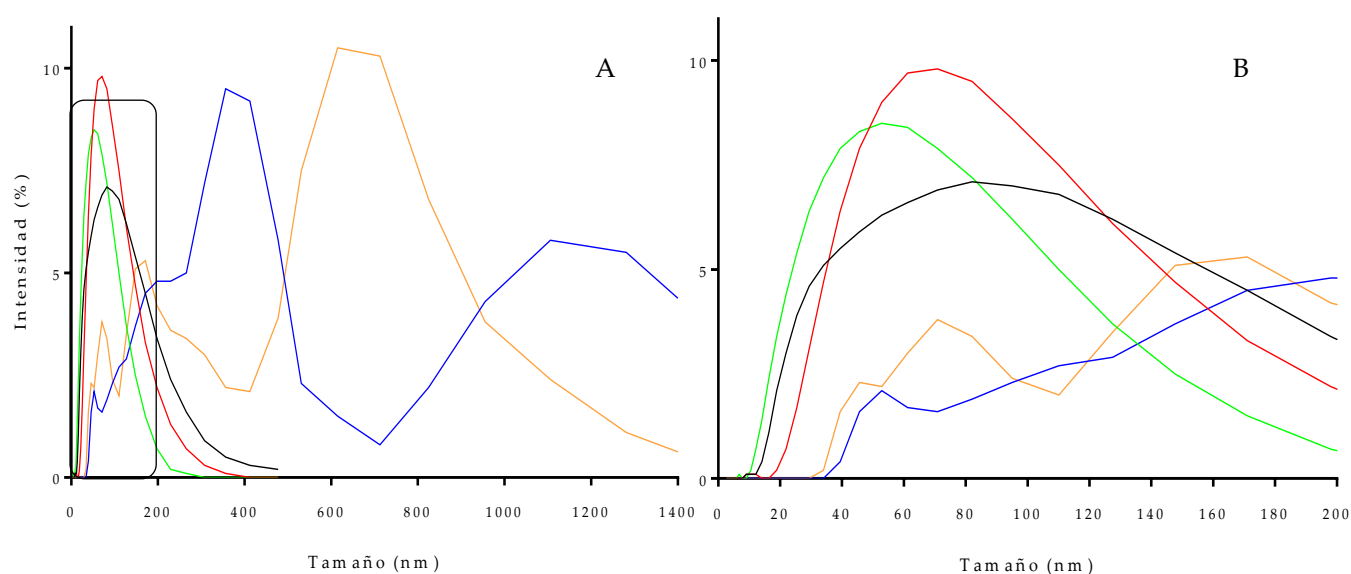


Figura 21 Tamaño de las micelas (en nm) preparadas en ausencia de amaranto (verde), con AA (rojo), con HA (azul), con AAD (negro) o con HAD (naranja). Cada determinación se realizó al menos por triplicado. Panel A rango de tamaños completo, panel B ampliación de la zona indicada con el rectángulo negro.

Los resultados obtenidos para las micelas formadas en presencia de AAD y HAD muestran en ambos casos un mayor tamaño micelar con respecto a las micelas obtenidas en presencia de las respectivas muestras sin digerir, situándose los máximos de tamaño de partícula de cada distribución a $82,0 \pm$

0,01 y $71,0 \pm 0,02$ nm, presentando un IPD de 0,4 y 0,6 respectivamente (**líneas negra y naranja, Panel B, Figura 21**). La presencia de fibra en la muestra HAD indujo la formación de más de una población de partículas de tamaño mayor a 100 nm, tal como se observó en el caso de la harina de amaranto (**líneas naranja y azul, Panel A, Figura 21**).

Estos resultados sugieren que las muestras ensayadas contienen componentes capaces de interactuar con alguna/s de las sustancias que participan de la formación de la micela, colesterol, ácidos biliares y/o fosfolípidos. En el caso de proteínas, éstas podrían actuar como agentes desestabilizantes de la micela o desplazar a alguno de los componentes que la forman. En cualquier caso esto conduce a una modificación del tamaño micelar.

El mayor tamaño que presentan las micelas preparadas con harina de amaranto podría ser atribuido al aumento de la viscosidad de la fase acuosa producto de la presencia de fibra. Lairon (1997) informó un incremento en el tamaño de las micelas asociado a un aumento notorio de la viscosidad de la fase acuosa al estudiar el efecto de la presencia de fibras de diferente origen sobre las características de emulsiones similares a las existentes a nivel duodenal *in vivo*. Si bien la dispersión de harina de amaranto presentó una viscosidad menor que las señaladas por Lairon (1997) como efectivas, no es posible descartar totalmente un efecto de este parámetro sobre el tamaño de las micelas.

Otra posibilidad que permitiría explicar el incremento de tamaño micelar en presencia de fibra sería que ésta actúe como puente entre micelas pequeñas formando agregados de diferente tamaño, quizá por interacción con los ácidos biliares.

En el proceso de digestión gastrointestinal simulada las proteínas se hidrolizan disminuyendo su tamaño molecular, mientras quedan intactas las fibras presentes. La modificación del tamaño de las proteínas producto de la hidrólisis afecta su capacidad de interacción de las mismas con los componentes de la micela aún en presencia de fibra (**Figura 21**). La función fisiológica de las

micelas es transportar triglicéridos, colesterol y otros lípidos insolubles en agua para poder ser absorbidos por el epitelio intestinal. Las micelas se forman *in vitro* o espontáneamente *in vivo* cuando las concentraciones de sales biliares y fosfolípidos son superiores a la concentración micelar crítica. Por otra parte, poseen una capacidad de transporte limitada. Dado que hemos observado en los experimentos realizados *in vivo* una mayor excreción de colesterol y ácidos biliares en las heces de los animales alimentados con harina y aislado de amaranto durante un tiempo relativamente prolongado (**Panel C y D, Figura 11**) decidimos determinar el efecto que la presencia de las muestras ensayadas tiene sobre la capacidad de transporte de las micelas. Para ello, determinamos el porcentaje de desplazamiento de colesterol de la micela en función de la concentración de proteínas de AA, HA, AAD y HAD como se describió en la **sección 3.5.1**.

La **Figura 22** muestra que el porcentaje de desplazamiento del colesterol de las micelas modelo se incrementa al aumentar la concentración de proteínas. Esta dependencia no es lineal, pero es dosis dependiente, lo que permite calcular la concentración en la que se alcanza el 50 % de la actividad, denominada IC₅₀ mediante el programa GraphPad Prism 6. El IC₅₀ para las micelas preparadas con aislado proteico de amaranto (AA) fue $0,2 \pm 0,1$ mg/mL de proteína mientras que el correspondiente a su digerido, AAD, fue $2,1 \pm 0,03$ mg/mL, es decir, un orden de magnitud más grande. Este resultado indicaría que cuando se reduce el tamaño de las proteínas debido a la proteólisis que se produce durante la digestión gastrointestinal simulada, se requiere mayor cantidad de proteínas para evitar la inclusión del colesterol en la micela.

Si observamos la cantidad de colesterol que permanece separado de las micelas a una concentración constante de proteína en las muestras, por ejemplo 1 mg/mL, el porcentaje de desplazamiento encontrado cuando ensayamos el aislado proteico de amaranto fue 50,7 %, mientras sólo 6,6 % fue desplazado al utilizar aislado proteico de amaranto digerido. A fin de verificar que el tamaño

de las proteínas de amaranto es determinante en el desplazamiento del colesterol de micelas modelo, se analizaron micelas obtenidas con un hidrolizado proteico de amaranto preparado por acción de alcalasa, proteasa de origen microbiano poco específica que ha sido previamente empleada en nuestro laboratorio.

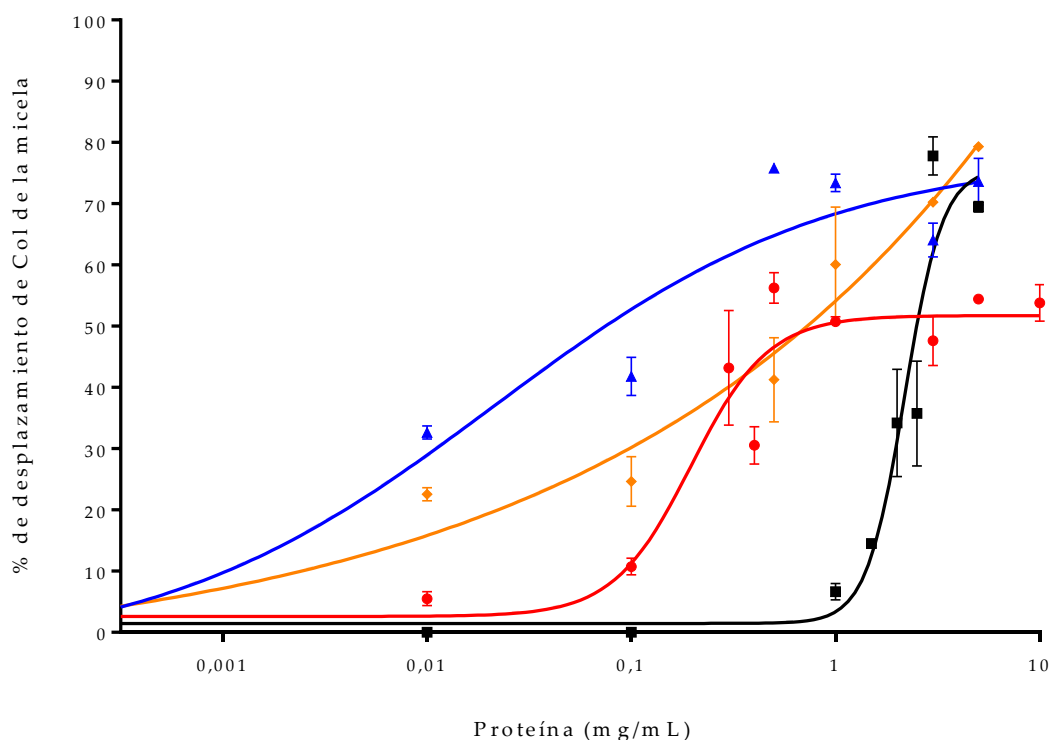


Figura 22 Curvas dosis respuesta para el efecto del agregado de proteína en el desplazamiento del colesterol de las micelas, con AA (rojo), con HA (azul), con AAD (negro) o con HAD (naranja). Cada determinación se realizó al menos por triplicado.

Este hidrolizado presentó un grado de hidrólisis menor, $19,95 \pm 1,28$ %, que el que posee el digerido por lo cual las especies proteicas presentes tendrán un mayor tamaño molecular que las de AAD. El desplazamiento de colesterol logrado al formar las micelas en presencia del hidrolizado con alcalasa fue de $49,7 \pm 3,6$ % para la misma concentración de proteínas, 1 mg/mL. Este valor es similar al obtenido con AA y superior al obtenido con AAD, sugiriendo que la capacidad que tienen las proteínas de amaranto de desplazar colesterol de

micelas modelo depende fuertemente del grado de hidrólisis alcanzado, es decir de su tamaño. Sin embargo, si la concentración de proteínas de amaranto es mayor, por ejemplo, cercana a 3 mg/mL, el aislado proteico de amaranto digerido logra desplazar un 80 % del colesterol inicial presente en la mezcla, valor significativamente superior al correspondiente al desplazado por igual cantidad de aislado proteico de amaranto. Si bien el tamaño de los péptidos presentes es menor, si éstos se encuentran en cantidad suficiente, resultan efectivos para evitar la incorporación de colesterol a las micelas.

En la literatura se encuentran descritos diferentes estudios que han demostrado que los péptidos de naturaleza hidrofóbica presentan mayor actividad hipocolesterolemica, debido a que compiten de manera más efectiva con el colesterol por su sitio en la micela (Howard & Udenigwe, 2013; Ruiz et al., 2014; Yust, Millán-Linares, Alcaide-Hidalgo, Millán & Pedroche, 2012; Zhang, Yokoyama & Zhang, 2012). Basado en esta premisa el aislado de amaranto y su hidrolizado con alcalasa fueron fraccionados mediante cromatografía hidrofóbica en una columna de fenilsefarosa. Con esta separación se obtuvieron dos fracciones de diferente hidrofobicidad. Se determinó la capacidad de estas fracciones de desplazar colesterol de las micelas utilizando 1 mg/mL de proteína. Los resultados obtenidos indicaron que las fracciones más hidrofóbicas del aislado y del hidrolizado con alcalasa fueron más eficientes ya que desplazaron el $47,9 \pm 0,6$ y el $55,6 \pm 0,7$ % del colesterol de las micelas, respectivamente. Las fracciones más hidrofílicas solo lograron desplazar el $32,4 \pm 0,4$ y el $37,3 \pm 1,6$ %, respectivamente. Estos resultados muestran la existencia de un compromiso entre tamaño molecular, hidrofobicidad y concentración de los péptidos/proteína, en la magnitud del desplazamiento de colesterol de las micelas modelo. Vemos que a concentraciones bajas una mayor hidrofobicidad de las muestras se correlaciona con una mayor capacidad de inhibir la inclusión del colesterol en las micelas modelo, y que un mayor grado de hidrólisis tiene el efecto opuesto, lo que nos lleva a pensar que posiblemente se necesiten

polipéptidos que tengan un tamaño molecular lo suficientemente grande como para generar entornos hidrofóbicos estables, pero con un grado de hidrólisis suficiente para que estos entornos estén disponibles para interactuar con los componentes de las micelas. Sin embargo, a concentraciones más altas, por ejemplo 3 mg/mL, cuando hay una mayor cantidad de péptidos pequeños, resultan también eficaces para evitar la incorporación del colesterol a las micelas.

Matsuoka et al. (2014) estudiaron el efecto que tienen las proteínas de clara de huevo luego de ser digeridas sobre la solubilidad micelar del colesterol. Estos autores encontraron un efecto dosis respuesta, e informaron 60 % de inhibición utilizando una concentración de proteína hidrolizada de 10 mg/mL. Megías et al. (2009) analizaron el efecto que tienen las proteínas de girasol hidrolizadas (1 mg/mL) sobre la inclusión de colesterol en micelas; emplearon dos hidrolizados con diferentes grados de hidrólisis, 66,6 y 37 %, y hallaron 40 y 85 % de desplazamiento de colesterol de las micelas, respectivamente. Este resultado concuerda con los obtenidos en este trabajo de tesis ya que se observa que las proteínas más hidrolizadas presentan menor capacidad de desplazar colesterol de las micelas. Marques et al. (2015) estudiaron el efecto que ejercen fracciones de péptidos de caupí sobre la solubilidad micelar del colesterol. Los péptidos se obtuvieron luego de fraccionar proteínas aisladas y digeridas provenientes de porotos crudos o cocidos mediante ultrafiltración a través de una membrana de 3 kDa de corte. El proceso de digestión gastrointestinal fue más efectivo sobre las proteínas térmicamente tratadas (grado de hidrólisis 53,2 %) que sobre las nativas (grado de hidrólisis 23,3 %), indicando que las enzimas digestivas acceden a un mayor número de sitios de corte en las proteínas desnaturalizadas, liberando péptidos diferentes. La inhibición de la incorporación de colesterol en las micelas fue 5,2 y 39,8 % cuando utilizaron respectivamente, péptidos provenientes de proteínas nativas o tratadas térmicamente, a la misma concentración, 1 mg/mL. Estos resultados indican

que, aunque la fuente proteica sea la misma, la magnitud del efecto sobre la inclusión del colesterol en micelas depende del tipo de péptidos liberados; el tratamiento térmico posibilita la liberación de péptidos con mayor carácter hidrofóbico que los que se obtienen de las proteínas nativas, en las que se encontrarían menos accesibles a las enzimas digestivas. Nuestros resultados han mostrado también que los péptidos con mayor hidrofobicidad poseen mayor capacidad de desplazar colesterol de las micelas. Nuestros resultados, junto a los recientemente descritos y a los informados por Nagaoka et al. (2002), demuestran que las proteínas alimentarias son capaces de reducir el ingreso y, posiblemente, también de promover la salida de colesterol de las micelas, a la vez que permiten afirmar que el tamaño y la composición de los péptidos inciden en su bioactividad.

En la **Figura 22** se muestran también los resultados encontrados al determinar el porcentaje de desplazamiento de colesterol de las micelas modelo preparadas con harina de amaranto HA y con harina digerida, HAD (**líneas azul y naranja, Figura 22**). La forma de las curvas obtenidas al aumentar la cantidad de muestra, expresada como contenido de proteínas, resultó diferente a las halladas con el aislado proteico y con el aislado digerido (**líneas roja y negra, Figura 22**). Sin embargo, también se observa un comportamiento dosis dependiente. Los valores de IC_{50} fueron $0,1 \pm 0,3$ mg/mL y $0,71 \pm 0,07$ mg/mL respectivamente para la harina y harina de amaranto digerida, reflejando la misma tendencia descrita para el efecto ejercido por el aislado y el aislado digerido. Si comparamos el efecto de las muestras que contienen 1 mg/mL de proteínas observamos que se desplaza 73,4 % o 60,0 % de colesterol de las micelas preparadas con harina o harina de amaranto digerida. La fibra dietética se caracteriza por unirse a muchos componentes de la dieta disminuyendo su absorción. Entre ellos, al colesterol y a los ácidos biliares (Vahouny, Tombes, Cassidy, Kritchevsky & Gallo, 1980), ambos constituyentes de las micelas modelo. Tanto la harina como la harina de amaranto digerida mostraron mayor

actividad que las muestras de aislados conteniendo la misma cantidad de proteínas. La fibra dietética presente en la harina de amaranto y que resiste al proceso de digestión gastrointestinal sería responsable de este aumento en la actividad. No hemos hallado otros estudios en bibliografía sobre la acción de fibras en ensayos de solubilidad micelar que nos permitan contrastar nuestros resultados.

6.2.3 Análisis de las interacciones entre ácidos biliares y proteínas en tiempo real por resonancia plasmónica de superficie (SPR)

La técnica de SPR, *surface plasmon resonance*, permite registrar en tiempo real los procesos de interacción que se dan entre dos grupos de moléculas, el analito y el ligando. Mientras el ligando se encuentra fijo sobre la superficie del biosensor el analito fluye en solución sobre la mencionada superficie.

Esta técnica se empleó a fin de estudiar la interacción entre las proteínas de amaranto, fijadas sobre un chip CM5 y los ácidos biliares o el colesterol a los que se las enfrentó. Los ensayos fueron realizados en la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), en el Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, IDEHU (CONICET, UBA) con la colaboración de la Dra. Marisa Fernández.

La primera muestra con la que se trabajó fue el aislado proteico de amaranto AA. Para preparar la muestra y unirla al chip se utilizó el protocolo descrito en la **sección 3.5.2**. En todos los ensayos en los que se inmovilizó esta muestra a la superficie del chip CM5 se obtuvo una señal que varió entre 1100 y 1500 RU, indicando que una cantidad aceptable de muestra se ha unido covalentemente.

Una vez inmovilizada la proteína a la superficie se estudió la interacción con colesterol y con ácidos biliares. La concentración de colesterol alcanzada en el buffer empleado en estos ensayos fue insuficiente para que se detectara interacción con las muestras unidas al sensor. Los ácidos biliares, se hicieron fluir de a uno por vez sobre la superficie del chip utilizando concentraciones

crecientes, entre 0 y 2000 μM . El análisis de los sensogramas, RU en función del tiempo, obtenidos evidenció que la interacción específica entre las proteínas y los ácidos biliares no se estableció en todos los ensayos. Debido a que la reproducibilidad no fue lo suficientemente buena no pudieron determinarse ninguna de las constantes que caracterizan la interacción analito-ligando. Luego se inmovilizaron las proteínas y péptidos presentes en AAD, procediendo de la misma forma que la descrita para el aislado. La señal registrada que indicó la unión de las proteínas del AAD al chip fue más débil, entre 300 y 600 RU. En este caso cuando se hicieron fluir los tres ácidos biliares en las mismas concentraciones que las utilizadas para enfrentar al aislado, no fue posible observar la existencia de interacción específica entre el analito y el ligando. Es posible que la cantidad de proteínas y/o péptidos que logran unirse al chip resulte insuficiente para visualizar el fenómeno de interacción.

Tiengo et al. (2011) describieron que las proteínas de amaranto en solución tienen la capacidad de unir ácidos biliares. Nuestros estudios no permitieron poner en evidencia esta interacción cuando AA y AAD fueron utilizados como ligandos, probablemente debido a la gran heterogeneidad que naturalmente poseen estas muestras. Cada vez que se inmovilizan las proteínas o los péptidos sobre la superficie del chip, pueden unirse por cualquier grupo amino que esté disponible, exponiendo sitios diferentes al analito. Además, al estar fijos por un extremo existe la posibilidad de que se establezcan interacciones entre péptidos o proteínas vecinas en lugar de establecerse con el analito que se encuentra fluyendo. La diferencia entre los resultados informados por Tiengo et al. (2011) y los obtenidos en este trabajo de tesis podría ser consecuencia de que en un caso las proteínas se encuentran en un medio líquido, en solución, sin restricciones de movimiento, mientras que en el ensayo de resonancia plasmónica están fijadas sobre una matriz. Además la metodología empleada en ambos estudios es muy distinta.

Para trabajar con una muestra más homogénea se decidió inmovilizar fracciones de péptidos provenientes del AAD que tuvieran características similares entre sí. Ya que la hidrofobicidad es una propiedad relevante, tanto para la unión al chip como para establecer interacciones con los ácidos biliares o con el colesterol, se empleó una columna Sunfireprep C8, en un equipo HPLC-RP según lo descrito en la **sección 3.3.4.2**.

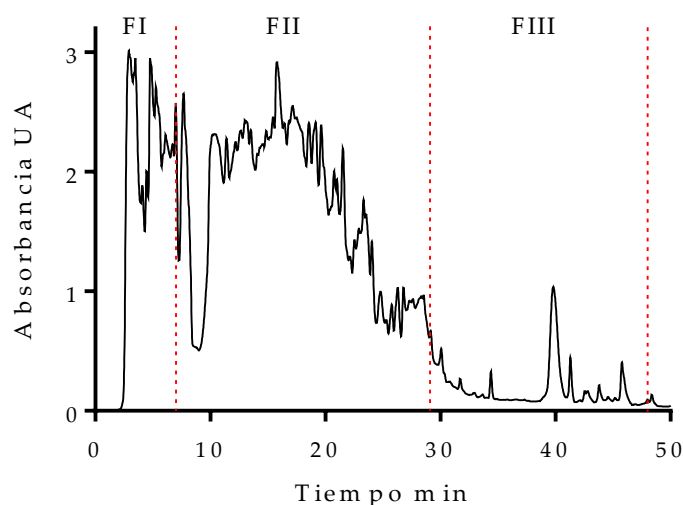


Figura 23 Cromatograma obtenido para el digerido de amaranto línea negra. Las líneas rojas punteadas indican los tiempos entre los que se colectó cada fracción: fracción I (FI): 0 a 7 minutos, fracción II (FII): 7 a 29 minutos y fracción III (FIII): 29 a 48 minutos.

El fraccionamiento se realizó empleando un gradiente agua/acetonitrilo (**Tabla 5**) como fase móvil, que permite que los componentes más hidrofílicos de la muestra eluyan a menor tiempo de retención, mientras que los más hidrofóbicos eluirán a mayor concentración de acetonitrilo. Se recogieron tres fracciones con diferente hidrofobicidad, FI, FII y FIII indicadas con líneas rojas punteadas verticales en la **Figura 23**. La fracción más hidrofílica, FI, corresponde a las sustancias eluidas entre 0 y 7 minutos, la de hidrofobicidad intermedia, FII, a las que eluyeron entre 7 y 29 minutos, y la más hidrofóbica, FIII, a las que eluyeron al final de la cromatografía, entre 29 y 48 minutos.

Se analizaron los perfiles polipéptídicos de las fracciones mediante electroforesis Tricina-SDS-PAGE (**Figura 24**), y se compararon con los de AA y de AAD, en ausencia y en presencia de 2-mercaptoetanol. El AAD fue sembrado en dos calles vecinas, colocando en cada una de ellas una cantidad diferente de muestra. En los perfiles electroforéticos en condiciones no reductoras no se observan bandas para ninguna de las fracciones, mientras que en presencia de 2-mercaptoetanol se detectan bandas muy tenues en las calles correspondientes a FII y FIII (**Paneles A y B, tinción con Coomassie Brilliant Blue, Figura 24**). Para visualizar mejor estos perfiles, los mismos geles fueron teñidos con plata. En estas condiciones (**Paneles A' y B', Figura 24**) tampoco se observan bandas en las calles correspondientes a FI, lo que sugiere la ausencia de proteínas en esta fracción. FII está mayoritariamente constituida por especies monoméricas de tamaño menor a 14 kDa, ya que no se observan cambios en el perfil electroforético en presencia de 2-mercaptoetanol (**Paneles A' y B', FII, Figura 24**). En la calle en la que se sembró FIII se observan especies de tamaños moleculares de 26,6 a 43 kDa y de 14 kDa en condiciones no reductoras (**Panel A'**). En presencia de 2-mercaptoetanol aparecen algunas bandas nuevas y se intensifican las ya descritas (**Panel B'**). Al cuantificar proteínas empleando el método de micro Kjeldahl se confirmó que la fracción FI no contiene nitrógeno, ya que el valor de proteínas determinado fue $0,1 \pm 0,0$ % p/p. El contenido de proteínas de FII y FIII fue $54,9 \pm 0,7$ y $14,7 \pm 1,8$ % p/p, respectivamente. Estos resultados junto a la ausencia de bandas en los perfiles electroforéticos de la fracción FI, sugieren que la absorción de luz en el UV detectada en el cromatograma de la **Figura 23** no corresponde a compuestos nitrogenados.

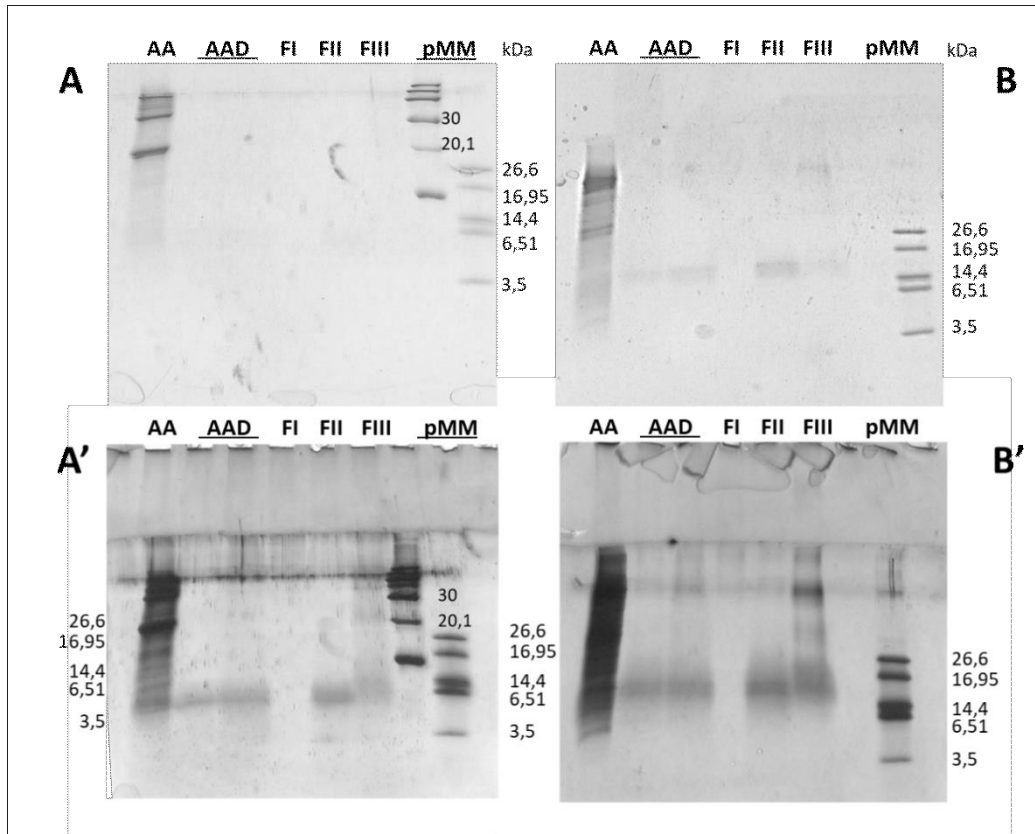


Figura 24 Electroforesis Tricina-SDS-PAGE de aislado (AA), aislado digerido (AAD), fracción I (FI), fracción II (FII) y fracción III (FIII) en condiciones no reductoras (Panel A) y reductoras (2-mercaptoetanol, Panel B). En las últimas calles se observan los patrones de bajo y muy bajo peso molecular (pMM). Paneles A y B, tinción con Coomassie Brilliant Blue. Paneles A' y B' tinción con plata.

El hecho de detectar unas pocas bandas de muy baja intensidad en los perfiles electroforéticos de las fracciones FII y FIII, mientras que el contenido de nitrógeno determinado fue relativamente alto, indicaría que estas fracciones contienen un porcentaje importante de aminoácidos o péptidos de muy baja masa molecular que no se observan en los geles, pero contribuyen al valor detectado por micro Kjeldahl.

Las fracciones FII y FIII descritas anteriormente se utilizaron para realizar un ensayo de afinidad con los tres ácidos biliares mediante resonancia plasmónica de superficie. No fue posible inmovilizar la fracción FIII en las condiciones empleadas por lo que se describirán solamente los resultados alcanzados con la fracción FII.

Para optimizar la inmovilización de FII sobre la superficie del chip CM5 se ensayaron los pHs 4, 4,5, 5 y 5,5; en todos los casos se observó una excelente respuesta en unidades RU, entre 500 y 1600 (**Figura 25**). La inmovilización se realizó a pH 5,5.

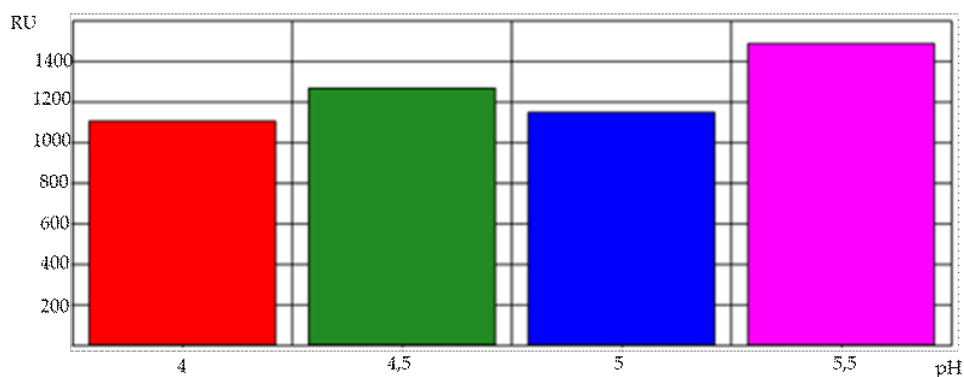


Figura 25 Respuesta obtenida en RU en función del pH de la solución a fin de seleccionar la condición para la inmovilización de la fracción FII en el chip CM5 (*pH scouting*). pH 4 rojo; 4,5 verde; 5 azul y 5,5 magenta.

El valor promedio de RU obtenido en la inmovilización de FII, 380 RU, es óptimo para hacer determinaciones cinéticas o estudios de afinidad. La interacción de FII con los tres ácidos biliares permitió realizar estudios de afinidad, aunque no fue posible hacer un análisis cinético ya que los períodos de asociación y disociación del sistema son breves y los cambios en la señal son muy abruptos. Los sensogramas obtenidos para la interacción de FII con taurocolato de sodio (**Panel A, Figura 26**) presentan asociaciones y disociaciones abruptas. El sistema, debido a estas características, alcanza rápidamente el estado de saturación, por lo que solamente se pudieron realizar medidas en estado estacionario. A partir de estas determinaciones, se calcularon las constantes de disociación del sistema, K_D , medida inversa a la afinidad. Para ello se empleó un ajuste no lineal realizado a partir de los valores de RU de los sensogramas en el estado estacionario para cada concentración de analito

utilizada. No todos los ácidos biliares empleados permitieron obtener este valor certero a 25 °C, por lo cual, las K_D se determinaron a 25 °C y/o a 37 °C.

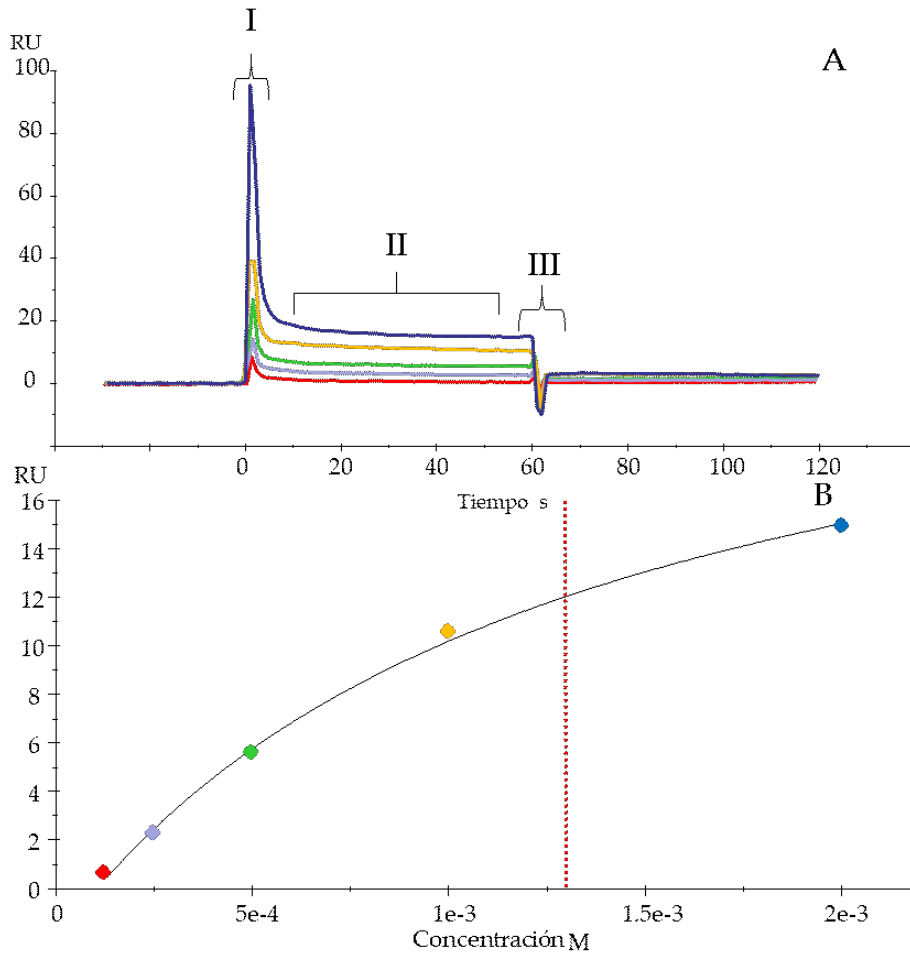


Figura 26 Panel A Sensogramas obtenidos para la interacción entre la fracción FII y el taurocolato de sodio a 37 °C. Zonas: I asociación, II estado estacionario y III disociación del taurocolato a las siguientes concentraciones: línea roja 125 μM, celeste 250 μM, verde 500 μM, amarilla 1000 μM y azul 2000 μM. Panel B Respuestas en RU para las interacciones FII - taurocolato de sodio en la zona de equilibrio. La línea negra representa el ajuste no lineal realizado y la línea punteada roja la K_D calculada para el sistema a 37 °C.

Cada una de las curvas del **Panel A, Figura 26**, corresponde a una concentración diferente de taurocolato de sodio, que varió entre 125 y 2000 μM. El tiempo de contacto utilizado en estos ensayos entre el ligando, FII unida al chip, y el analito, el ácido biliar, fue 60 segundos a 37 °C, empleando un flujo de 30 μL/min.

En el **Panel B** de la **Figura 26** se presenta el ajuste no lineal mediante el cual se obtuvo la constante de disociación K_D en estado estacionario a 37 °C. El valor obtenido fue $(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ M. El mismo ensayo fue realizado a 25 °C y la K_D en esas condiciones fue igual a $(8 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$ M.

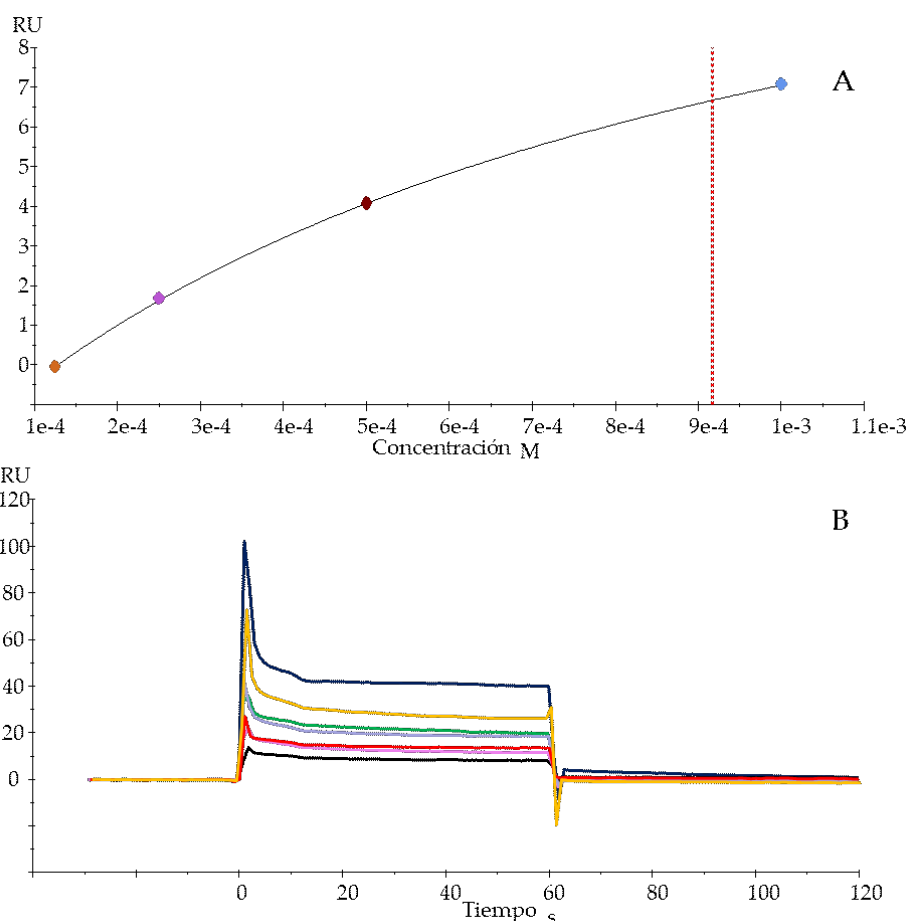


Figura 27 Panel A Respuestas en RU para las interacciones entre la fracción FII y colato de sodio en la zona de equilibrio: naranja 125 µM, violeta 250 µM, bordó 500 µM y celeste 1000 µM. La línea negra representa el ajuste no lineal realizado y la línea punteada roja la K_D calculada para el sistema a 25 °C. Panel B Sensogramas obtenidos para la interacción entre la fracción FII y el deoxicolato de sodio a las siguientes concentraciones: negro 0 µM, lila 62,5 µM, rojo 125 µM, lila 250 µM, verde 500 µM, amarillo 1000 µM y azul 2000 µM, a 37 °C.

De la misma forma descrita se estudió la interacción entre los péptidos de la fracción FII y otros dos ácidos biliares, colato de sodio y deoxicolato de sodio. La dupla FII-colato de sodio arrojó resultados similares a los obtenidos con taurocolato de sodio obteniéndose un valor de K_D cercano a los anteriores ($9,1 \pm$

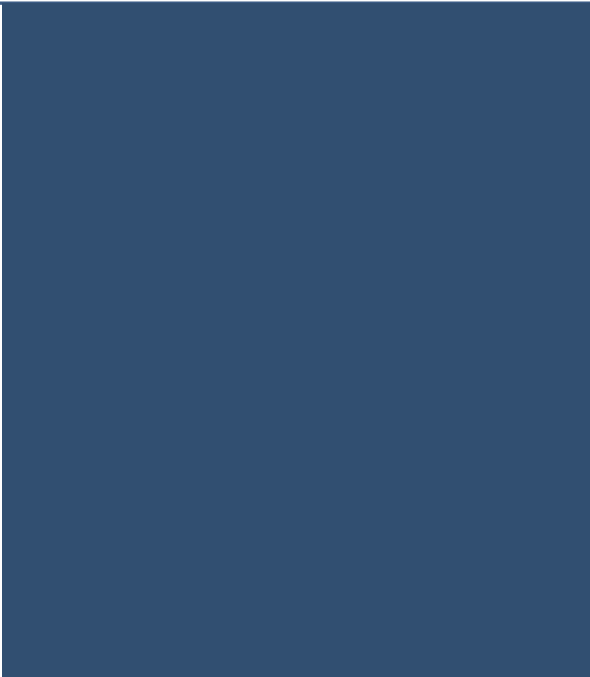
0,7) 10^{-4} M a 25 °C (**Panel A, Figura 27**). Cuando se estudió la interacción que se establece entre FII y el deoxicolato de sodio, sólo pudo ser detectada a 37 °C. Aunque la interacción fue específica no se alcanzó la saturación del sistema que permitiría el cálculo preciso de K_D en estado estacionario (**Panel B, Figura 27**), de modo que solamente pudo estimarse su valor, que está acompañado de un error relativamente alto.

Las K_D obtenidas a 25 °C para el colato de sodio y el taurocolato de sodio presentaron valores muy similares. La interacción entre FII y los dos ácidos biliares mostró el mismo comportamiento cinético. Como se mencionó previamente no fue posible establecer las constantes cinéticas, pero la rápida disociación observada permitiría inferir que el tiempo de vida media de los complejos es corto.

De acuerdo a la información bibliográfica disponible este es el primer estudio de la interacción entre ácidos biliares y proteínas de amaranto mediante la técnica de resonancia plasmónica de superficie. Los ensayos realizados permitieron determinar las K_D que se establecen entre los péptidos de hidrofobicidad intermedia que componen al aislado de amaranto digerido unidos al chip y los ácidos cólico y taurocólico. Observamos que FII presenta una mayor afinidad por el ácido taurocólico a 25 °C que a 37 °C, ya que las K_D calculadas presentan una diferencia de un orden de magnitud. Cuando el analito fue ácido cólico sólo se pudo determinar la K_D a 25 °C.

Los resultados descriptos muestran que el aislado y la fracción FII obtenida a partir del digerido, fueron capaces de unirse al chip y de interactuar con los ácidos biliares. Sin embargo, sólo se pudieron determinar constantes de afinidad y establecer especificidad en la interacción con ácidos biliares al inmovilizar los péptidos presentes en FII, de tamaño pequeño e hidrofobicidad media. Esta fracción, conformada por moléculas más semejantes entre sí que aquellas presentes en el aislado proteico de amaranto, es una muestra más apropiada para el estudio mediante resonancia plasmónica de superficie, dado

que cuando hay gran heterogeneidad se dificulta la reproducibilidad de la inmovilización. El hecho de que FII sea capaz de unirse a los ácidos biliares es muy auspicioso ya que esta fracción es parte del digerido gastrointestinal. Esta interacción apoyaría los resultados encontrados en los experimentos de solubilización micelar, así como aquellos obtenidos *in vivo*. Aunque no se haya puesto en evidencia empleando esta técnica, no se puede descartar la existencia de una interacción específica entre el aislado digerido y los ácidos biliares.



7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se exploró el efecto que ejercen los componentes de las semillas de amaranto sobre el metabolismo del colesterol. Se examinó este efecto en experimentos *in vivo* con ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa y rica en colesterol que produjo un efecto hipercolesterolémico en los animales. Se registró un incremento en el peso del hígado y un aumento en el contenido de colesterol, lípidos totales y fosfolípidos hepáticos. Además se observó el aumento del colesterol plasmático y la disminución de los niveles de HDL. Este trabajo demuestra que tanto la harina como el aislado proteico de amaranto tienen efectos sobre el metabolismo del colesterol que dependen del tiempo y de la dosis administrada. En bajas dosis y tiempos prolongados la alimentación con muestras ricas en proteínas de amaranto disminuyó el contenido de colesterol hepático y modificó escasamente la excreción de esteroides por heces, mientras que cuando se aumentó el contenido de fibra dietética, el efecto en la disminución del contenido de colesterol hepático fue menos marcado y el observado en la excreción de esteroides por heces más significativo. Por otra parte, cuando se administraron dietas con altas dosis de proteínas de amaranto durante un tiempo corto, disminuyó el nivel de colesterol hepático y aumentó la excreción de esteroides por heces sólo cuando las proteínas estaban acompañadas de fibra dietética. Los resultados obtenidos sugieren que los péptidos que se generan a partir de la digestión de las proteínas de amaranto actúan a través de un mecanismo dual, aumentando la excreción de colesterol y ácidos biliares por heces y modificando el metabolismo del colesterol a nivel hepático. La información obtenida también sugiere que la fibra dietética de amaranto actúa a nivel intestinal modificando el flujo enterohepático del colesterol y de los ácidos biliares.

En los ensayos *in vitro* se demostró que las micelas formadas en presencia de proteínas y fibra dietética contenían una menor proporción de colesterol y

diferentes tamaños. La reducción del contenido de colesterol de las micelas se observó a concentraciones menores de proteína cuando se utilizaron muestras de amaranto ricas en fibra dietética. Sin embargo, la fracción proteica digerida produjo un mayor desplazamiento de colesterol, que las muestras ricas en fibra dietética, cuando la concentración de proteínas fue mayor. Cuando las micelas fueron generadas en presencia de péptidos y fibra dietética los tamaños de las poblaciones se modificaron sustancialmente hacia diámetros mayores. Los péptidos provenientes de las proteínas de amaranto digeridas pueden interactuar específicamente con ácidos biliares.

Los resultados obtenidos *in vitro* explican la mayor excreción de colesterol y ácidos biliares por heces observada en los experimentos *in vivo*. El aumento del tamaño de las micelas formadas en presencia de amaranto sería responsable de una menor incorporación de colesterol y ácidos biliares en ellas o quizás una menor captación por parte de los enterocitos.

En función de lo expuesto, podemos aceptar nuestra hipótesis de trabajo planteada y proponer algunos mecanismos de acción modelando separadamente la acción de los péptidos y de la fibra. La **Figura 28**, que muestra los mecanismos propuestos, fue creada utilizando la plataforma BioRender.com y el modelo de micela propuesto por Marrink & Mark (2002).

Los mecanismos son:

Los péptidos que se generan luego de someter a las proteínas de amaranto a un proceso de digestión gastrointestinal actuarían por mecanismos diferentes y simultáneos (**Figura 28**). En el **Mecanismo A**, predominan las interacciones péptidos-colesterol y péptidos-ácidos biliares disminuyendo su disponibilidad para la formación de las micelas.

En el **Mecanismo B**, (**Figura 28**), los péptidos interactuarían con la superficie de las micelas expuesta al medio acuoso desplazando el colesterol y los ácidos biliares y ocupando su lugar.

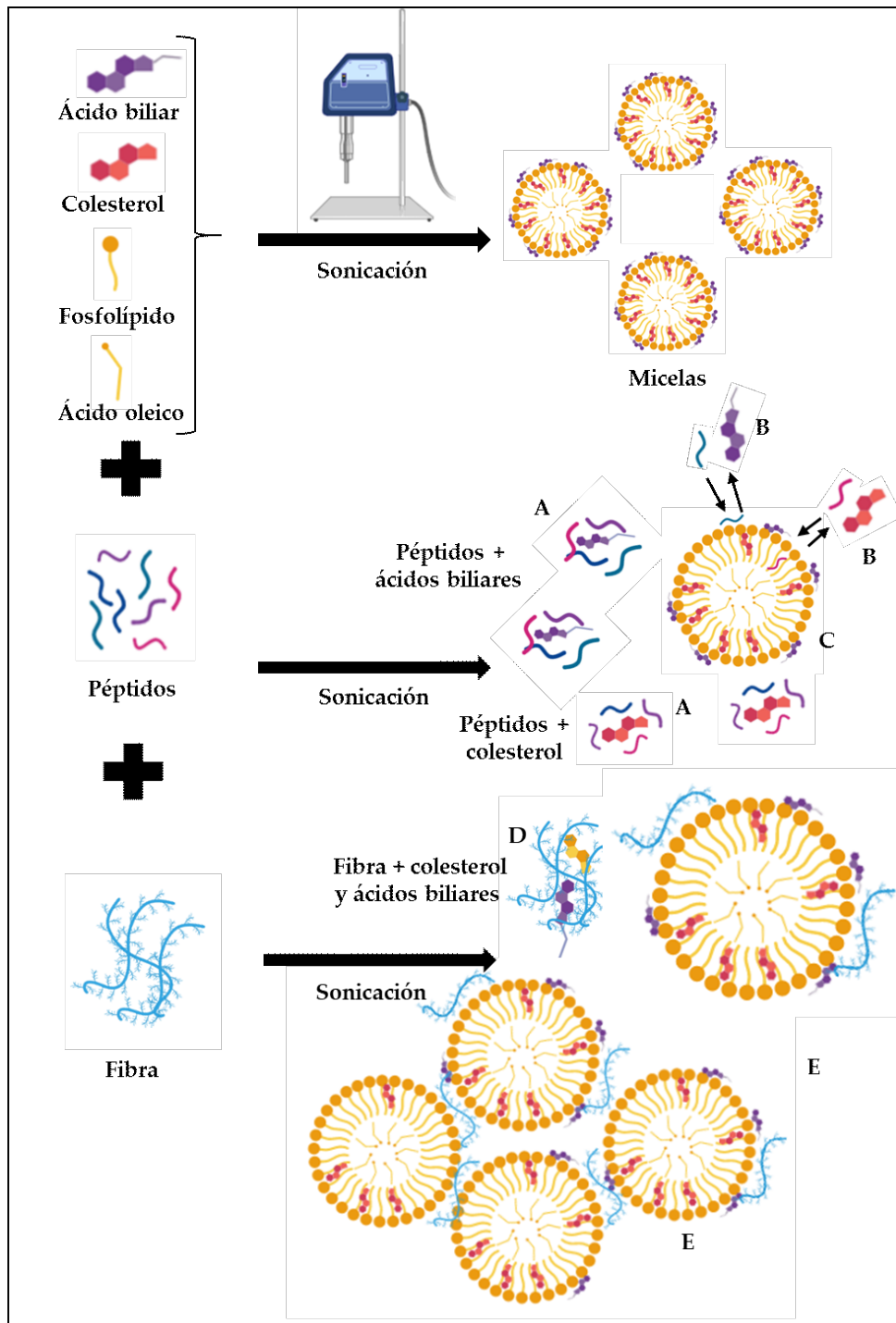


Figura 28 Representación de los posibles mecanismos por los cuales los péptidos y la fibra dietética de amaranto ejercen su actividad sobre el metabolismo del colesterol.

Estos mecanismos conducirían a un desbalance en la composición de las micelas, en términos de agentes tensioactivos, conduciendo a un incremento en el tamaño (**Mecanismo C, Figura 28**).

La fibra dietética actuaría secuestrando colesterol y/o ácidos biliares (**Mecanismo D, Figura 28**) evitando su inclusión en las micelas y produciendo micelas de mayor tamaño. Además, podría interactuar con la superficie de más de una micela uniéndolas a través de uniones no covalentes (**Mecanismo E, Figura 28**).

Los experimentos llevados a cabo en este trabajo de tesis fueron realizados con aislado y harina de amaranto. El primero de ellos contiene una alta proporción de proteínas y un bajo porcentaje de fibra dietética mientras que en la harina la cantidad de ambos componentes es similar. Por consiguiente, en los ensayos realizados los mecanismos modelados previamente se producirían en forma simultánea, predominando los descriptos para los péptidos cuando se empleó el aislado proteico y poniéndose en juego todos ellos cuando se utilizó harina de amaranto.

Por último, y como perspectivas futuras, sería interesante estudiar si estos componentes también ejercen efecto hipocolesterolemizante a través de otros mecanismos como interacción con los transportadores de colesterol presentes en la membrana de los enterocitos, modulación de la expresión de receptores de LDL o quizás directamente modulando la vía del mevalonato.



8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abugoch, L. E., Martínez, N. E. & Añón, M. C. (2010). Influence of pH on structure and function of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein isolates. *Cereal Chemistry Journal*, 87(5), 448-453. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-09-09-0125>
- Ačanski, M. M. & Vujić, D. N. (2014). Comparing sugar components of cereal and pseudocereal flour by GC-MS analysis. *Food Chemistry*, 145, 743-748. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.138>
- Águila, M. B., Loureiro, C. C., da Rocha Pinheiro, A. & Mandarim de Lacerda, C. A. (2002). Lipid metabolism in rats fed diets containing different types of lipids. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 78(1), 25-38. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2002000100003>
- Aiello, G., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., Arnoldi, A., Vistoli, G. & Lammi, C. (2018). Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *Journal of Functional Foods*, 45, 363-370. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.023>
- Anderson, J. W., Story, L., Sieling, B., Chen, W. J. L., Petro, M. S. & Story, J. (1984). Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 40(6), 1146-1155. <https://doi.org/10.1093/ajcn/40.6.1146>
- Arnold, D. R. & Kwiterovich, P. O. (2003). Cholesterol absorption, function, and metabolism. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2ed, 1226-1237), B. Caballero (Ed.), Academic Press, Massachusetts, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/00225-x>
- Association of Official Analytical Chemists. (2006). *Association of Official Analytical Chemists*, W. Horwitz & J. Latimer (Eds.), AOAC International, Gaithersburgs, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1002/jps.2600600253>
- Avanza, M. V., Puppo, M. C. & Añón, M. C. (2006). Structural characterization of amaranth protein gels. *Journal of Food Science*, 70(3), 223-229.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07139.x>

Ayerza, R. & Coates, W. (2005). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25(11), 995-1003.

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2005.09.013>

Barba de la Rosa, A. P., Fomsgaard, I. S., Laursen, B., Mortensen, A. G., Olvera-Martínez, L., Silva-Sánchez, C., Mendoza-Herrera, A., González-Castañeda, J. & De León-Rodríguez, A. (2009). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*, 49(1), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.07.012>

Barba de la Rosa, A. P., Gueguen, J., Paredes-Lopez, O. & Viroben, G. (1992). Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 931-936. <https://doi.org/10.1021/jf00018a002>

Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.

<https://repositori.udl.cat/bitstream/handle/10459.1/49268/013080.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Berger, A., Monnard, I., Dionisi, F., Gumy, D., Hayes, K. C. & Lambelet, P. (2003). Cholesterol-lowering properties of amaranth flakes, crude and refined oils in hamsters. *Food Chemistry*, 81(1), 119-124. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00387-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00387-4)

Beynen, A. C. (2011). Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 36 (Supplement II), 87-93. https://doi.org/10.3177/jnsv.36.supplementii_s87

Bilba, K. & Ouensanga, A. (1996). Fourier transform infrared spectroscopic study of thermal degradation of sugar cane bagasse. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 38(1-2), 61-73. [https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(96\)00952-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(96)00952-7)

- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
<https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>
- Boachie, R., Yao, S. & Udenigwe, C. C. (2018). Molecular mechanisms of cholesterol-lowering peptides derived from food proteins. *Current Opinion in Food Science*, 20, 58-63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.006>
- Boldova Aguar, R., Cenaarro Lagunas, A., Gonzalvo Liarte, M. C. & González García, P. (2004). Hiperlipidemias secundarias. Mecanismos etiopatogénicos. Impacto vascular y tisular de las hiperlipidemias. Historia natural. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 9(18), 1105-1114.
[https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(04\)70167-8](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(04)70167-8)
- Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Food Reviews International*, 5(1), 13-38. <https://doi.org/10.1080/87559128909540843>
- Bressani, R. (1994). Composition and nutritional properties of amaranth. *Amaranth Biology, Chemistry, and Technology*, (185-201), O. Paredes-López (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1201/9781351069601>
- Bressani, R., De Martell, E. C. M. & De Godínez, C. M. (1993). Protein quality evaluation of amaranth in adult humans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 43(2), 123-143. <https://doi.org/10.1007/BF01087917>
- Brites, F., Gómez Rosso, L., Meroño, T., Boero, L. & Rivera, S. (2010). Clasificación y diagnóstico bioquímico de las dislipemias. *Fepreva*, 3, 150-167.
http://www.fepreva.org/curso/4to_curso/bibliografia/volumen3/vol3_7.pdf
- Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4), 798-808.
<https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>
- Bugaut, M. & Bentéjac, M. (1993). Biological effects of short chain fatty acids in nonruminant mammals. *Annual Review of Nutrition*, 13(1), 217-241.
<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.13.1.217>

- Buhman, K. K., Furumoto, E. J., Donkin, S. S. & Story, J. A. (1998). Dietary Psyllium increases fecal bile acid excretion, total steroid excretion and bile acid biosynthesis in rats. *The Journal of Nutrition*, 128(7), 1199-1203.
<https://doi.org/10.1093/jn/128.7.1199>
- Carrero Ayuso, I. & Sánchez Herráez, A. (2009). El mundo de los lípidos. Biomodel.uah.es website: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/lipoproteinas.htm>
- Caselato-Sousa, V. M. & Amaya-Farfán, J. (2012). State of knowledge on amaranth grain: a comprehensive review. *Journal of Food Science*, 77(4), 93-104.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02645.x>
- Castellani, O. F., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1998). Structural modifications of an amaranth globulin induced by pH and NaCl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4846-4853. <https://doi.org/10.1021/jf9802427>
- Chang, N. W. & Huang, P. C. (1990). Effects of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipids in humans. *Journal of Lipid Research*, 31(12), 2141-2147.
<https://www.jlr.org/content/31/12/2141>
- Chang, N. W. & Huang, P. C. (1999). Comparative effects of polyunsaturated to saturated fatty acid ratio versus polyunsaturated and monounsaturated fatty acids to saturated fatty acid ratio on lipid metabolism in rats. *Atherosclerosis*, 142(1), 185-191. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00236-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00236-6)
- Chatjigakis, A. K. A., Pappas, C., Proxenia, N., Kalantzi, O., Rodis, P. & Polissiou, M. (1998). FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37(4), 395-408. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00057-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00057-5)
- Chaturvedi, A., Sarojini, G. & Devi, N. L. (1993). Hypocholesterolemic effect of amaranth seeds (*Amaranthus esculantus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 44(1), 63-70. <https://doi.org/10.1007/BF01088483>
- Chávez-Jáuregui, R. N., Dias Santos, R., Macedo, A., Marte Chacra, A. P., Martinez, T. L., Arêas, J.A.G. (2010). Effects of defatted amaranth (*Amaranthus caudatus*) snacks

- on lipid metabolism of patients with moderate hypercholesterolemia. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1007-1010. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400026>
- Chen, P. S., Toribara, T. Y. & Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28(11), 1756-1758. <https://doi.org/10.1021/ac60119a033>
- Chen, Z., Hu, T. Q., Jang, H. F. & Grant, E. (2015). Modification of xylan in alkaline treated bleached hardwood kraft pulps as classified by attenuated total-internal-reflection (ATR) FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 127, 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.084>
- Choi, S. K., Adachi, M. & Utsumi, S. (2002). Identification of the bile acid-binding region in the soy glycinin A1aB1b subunit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(11), 2395-2401. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.2395>
- Dietschy, J. M. & Wilson, J. D. (1970). Regulation of cholesterol metabolism. *New England Journal of Medicine*, 282, 1241-1249. <https://doi.org/10.1056/NEJM197005282822206>
- Dixit, A. A., Azar, K. M., Gardner, C. D. & Palaniappan, L. P. (2011). Incorporation of whole, ancient grains into a modern Asian Indian diet to reduce the burden of chronic disease. *Nutrition Reviews*, 69(8), 479-488. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00411.x>
- Dobush, G. R., Ankney, C. D. & Krementz, D. G. (1985). The effect of apparatus, extraction time, and solvent type on lipid extractions of snow geese. *Canadian Journal of Zoology*, 63(8), 1917-1920. <https://doi.org/10.1139/z85-285>
- Dodok, L., Modhir, A. A., Buchtová, V., Halásová, G. & Poláček, I. (1997). Importance and utilization of amaranth in food industry. Part 2. Composition of amino acids and fatty acids. *Food/Nahrung*, 41(2), 108-110. <https://doi.org/10.1002/food.19970410211>
- Escudero, N. L., Zirulnik, F., Gomez, N. N., Mucciarelli, S. I. & Giménez, M. S. (2006). Influence of a protein concentrate from *Amaranthus cruentus* seeds on lipid

- metabolism. *Experimental Biology and Medicine*, 231(1), 50-59.
<https://doi.org/10.1177/153537020623100106>
- Fan, Z. (2017). Structures, physicochemical properties, and applications of amaranth starch. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 313-325.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.862784>
- Fellah, A., Anjukandi, P., Waterland, M. R. & Williams, M. A. K. (2009). Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT-IR: Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 847-853. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.003>
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. <https://www.jbc.org/content/226/1/497.long>
- Friedman, M. (1996). Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6-29.
<https://doi.org/10.1021/jf9400167>
- Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G. & Añón, M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have *in vivo* and *in vitro* antihypertensive activity. *Food Chemistry*, 126(3), 878-884. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.065>
- Frota, K. M. G., Mendonça, S., Saldiva, P. H. N., Cruz, R. J. & Arêas, J. A. G. (2008). Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *Journal of Food Science*, 73(9), 235-240. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00953.x>
- Furgione, A., Sánchez, D., Scott, G., Luti, Y., Arraiz, N., Bermúdez, V. & Velasco, M. (2009). Dislipidemias primarias como factor de riesgo para enfermedad coronaria. *Sociedad Latinoamericana de Hipertensión*, 4(1), 18-25.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1702/170216824003>
- Garcia-Diez, F., Garcia-Mediavilla, V., Bayon, J. E. & Gonzalez-Gallego, J. (1996). Pectin feeding influences fecal bile acid excretion, hepatic bile acid and cholesterol

- synthesis and serum cholesterol in rats. *Journal of Nutrition*, 126(7), 1766-1771.
<https://doi.org/10.1093/jn/126.7.1766>
- García Fillería, S. F. & Tironi, V. A. (2017). Prevention of *in vitro* oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 34, 197-206.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.032>
- Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Baraniak, B. & Lin, R. (2009). The effect of simulated digestion *in vitro* on bioactivity of wheat bread with tartary buckwheat flavones addition. *LWT-Food Science and Technology*, 42(1), 137-143.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>
- Gill, T. J., Smith, G. J., Wissler, R. W. & Kunz, H. W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science*, 245(4915), 269-276. <https://doi.org/10.1126/science.2665079>
- Grajeta, H. (1999). Effect of amaranth and oat bran on blood serum and liver lipids in rats depending on the kind of dietary fats. *Food/Nahrung*, 43(2), 114-117.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19990301\)43:2<114::AID-FOOD114>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19990301)43:2<114::AID-FOOD114>3.0.CO;2-#)
- Grube, M., Bekers, M., Upite, D. & Kaminska, E. (2002). Infrared spectra of some fructans. *Spectroscopy*, 16(3-4), 289-296. <https://doi.org/10.1155/2002/637587>
- Hashimoto, S. (2000). Principles of Biacore. *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions*, (23-30), K. Nagata & H. Handa (Eds.), Springer, Tokio, Japón.
https://doi.org/10.1007/978-4-431-66970-8_3
- He, H. P. & Corke, H. (2003). Oil and squalene in *Amaranthus* grain and leaf. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7913-7920. <https://doi.org/10.1021/jf030489q>
- Howard, A. & Udenigwe, C. C. (2013). Mechanisms and prospects of food protein hydrolysates and peptide-induced hypolipidaemia. *Food & Function*, 4(1), 40-51.
<https://doi.org/10.1039/c2fo30216k>
- Huerta-Ocampo, J. A. & Barba de la Rosa, A. P. (2011). Amaranth: a pseudo-cereal with nutraceutical properties. *Current Nutrition & Food Science*, 7(1), 1-9.

<https://doi.org/10.2174/157340111794941076>

Hui, D. Y. & Howles, P. N. (2005). Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(2), 183-192.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.01.003>

Hunter, D. J. & Reddy, K. S. (2013). Noncommunicable diseases. *The New England Journal of Medicine*, 369(14), 1336-1343. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1109345>

Irving, D. W., Betschart, A. A. & Saunders, R. M. (1981). Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science*, 46(4), 1170-1174.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1981.tb03017.x>

Jahaniaval, F., Kakuda, Y. & Marcone, M. F. (2000). Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(8), 847-852.

<https://doi.org/10.1007/s11746-000-0135-0>

Jakulj, L., Trip, M. D., Sudhop, T., von Bergmann, K., Kastelein, J. J. P. & Vissers, M. N. (2005). Inhibition of cholesterol absorption by the combination of dietary plant sterols and ezetimibe. *Journal of Lipid Research*, 46(12), 2692-2698.

<https://doi.org/10.1194/jlr.M500260-JLR200>

Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J. A., Deleu, L. J. & Delcour, J. A. (2017). 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*, 16(1), 39-58. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12240>

Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *Journal of Molecular Recognition*, 17(3), 151-161.

<https://doi.org/10.1002/jmr.660>

Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L. & Jameson, J. L. (2019). Disorders of lipoprotein metabolism. *Principles of Internal Medicine* (20ed, 2286-2298), J. L. Jameson, D. L. Kasper, D. L. Longo, A. S. Fauci, S. L. Hauser & J.

Loscalzo (Eds.), McGraw-Hill Education, New York, Estados Unidos.

- Kongo-Dia-Moukala, J. U., Zhang, H. & Claver Irakoze, P. (2011). *In vitro* binding capacity of bile acids by defatted corn protein hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 1066-1080. <https://doi.org/10.3390/ijms12021066>
- Kris-Etherton, P. M., Ho, C. Y. & Fosmire, M. A. (1984). The effect of dietary fat saturation on plasma and hepatic lipoproteins in the rat. *The Journal of Nutrition*, 114(9), 1675-1682. <https://doi.org/10.1093/jn/114.9.1675>
- Kushi, L. H., Meyer, K. A. & Jacobs, D. R. (1999). Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3), 451-458. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.451s>
- Lado, M. B., Burini, J., Rinaldi, G., Añón, M. C. & Tironi, V. A. (2015). Effects of the dietary addition of amaranth (*Amaranthus mantegazzianus*) protein isolate on antioxidant status, lipid profiles and blood pressure of rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(4), 371-379. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0516-3>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lairon, D. (1997). Soluble fibers and dietary lipids. *Dietary fiber in health and disease* (99-108), D. Kritchevsky & C. Bonfield (Eds.), Springer, New York, Estados Unidos. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1623-5_21
- Lamothe, L. M., Srichuwong, S., Reuhs, B. L. & Hamaker, B. R. (2015). Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans. *Food Chemistry*, 167, 490-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.022>
- Lapphanichayakool, P., Sutheerawattananonda, M. & Limpeanchob, N. (2017). Hypocholesterolemic effect of sericin-derived oligopeptides in high-cholesterol fed rats. *Journal of Natural Medicines*, 71(1), 208-215. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1050-9>
- Lee, J., Nam, D. S. & Kong, C. (2016). Variability in nutrient composition of cereal

- grains from different origins. *SpringerPlus*, 5(1), 419.
<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2046-3>
- Lorenz, K. & Gross, M. (1984). Saccharides of amaranth. *Nutrition Reports International*, 29(3), 721-726.
- Maldonado Saavedra, O., Ramírez Sánchez, I., García Sánchez, J. R., Ceballos Reyes, G. M. & Méndez Bolaina, E. (2012). Colesterol: función biológica e implicaciones médicas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(2), 7-22.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000200002&lng=es&tlng=es
- Malmqvist, M. (1999). BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochemical Society Transactions*, 27(2), 335-340.
<https://doi.org/10.1042/bst0270335>
- Manes, J. D. & Schneider, D. L. (1971). Extraction of bile acids from rat feces containing cholestyramine. *Journal of Lipid Research*, 12(3), 376-377.
<https://www.jlr.org/content/12/3/376.long>
- Marcone, M. F., Kakuda, Y. & Yada, R. Y. (2003). Amaranth as a rich dietary source of β -sitosterol and other phytosterols. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(3), 207-211.
<https://doi.org/10.1023/B:QUAL.0000040334.99070.3e>
- Markey, F. (2000). Principles of surface plasmon resonance. *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions* (13-22), K. Nagata & H. Handa (Eds.), Springer, Tokio, Japón. https://doi.org/10.1007/978-4-431-66970-8_2
- Marlet. J. A. (1997). Sites and mechanisms for the hypocholesterolemic actions of soluble dietary fiber sources. *Dietary fiber in health and disease* (109-122), D. Kritchevsky & C. Bonfield (Eds.), Springer, New York, Estados Unidos.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1623-5_21
- Marques, M. R., Soares Freitas, R. A. M., Corrêa Carlos, A. C., Siguemoto, É. S., Fontanari, G. G. & Arêas, J. A. G. (2015). Peptides from cowpea present antioxidant activity, inhibit cholesterol synthesis and its solubilisation into

- micelles. *Food Chemistry*, 168, 288-293.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.049>
- Marrink, S. J. & Mark, A. E. (2002). Molecular dynamics simulations of mixed micelles modeling human bile. *Biochemistry*, 41(17), 5375-5382.
<https://doi.org/10.1021/bi015613i>
- Martínez, E. N. & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530. <https://doi.org/10.1021/jf960169p>
- Martínez, E. N., Castellani, O. F. & Añón, M. C. (1997). Common molecular features among amaranth storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3832-3839. <https://doi.org/10.1021/jf9700384>
- Matsuoka, R., Shirouchi, B., Kawamura, S., Baba, S., Shiratake, S., Nagata, K., Imaizumi, K. & Sato, M. (2014). Dietary egg white protein inhibits lymphatic lipid transport in thoracic lymph duct-cannulated rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(44), 10694-10700. <https://doi.org/10.1021/jf502741b>
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. del M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F. & Vioque, J. (2009). Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 86-93. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0108-1>
- Mendonça, S., Saldiva, P. H., Cruz, R. J. & Arêas, J. A. G. (2009). Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. *Food Chemistry*, 116(3), 738-742.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.021>
- Millward, D. J. (2012). Amino acid scoring patterns for protein quality assessment. *British Journal of Nutrition*, 108(2), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002462>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113-1124.
<https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>

- Ministerio de Salud de la Nación. (2013). Colesterol elevado. En *Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo. Informe de resultados*.
http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000001706cnt-3ra-encuesta-nacional-factores-riesgo-2013_cap11_colesterol-elevado.pdf
- Morris, D. L. (1948). Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*, 107(2775), 254-255.
<https://doi.org/10.1126/science.107.2775.254>
- Moumita, S., Das, B., Sundaray, A., Satpathi, S., Thangaraj, P., Marimuthu, S. & Jayabalan, R. (2018). Study of soy-fortified green tea curd formulated using potential hypocholesterolemic and hypotensive probiotics isolated from locally made curd. *Food Chemistry*, 268, 558-566.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.114>
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K. & Kuwata, T. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1), 11-17. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4298>
- Nagaoka, S., Masaoka, M., Zhang, Q., Hasegawa, M. & Watanabe, K. (2002). Egg ovomucin attenuates hypercholesterolemia in rats and inhibits cholesterol absorption in Caco-2 cells. *Lipids*, 37(3), 267-272. <https://doi.org/10.1007/s11745-002-0890-6>
- Nagaoka, S., Nakamura, A., Shibata, H. & Kanamaru, Y. (2010). Soystatin (VAWWMY), a novel bile acid-binding peptide, decreased micellar solubility and inhibited cholesterol absorption in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(8), 1738-1741. <https://doi.org/10.1271/bbb.100338>
- Nardo, A. E. (2017). *Péptidos bioactivos de globulinas de amaranto*. Tesis Doctoral. (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/60636>
- Naumann, D. (2000). FT-Infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials* (323-378), H.-U. Gremlich & B. Yang (Eds.), CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1201/b16936>

- Nielsen, P. M., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nkonge, C. & Ballance, G. M. (1982). A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 416-420. <https://doi.org/10.1021/jf00111a002>
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I. & Agrawal, R. (2015). Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 17, 742-748. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.031>
- Oko, A. O. & Ugwu, S. I. (2011). The proximate and mineral compositions of five major rice varieties in Abakaliki, south-eastern Nigeria. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 3(2), 25-27. http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1380023634_Oko%20and%20Ugwu.pdf
- Olán, M., Espitia Rangel, E., Ayala Garay, A. V., Hernández Casillas, J. M., Arellano Vázquez, J. L. & Ruiz Hernández, V. C. (2012). Caracterización morfológica de germoplasma para grano de amaranto (*Amaranthus* spp.). *Amaranto: Ciencia y Tecnología* (215-226), E. Espitia-Rangel (Ed.), INIFAP-SINAREFI, México. <https://doi.org/10.13140/2.1.2981.9684>
- Organización Mundial de la Salud. (2012). *Marco mundial de vigilancia integral, con inclusión de indicadores y un conjunto de objetivos mundiales de aplicación voluntaria para prevenir y controlar las enfermedades no transmisibles*. Ginebra. https://www.who.int/nmh/events/2012/Discussion_paper3_ES.pdf
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C. & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, 197(B), 1160-1167. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.092>
- Ostlund, R. E. & Lin, X. (2006). Regulation of cholesterol absorption by phytosterols.

- Current Atherosclerosis Reports*, 8(6), 487-491. <https://doi.org/10.1007/s11883-006-0024-x>
- Ötles, S. & Ozgoz, S. (2014). Health effects of dietary fiber. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13(2), 191-202. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.2.8>
- Paško, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Fołta, M. & Zachwieja, Z. (2009). Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*, 115(3), 994-998. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.01.037>
- Peckham, S. C., Entenman, C. & Carroll, H. W. (1962). The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *The Journal of Nutrition*, 77(2), 187-197. <https://doi.org/10.1093/jn/77.2.187>
- Pedersen, B., Kalinowski, L. S. & Eggum, B. O. (1987). The nutritive value of amaranth grain (*Amaranthus caudatus*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 36(4), 309-324. <https://doi.org/10.1007/BF01892352>
- Perez, E., Bahnassey, Y. A. & Breene, W. M. (1993). A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch-Stärke*, 45(6), 211-214. <https://doi.org/10.1002/star.19930450605>
- Pérez Escoda, M. T. (2007). *Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G, GBV-C/HGV*. Tesis Doctoral. (Universitat de Barcelona). https://digital.csic.es/bitstream/10261/22631/7/Perez_Escoda_7.pdf
- Pina-Rodriguez, A. M. & Akoh, C. C. (2009). Synthesis and characterization of a structured lipid from amaranth oil as a partial fat substitute in milk-based infant formula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6748-6756. <https://doi.org/10.1021/jf901048x>
- Plate, A. Y. & Arêas, J. A. G. (2002). Cholesterol-lowering effect of extruded amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) in hypercholesterolemic rabbits. *Food Chemistry*, 76(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00238-2)
- Quiroga, A., Martínez, E. N., Rogniaux, H., Geairon, A. & Añón, M. C. (2009).

- Globulin-p and 11S-globulin from *Amaranthus hypochondriacus*: are two isoforms of the 11S-globulin. *The Protein Journal*, 28(9-10), 457-467.
<https://doi.org/10.1007/s10930-009-9214-z>
- Quiroga, A., Martínez, E. N., Rogniaux, H., Geairon, A. & Añón, M. C. (2010). Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) vicilin subunit structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12957-12963.
<https://doi.org/10.1021/jf103296n>
- Quiroga, A., Aphalo, P., Nardo, A. E. & Añón, M. C. (2017). *In vitro* modulation of renin-angiotensin system enzymes by amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) protein-derived peptides: alternative mechanisms different from ACE inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7415-7423.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02240>
- Quiroga, A., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (2007). Amaranth globulin polypeptide heterogeneity. *The Protein Journal*, 26(5), 327-333. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9075-2>
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951. <https://doi.org/10.1093/jn/123.11.1939>
- Röhrli, C. & Stangl, H. (2018). Cholesterol metabolism physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 168(11-12), 280-285. <https://doi.org/10.1007/s10354-018-0626-2>
- Ros, E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 151(2), 357-379. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00456-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00456-1)
- Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T. & Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>

- Ruiz, J. C. R., Ancona, D. A. B. & Campos, M. R. S. (2014). Proteínas y péptidos de origen vegetal en la reducción de lípidos; potencial nutracéutico. *Nutrición Hospitalaria*, 29(4), 776-784. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.4.7208>
- Rupp, C., Steckel, H. & Müller, B. W. (2010). Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2009.12.018>
- Sabbione, A. C. (2015). *Actividad antitrombótica de proteínas de amaranto*. Tesis Doctoral. (Universidad Nacional de La Plata). <https://doi.org/10.35537/10915/44944>
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C. & Scilingo, A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.015>
- Sabbione, A. C., Rinaldi, G., Añón, M. C. & Scilingo, A. (2016). Antithrombotic effects of *Amaranthus hypochondriacus* proteins in rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 19-27. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0517-2>
- Sané, A. T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu J-F. & Levy, E. (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *Journal of Lipid Research*, 47(10), 2112-2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600174-JLR200>
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676-682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Scilingo, A., Molina Ortiz, S. E., Martínez, E. N. & Añón, M. C. (2002). Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship

- between structure and solubility. *Food Research International*, 35(9), 855-862.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00089-3)
- Setchell, K. D. R., Lawson, A. M., Tanida, N. & Sjovall, J. (1983). General methods for the analysis of metabolic profiles of bile acids and related compounds in feces. *Journal of Lipid Research*, 24(8), 1085-1100.
- Shin, D. H., Heo, H. J., Lee, Y. J. & Kim, H. K. (2004). Amaranth squalene reduces serum and liver lipid levels in rats fed a cholesterol diet. *British Journal of Biomedical Science*, 61(1), 11-14. <https://doi.org/10.1080/09674845.2004.11732639>
- Silva-Sánchez, C., Barba de la Rosa, A. P., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., De León-Rodríguez, A. & González de Mejía, E. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1233-1240. <https://doi.org/10.1021/jf072911z>
- Soares, R., Mendonça, S., de Castro, L. Í., Menezes, A. & Arêas, J. A. G. (2015). Major peptides from amaranth (*Amaranthus cruentus*) protein inhibit HMG-CoA reductase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 4150-4160. <https://doi.org/10.3390/ijms16024150>
- Soca, P. E. M. (2015). Dislipidemias. *Revista Brasileira de Medicina*, 72(7), 279-283. <https://doi.org/10.2307/j.ctv86dgfs.25>
- Stone, L. A. & Lorenz, K. (1984). The starch of *Amaranthus* physico-chemical properties and functional characteristics. *Starch-Stärke*, 36(7), 232-237.
<https://doi.org/10.1002/star.19840360704>
- Suárez, S., Aphalo, P., Rinaldi, G., Añón, M. C. & Quiroga, A. (2020). Effect of amaranth proteins on the RAS system. *In vitro, in vivo* and *ex vivo* assays. *Food Chemistry*, 308. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125601>
- Sun, N.-X., Tong, L.-T., Liang, T.-T., Wang, L.-L., Liu, L.-Y., Zhou, X.-R. & Zhou, S.-M. (2019). Effect of oat and tartary buckwheat based food on cholesterol lowering and gut microbiota in hypercholesterolemic hamsters. *Journal of Oleo Science*, 68(3), 251-259. <https://doi.org/10.5650/jos.ess18221>

- Synytsya, A., Čopíková, J., Matějka, P. & Machovič, V. (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 97-106. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00158-9)
- Szymanska-Chargot, M. & Zdunek, A. (2013). Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. *Food Biophysics*, 8(1), 29-42. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9279-7>
- Takao, T., Watanabe, N., Yuhara, K., Itoh, S., Suda, S., Tsuruoka, Y., Nakatsugawa, K. & Konishi, Y. (2005). Hypocholesterolemic effect of protein isolated from quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) seeds. *Food Science and Technology Research*, 11(2), 161-167. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.161>
- Tanaka, K., Aso, B. & Sugano, M. (1984). Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. *Journal of Nutrition*, 114(1), 26-32. <https://doi.org/10.1093/jn/114.1.26>
- Tiengo, A., Motta, E. M. P. & Netto, F. M. (2011). Chemical composition and bile acid binding activity of products obtained from amaranth (*Amaranthus cruentus*) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 370-375. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0253-1>
- Udenigwe, C. C. & Rouvinen-Watt, K. (2015). The role of food peptides in lipid metabolism during dyslipidemia and associated health conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9303-9313. <https://doi.org/10.3390/ijms16059303>
- Ugarte, M., Sanchez Tuero, H., Beaufort, C., Alvarez, R. & Menéndez, J. (2010). Actualización: alimentos que reducen la absorción del colesterol. *Actualización en nutrición*, 11(2) 128-139. http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_11/num_2/RSAN_11_2_128.pdf
- Vahouny, G. V., Tombes, R., Cassidy, M. M., Kritchevsky, D. & Gallo, L. L. (1980). Dietary fibers: Binding of bile salts, phospholipids and cholesterol from mixed micelles by bile acid sequestrants and dietary fibers. *Lipids*, 15(12), 1012-1018. <https://doi.org/10.1007/BF02534316>

- Vance, D. E. & Van Den Bosch, H. (2000). Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1-3), 1-8.
[https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00133-5)
- Vecchi, B. & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(7), 864-870.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.006>
- Velarde-Salcedo, A. J., Bojórquez-Velázquez, E. & Barba de la Rosa, A. P. (2019). Amaranth. *Whole Grains and their Bioactives* (209-250), J. Johnson & T. Wallace (Eds.), Wiley, Hoboken, Estados Unidos.
<https://doi.org/10.1002/9781119129486.ch8>
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J. M. & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>
- Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. (2016). Lipid metabolism. *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level* (5ed, 773-801), D. Voet, J. G. Voet & C. W. Pratt, (Eds.), Wiley, Hoboken, Estados Unidos
- Von Bergmann, K., Sudhop, T. & Lütjohann, D. (2005). Cholesterol and plant sterol absorption: Recent insights. *American Journal of Cardiology*, 96(1), 10-14.
<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.014>
- Vučić, V. & Cvetković, Z. (2016). Cholesterol: Absorption, function and metabolism. *Encyclopedia of Food and Health* (47-52), B. Caballero, P. M. Finglas & F. Toldrá (Eds.), Academic Press, Cambridge, Estados Unidos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00151-3>
- Wang, J., Shimada, M., Kato, Y., Kusada, M. & Nagaoka, S. (2015). Cholesterol-lowering effect of rice bran protein containing bile acid-binding proteins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(3), 456-461.
<https://doi.org/10.1080/09168451.2014.978260>

- Weththasinghe, P., Liyanage, R., Vidanarachchi, J., Perera, O. & Jayawardana, B. (2014). Hypocholesterolemic and hypoglycemic effect of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) incorporated experimental diets in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 401-405.
<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.056>
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H. & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788.
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.12.013>
- Yao, S., Agyei, D. & Udenigwe, C. C. (2018). Structural basis of bioactivity of food peptides in promoting metabolic health. *Advances in Food and Nutrition Research* (145-181), F. Toldrá (Ed.), Academic Press, Cambridge, Estados Unidos.
<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.002>
- Yust, M. del M., Millán-Linares, M. del C., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F. & Pedroche, J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1994-2001. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5573>
- Zhang, H., Yokoyama, W. H. & Zhang, H. (2012). Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1395-1401.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.4713>
- Zhu, X. X. & Brown, G. R. (1990). A simple HPLC method for the analysis of bile acids. *Analytical Letters*, 23(11), 2011-2018. <https://doi.org/10.1080/00032719008052545>
- Zhuang, S., Li, Q., Cai, L., Wang, C. & Lei, X. (2017). Chemoproteomic profiling of bile acid interacting proteins. *ACS Central Science*, 3(5), 501-509.
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00134>