



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos**  
**Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**Evaluación del Efecto de la Extrusión en  
Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)  
sobre los Potenciales de Sensibilización  
y Alergénicos de Fracciones Proteínicas  
en un Modelo Murino**

**T E S I S**

que presenta

**Feliznando Isidro Cárdenas Torres**

para obtener el Grado de

**Doctor en Ciencia**

**y**

**Tecnología de Alimentos**

**Director de Tesis**

**Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno**

**Dr Francisco Cabrera Chávez**

**Culiacán Rosales, Sinaloa, México**

**Octubre 2019**



# **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

## **CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Culiacán Rosales el día 25 del mes noviembre del año 2019 el (la) que suscribe Feliznando Isidro Cárdenas Torres alumno (a) del Programa de Doctora en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 00210668 de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Cuauhtémoc Reyes Moreno y Dr. Francisco Cabrera Chávez y cede los derechos del trabajo titulado "Evaluación del Efecto de la Extrusión en Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sobre los Potenciales de Sensibilización y Alergénicos de Fracciones Proteínicas en un Modelo Murino", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Feliznando Cárdenas T.  
Feliznando Isidro Cárdenas Torres  
Nombre completo y firma

## **Presentación**

Este trabajo de investigación titulado “Evaluación del Efecto de la Extrusión en Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sobre los Potenciales de Sensibilización y Alergénicos de Fracciones Proteínicas en un Modelo Murino” se llevó a cabo en el “Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales”, Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa y en el “Laboratorio de Investigación 2”, Posgrado en Ciencias de la Nutrición y de Alimentos Medicinales, Facultad de Ciencias Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Los C Dr Jorge Milán Carrillo, Dr Roberto Gutiérrez Dorado, Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez, Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno, Dr Francisco Cabrera Chávez participaron como Asesores Académicos. Los C Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno y Dr Francisco Cabrera Chávez fungieron como Directores de Tesis. El proyecto tuvo financiamiento por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. de Apoyo: CB-2014-01 / 240300 / Responsable Técnico: Dr Francisco Cabrera). El alumno Feliznando Isidro Cárdenas Torres recibió Beca Nacional para estudios de Posgrado (Doctorado), durante cuatro años, del CONACyT.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, al Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas y a todos sus Profesores Investigadores. Agradezco enormemente por transmitirme sus conocimientos y por los consejos recibidos durante mi estancia en el programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, lo cual me ayudó a realizar mis estudios y concluir con el trabajo de tesis.

A mis Directores de Tesis Dr Cuauhtémoc Reyes Moreno y Dr Francisco Cabrera Chávez por su gran apoyo, amistad sincera, sabios consejos y, al mismo tiempo, por guiarme en el ámbito de la investigación. Les agradezco enormemente por haber confiado en mí y darme la oportunidad de pertenecer a su Equipo de Trabajo.

A mis Asesores Académicos Dr Jorge Milán Carrillo, Dr Roberto Gutiérrez Dorado y Dra Edith Oliva Cuevas Rodríguez por el apoyo constante y asesoría oportuna; por facilitar la disponibilidad de los laboratorios de los cuales están a cargo, ya que, sin su ayuda, no hubiese sido posible sacar adelante este proyecto.

Al Dr Noé Ontiveros Apodaca, por su asesoría y apoyo, quien ha sido pieza clave a lo largo del desarrollo del presente proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio Ana Isabel, Anna Patricia, Aristeo, Carlos, Cesar, Eduardo, Gilberto, Giovanni, Jesús y Oscar; agradezco su apoyo moral y técnico brindado durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de generación Daniel, Fernando, Perla, Víctor y Xóchitl, por compartir en las instalaciones momentos que hicieron inolvidable mi estancia en este lugar.

A todos mis amigos, quienes siempre han sido un apoyo incondicional en cada una de las facetas de mi vida, gracias por estar siempre presentes y con una mano extendida brindándome su ayuda.

Y de manera muy especial, a toda Mi Familia, por ser fuente inspiración que me ha motivado a continuar para alcanzar mis metas y a no decaer en momentos difíciles, mi más sincero agradecimiento con mucho cariño.



## ÍNDICE GENERAL

	<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iv
	<b>INDICE DE CUADROS</b>	vii
<b>I</b>	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>ABSTRACT</b>	4
<b>II</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
<b>III</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	9
	A ALERGIAS ALIMENTARIAS	9
	B RESPUESTA ALERGÉNICA EN LOS ALIMENTOS	9
	C ORIGEN DE LOS ALÉRGENOS EN LOS ALIMENTOS	13
	D AMARANTO	14
	1 Estructura del grano de amaranto	15
	a Epispermo	18
	b Endospermo	18
	c Embrión	18
	d Perispermo	19
	2 Proteínas del amaranto	19
	3 Usos del amaranto	23
	4 Producción nacional de amaranto	24
	5 Formulación de alimentos hipoalergénicos a base de amaranto	24
	E EVALUACIÓN DE POTENCIALES ALERGÉNICOS	26
	F TECNOLOGÍA EN LA REDUCCIÓN DEL POTENCIAL ALERGÉNICO DE ALIMENTOS	27
	1 Tratamientos térmicos	28
	2 Hidrólisis	29
	3 Presiones altas	30
	4 Irradiación	31
	5 Extrusión	31
	a Características del proceso de extrusión	33
	b Clasificación de los extrusores	34

	1) Extrusor de tornillo simple	35
	2) Extrusor de tornillo doble	37
<b>IV</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	41
<b>V</b>	<b>OBJETIVOS</b>	42
	<b>A OBJETIVO GENERAL</b>	42
	<b>B OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	42
<b>VI</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
	<b>A MATERIALES</b>	43
	1 Obtención de los granos de amaranto	43
	2 Limpieza y acondicionamiento de los granos	43
	<b>B MÉTODOS</b>	43
	1 Obtención de harina de amaranto extrudido	43
	2 Obtención de los alérgenos	47
	a Desgrasado de las harinas de amaranto	47
	b Extracción de proteína total	47
	c Fraccionamiento por clasificación Osborne	48
	3 Electroforesis SDS-PAGE	50
	a Preparación y corrida de los geles	50
	b Lavado y fijación de geles SDS-PAGE	50
	c Tinción de geles SDS-PAGE	50
	d Desteñido de los geles SDS-PAGE	53
	4 Evaluación de la digestibilidad gástrica simulada	53
	5 Determinación de la cantidad de proteína soluble	55
	6 Análisis <i>in silico</i>	58
	7 Evaluación de potenciales de sensibilización y alérgenos	58
	a Animales y aspectos éticos	58
	b Preparación de los alérgenos de referencia	60
	c Determinación de la mejor cantidad de proteína para lograr una sensibilización reproducible	60
	d Protocolo de sensibilización de 28 días	63

e	Reto intragástrico	63
f	Toma muestra de sangre - sacrificio de animales	63
g	Evaluación de anticuerpos IgE e IgG	67
h	Evaluación de mMCP-1 en suero	69
8	Análisis estadístico	71
<b>VII</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>73</b>
<b>A</b>	<b>EXTRACCIÓN DE FRACCIONES PROTEÍNICAS</b>	<b>73</b>
<b>B</b>	<b>ELECTROFORÉISIS SDS-PAGE</b>	<b>75</b>
<b>C</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA SIMULADA</b>	<b>77</b>
<b>D</b>	<b>ANÁLISIS <i>IN SILICO</i></b>	<b>83</b>
<b>E</b>	<b>SELECCIÓN DE LA MEJOR CANTIDAD PARA INDUCIR UNA SENSIBILIZACIÓN REPRODUCIBLE</b>	<b>85</b>
<b>F</b>	<b>POTENCIAL INMUNOGÉNICO</b>	<b>88</b>
<b>G</b>	<b>POTENCIAL DE SENSIBILIZACIÓN</b>	<b>91</b>
<b>H</b>	<b>POTENCIAL ALERGÉNICO (RESPUESTA mMCP-1)</b>	<b>95</b>
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>IX</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>102</b>
	<b>ABREVIATURAS</b>	<b>120</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>123</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Patogénesis de alergias alimentarias mediada por anticuerpos IgE.	11
2	Especies viables del genero <i>Amaranthus</i> para la producción de granos.	16
3	Estructura del grano de amaranto.	17
4	Principales estados productores de amaranto en México.	25
5	Extrusor de tornillo simple.	36
6	Extrusor de tornillo doble.	39
7	Esquema de trabajo experimental.	44
8	Proceso de obtención de harina de amaranto extrudido.	45
9	Esquema de fraccionamiento clasificación Osborne.	49
10	Electroforesis SDS-PAGE.	52
11	Esquema para la evaluación de la digestibilidad gástrica de proteínas.	54
12	Animales empleados para los bioensayos.	59
13	Sensibilización intraperitoneal.	61
14	Esquema general de la determinación de la cantidad de proteína para lograr una sensibilización reproducible en el modelo murino con ratones BALB/c.	62
15	Esquema de sensibilización intraperitoneal con las fracciones proteicas alergénicas en el modelo murino con ratones BALB/c.	64
16	Reto intragástrico.	66
17	Evaluación de anticuerpos IgE e IgG contra las fracciones proteicas de amaranto mediante la prueba de ELISA.	68
18	Evaluación de la concentración de mMCP-1 en suero mediante la prueba de ELISA.	70
19	Cantidad de proteína cruda total y de la extracción de las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto crudo y extrudido.	74

20	Perfil electroforético de la proteína total y de las fracciones proteicas de amaranto crudo y extrudido.	76
21	Digestión gástrica simulada de la proteína total de amaranto crudo y extrudido.	79
22	Digestión gástrica simulada de la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudido.	80
23	Digestión gástrica simulada de la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido.	81
24	Análisis <i>in silico</i> de digestión gástrica y antigenicidad.	84
25	Respuesta de anticuerpos IgE contra la fracción de albúminas de amaranto crudo para determinar la cantidad adecuada de proteína que generó una sensibilización reproducible.	86
26	Respuesta de anticuerpos IgE contra la fracción de globulinas de amaranto crudo para determinar la cantidad adecuada de proteína que generó una sensibilización reproducible.	87
27	Potencial de inmunogénico evaluado como la respuesta de anticuerpos IgG contra la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización.	89
28	Potencial de inmunogénico evaluado como la respuesta de anticuerpos IgG contra la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización.	90
29	Potencial de sensibilización evaluado como la respuesta de anticuerpos IgE en grupos inyectados con la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización	92
30	Potencial de sensibilización evaluado como la respuesta de anticuerpos IgE en grupos inyectados con la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización	93

31	Potencial alergénico evaluado como la concentración de mMCP-1 en suero después del reto intragástrico con la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudo.	96
32	Potencial alergénico evaluado como la concentración de mMCP-1 en suero después del reto intragástrico con la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudo.	97

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág</b>
1	Comparación del contenido nutricional de amaranto con otros cereales	20
2	Concentración de aminoácidos esenciales en diferentes especies del grano de amaranto y de granos de interés alimentario.	21
3	Fórmula empleada en la elaboración de los geles de concentración y de separación, en los geles de poliacrilamida	51
4	Preparación de curva estándar para la determinación de proteína soluble mediante el método del ácido bicinconínico	57
5	Esquema de sensibilización intraperitoneal con las fracciones proteicas alergénicas en el modelo murino con ratones BALB/c	65
6	Preparación de curva estándar para la determinación de mMCP-1 en suero	72

## I RESUMEN

Las alergias alimentarias son reacciones adversas a los alimentos que repercuten de manera negativa en la salud y en la calidad de la vida de las personas que las padecen; los síntomas incluyen urticaria, angioedema, diarrea, shock anafiláctico, etc. La prevalencia estimada de alergias alimentarias es de 2% para niños y de 3% para adultos, y existe evidencia de que se ha venido incrementado. La respuesta alérgica a los alimentos se presenta en dos fases. Una primera fase de sensibilización donde el alérgeno es reconocido por las células presentadoras de antígeno y presentado a las células T, iniciando una respuesta tipo de Th2 en la que se conduce a un cambio de isotipo de anticuerpos (de IgM a IgE) dándose la liberación de estos, los cuales se ligan a la superficie de mastocitos en receptores específicos. En la segunda fase, al haber una re-exposición del alérgeno, éste se reconoce por los anticuerpos ligados, lo que activa la degranulación del contenido de los mastocitos (mediadores inflamatorios) conllevando a la presentación de los síntomas. El amaranto es reconocido como un alimento hipoalergénico, no obstante, se han presentado los primeros casos de alergia alimentaria al amaranto. Las proteínas responsables no han sido identificadas por lo que se desconocen sus potenciales de sensibilización y alérgicos. Por otra parte, el proceso de extrusión se ha utilizado en la elaboración de alimentos hipoalergénicos a base de amaranto; se sabe que la aplicación de diversas operaciones unitarias puede alterar los potenciales de sensibilización y alérgico de los alimentos por lo que resulta importante evaluar dichos parámetros en las harinas de amaranto extrudido para contextualizar su uso en alimentos hipoalergénicos.



El objetivo del estudio es evaluar el efecto de la extrusión de harinas de amaranto sobre los potenciales de sensibilización y alergénicos de fracciones proteicas en un modelo murino. Se utilizaron granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) para la elaboración de harinas de amaranto extrudido (previa optimización) y se efectuó extracción y fraccionamiento de proteínas con base en la clasificación Osborne. Las muestras obtenidas se sometieron a digestión gástrica simulada y se evaluó el perfil electroforético. Paralelamente, grupos de ratones BALB/c hembras (n=6) se inyectaron de manera intraperitoneal con 3 distintas cantidades (0.25, 0.05 ó 0.025 mg) de albúminas o globulinas de amaranto crudo con un protocolo de 28 días, para seleccionar la mejor que presentase una respuesta de sensibilización alérgica reproducible. Obtenidas las mejores cantidades, se procedió a inyectar a grupos de ratones (n=6) en un protocolo de 28 días a fin de evaluar el potencial inmunogénico (anticuerpos IgG), potencial de sensibilización (anticuerpos IgE) y potencial alergénico (cantidad de mMCP-1), usando como estándares alergénicos e hipoalergénicos a la ovoalbúmina y la fosfatasa ácida de papa, respectivamente.

Aunque no hubo diferencia significativa en la cantidad de proteína total de ambas harinas, el rendimiento de extracción de proteína fue significativamente inferior en la harina de amaranto extrudido. El perfil electroforético de las fracciones de albuminas y globulinas se modificó por efecto de la extrusión del amaranto. La proteína total y las fracciones proteicas de ambas harinas fueron fácilmente digeridas, a excepción de una banda perteneciente a las globulinas. Las mejores cantidades de albúminas y globulinas para lograr una sensibilización reproducible fueron de 0.05 y 0.25 mg, respectivamente. Tanto las albúminas como las globulinas de amaranto crudo y

extrudidos fueron relevantes inmunológicamente. Solo las albúminas de amaranto crudo presentaron una sensibilización significativa de anticuerpos IgE, al mismo tiempo que la aplicación de extrusión redujo este potencial. Los grupos sensibilizados con albúminas o las globulinas no presentaron respuesta de mMCP-1.

Los resultados del presente estudio sugieren que el grano de amaranto es adecuado para seguirse considerando como alimento hipoalergénico, más aún cuando es procesado mediante extrusión.

## ABSTRACT

Food allergies are adverse reactions to foods that have a negative impact on the health and life quality of people suffering them; Symptoms include hives, angioedema, diarrhea, anaphylactic shock, etc. The estimated prevalence of food allergies for children is 2% and 3% for adults, and there is evidence that prevalence has been increased. The allergic response to food occurs in two phases. During the first phase of sensitization, the allergen is recognized by the antigen presenting cells and then presented to the T cells, initiating a Th2 type response. After the change of antibody isotype (from IgM to IgE) and their releasing, they are linked to the surface of mast cells in specific receptors. In the second phase, when a re-exposure of the allergen occurs, this is recognized by bound antibodies, initiating the degranulation of the mast cell contents (inflammatory mediators); consequently, the specific symptoms of food allergy appear. Amaranth is recognized as a hypoallergenic food, however, the first cases of food allergy to amaranth have appeared. The responsible proteins have not been identified so their sensitization and allergen potentials are unknown. On the other hand, the extrusion process has been used in the production of hypoallergenic amaranth-based foods; It is known that the application of various unit operations can alter the sensitization and allergenic potentials of foods, so it is important to evaluate these parameters in extruded amaranth flours to contextualize their use in hypoallergenic foods.

The objective of the study is to evaluate the effect of extrusion of amaranth flour on the sensitization and allergenic potentials of protein fractions in a murine model. Amaranth grains (*Amaranthus hypochondriacus*) were used to make extruded

amaranth flours (prior optimization) and protein extraction and fractionation was performed based on the Osborne classification. The samples obtained were subjected to simulated gastric digestion and the electrophoretic profile was evaluated. In parallel, groups of female BALB/c mice (n = 6) were injected intraperitoneally with 3 different amounts (0.25, 0.05 or 0.025 mg) of raw amaranth albumin or globulins with a 28-day protocol, in order to select the best one that presents a reproducible allergic sensitization response. Once the best quantities were obtained, groups of mice (n = 6) were injected in a 28-day protocol in order to evaluate the immunogenic potential (IgG antibodies), sensitization potential (IgE antibodies) and allergenic potential (amount of mMCP-1), using ovalbumin and potato acid phosphatase as allergenic and hypoallergenic standards, respectively.

Although there was no significant difference in the amount of total protein in both flours, the yield of protein extraction was significantly lower in extruded amaranth flour. The electrophoretic profile of the albumin and globulin fractions was modified by amaranth extrusion. The total protein and protein fractions of both flours were easily digested, with the exception of a band belonging to globulins. The best amounts of albumin and globulins to achieve reproducible sensitization were 0.05 and 0.25 mg, respectively. Both albumin and extruded amaranth globulins were immunologically relevant. Only raw amaranth albumins showed significant sensitization of IgE antibodies, while the extrusion application reduced this potential. The groups sensitized with albumin or globulins showed no response of mMCP-1.

Our results suggest that amaranth grain is suitable for continuing to be considered hypoallergenic food, especially when processed by extrusion.

## II INTRODUCCIÓN

La alergia alimentaria se define como una reacción adversa reproducible a los alimentos que está mediada por mecanismos inmunológicos. Este trastorno es la causa más común de reacciones alérgicas en niños o adultos (Casañal y col 2013). Los individuos se sensibilizan una vez que las células B producen anticuerpos IgE específicos de alérgenos y estos están unidos por su región Fc a los receptores FcεRI presentes en la superficie celular de los mastocitos (Waserman y Watson 2011; He y col 2012). Al re-exponerse al alérgeno relevante, dos anticuerpos IgE adyacentes específicos al alérgeno en la superficie de los mastocitos se entrecruzan con la proteína alergénica y desencadenan la desgranulación de las células, liberando mediadores de la respuesta alérgica, como la histamina y la triptasa, y la proteasa de mastocitos-1 (MCP-1) (Wastling y col 1998). Ciertamente, la sensibilización en sí misma no es suficiente para desencadenar los síntomas asociados con reacciones alérgicas, pero es esencial para una posible enfermedad alérgica mediada por IgE (Arámburo-Galvez y col 2018).

La alergia a los alimentos afecta al 1-2% de la población adulta (Sicherer y col 1999; Ontiveros y col 2014) siendo los principales alérgenos el cacahuate, las nueces, huevo, soya, pescado, crustáceos, leche y trigo (Codex Alimentarius 2009). Por el contrario, el amaranto se considera como hipoalergénico y se usa para reemplazar otros granos comúnmente alergénicos en las formulaciones de alimentos. Sin embargo, se han presentado los primeros casos de alergia al amaranto (Kasera y col 2013; Pföhler y col 2015; Deluze y Beaumont 2017; Vaswani y col 2018). Aunque la profilina del polen de las plantas del género *Amaranthus* puede desencadenar

episodios de alergias respiratorias (Tehrani y col 2011; Villalba y col 2014), este no es el alérgeno relevante en los casos de alergia provocados por la ingestión de amaranto. La evidencia sugiere que otras proteínas no identificadas con una masa molecular mayor que la profilina son los desencadenantes de reacciones alérgicas en tales casos (Kasera y col 2013).

Cuando las proteínas de amaranto o amaranto se utilizan como ingredientes en alimentos procesados, se exponen a diferentes pasos de procesamiento (p. Ej., inflado, extrusión, cocción, etc.). En consecuencia, algunos cambios a nivel de conformación molecular están involucrados. Esta es una preocupación primordial ya que los cambios conformacionales en las proteínas podrían causar alteraciones en sus características alérgicas (Besler y col 2001). Esto se debe a que los epítopes (secuencia de aminoácidos reconocida por IgE) podrían ser lineales (residuos de aminoácidos consecutivos) o conformacionales (residuos de aminoácidos reconocidos debido a la posición conformacional) (Ontiveros y col 2014).

El proceso de extrusión implica calor, presión y esfuerzo cortante; estos factores modifican la conformación de las proteínas de forma reversible o irreversible, dando lugar a variaciones en su alergenicidad. En este sentido, el proceso de extrusión se ha utilizado para reducir el número de epítopes conformacionales en harinas que contienen alérgenos como los cacahuets y las avellanas (Chen y Phillips 2005; Ortiz y col 2016). Por otro lado, hay estudios que informan que la extrusión no tiene efecto sobre la alergenicidad de las proteínas del lupino (Álvarez-Álvarez y col 2005).

Desde que la FAO/OMS propuso la evaluación de la alergenicidad de nuevas proteínas en (FAO/WHO 2001), se han publicado varios intentos que involucran mediciones tanto in vitro como in vivo (Kimber y col 2003; Dearman y Kimber 2007). Recientemente se publicó un protocolo de sensibilización que podría usarse para evaluar el potencial de sensibilización y el potencial alergénico de las proteínas en un modelo murino (Arámburo-Galvez y col 2018). En este marco, este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del proceso de extrusión sobre la sensibilización y el potencial alergénico de las fracciones de proteínas de amaranto (albúmina y globulina) en un modelo de ratones BALB/c.

### **III REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **A ALERGIAS ALIMENTARIAS**

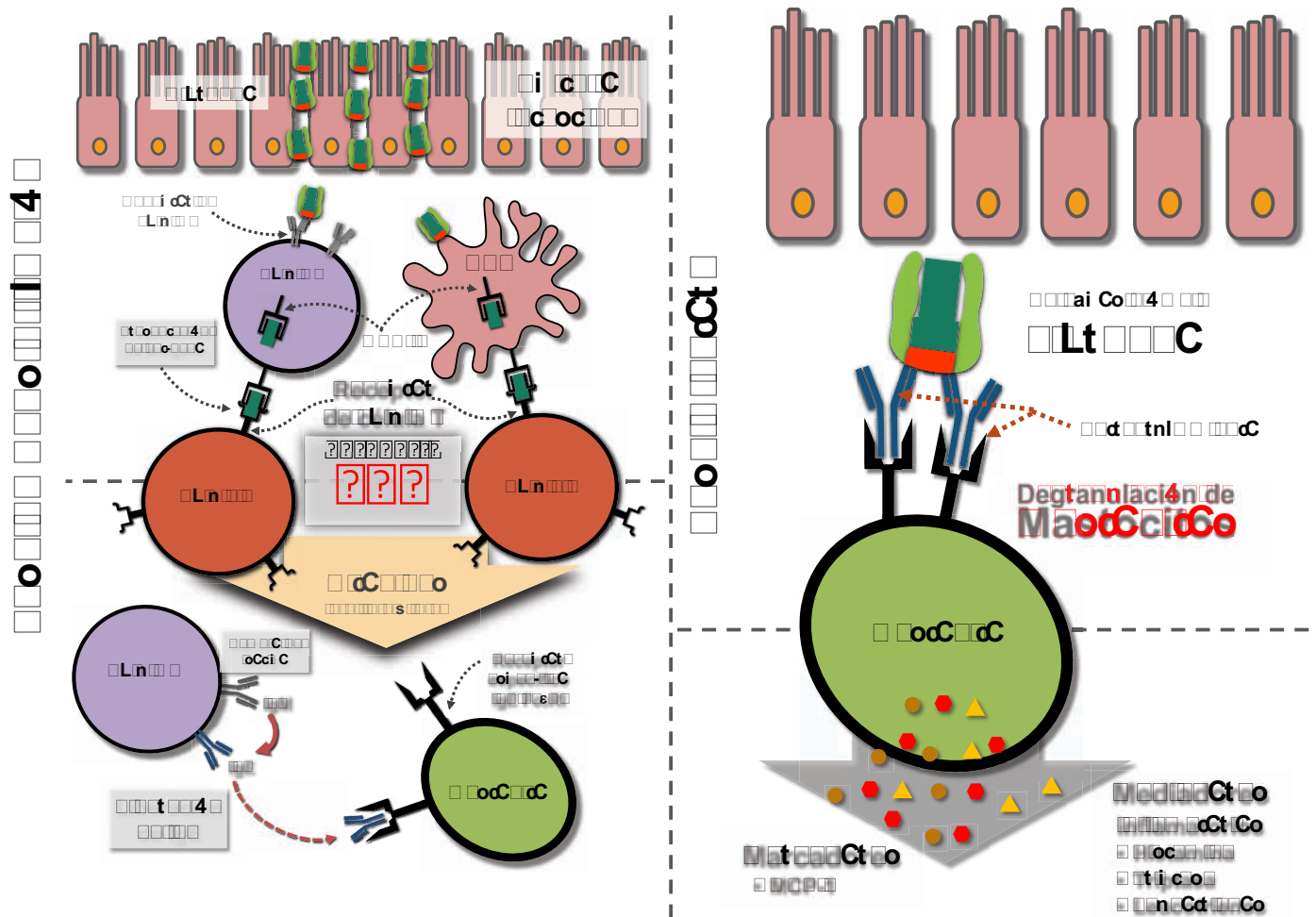
Los alimentos son la causa más común de respuestas alérgicas, motivo por el cual son objeto de una intensa investigación (Casañal y col 2013). La alergia a los alimentos se define como una reacción adversa reproducible a estos, la cual está mediada por mecanismos inmunológicos. Se estima que entre el 1 y 2% de la población adulta presenta este tipo de reacciones alérgicas alimentarias, las cuales se relacionan con una diversidad de alimentos como el cacahuete, los mariscos, las nueces y las frutas y vegetales (Sicherer y col 1999; Ontiveros y col 2014). En el caso de niños de 0 a 4 años de edad, la prevalencia estimada de alergias alimentarias es del 3% sobre todo para la leche, huevo y cacahuete (Rona y col 2007). En México, se estima que la alergia alimentaria en adultos de alrededor del 5% (Prescott y col 2013) y en niños es del 4% (Ontiveros y col 2016) destacando el camarón y los mariscos como los principales alérgenos. Entre los granos con alérgenos se encuentran el trigo y la soya principalmente. En este contexto, existen otros granos como el arroz y el amaranto considerados convencionalmente como hipoalérgicos, ya que son utilizados para reemplazar a los granos que son más alérgicos en los alimentos.

#### **B RESPUESTA ALERGÉNICA A LOS ALIMENTOS**

Las alergias alimentarias mediadas por anticuerpos IgE (uno de los cinco isotipos de anticuerpos que el ser humano desarrolla), se caracterizan por la capacidad que tienen de ejercer una respuesta de anticuerpos IgE en contra de un alérgeno. Aunque se ha logrado avanzar en el conocimiento sobre la respuesta alérgica a los alimentos



mediada por IgE, los mecanismos que subyacen a la respuesta inmune no han sido elucidados en detalle, aunque se sabe que tanto un fuerte componente genético, así como el ambiental contribuyen para que se presenten los síntomas de alergia alimentaria (Oettgen y Broide 2012). En este sentido, se sabe que existen dos fases involucradas en el mecanismo de la respuesta alérgica mediada por IgE (**Figura 1**). La primera etapa, conocida como fase de sensibilización, ocurre con la primera exposición al alérgeno alimentario, sin desencadenar síntomas característicos del padecimiento. La segunda etapa, conocida como fase efectora, se lleva a cabo cuando hay una re-exposición al alérgeno y es después de este evento cuando se ven manifestados los síntomas de alergia alimentaria. En la fase de sensibilización, una vez que los alérgenos procedentes de los alimentos han atravesado el epitelio intestinal, las células presentadoras de antígeno (APC), ya sean células dendríticas o células B, reconocen segmentos de origen proteico de los alérgenos llamados 'epítopes', procedentes ya sea de los alimentos o de los ingredientes contenga. Después, los epítopes de los alérgenos son cargados en moléculas del complejo de histocompatibilidad principal de clase II (MHC-II) y presentados a las células T cooperadoras. Como consecuencia de esto, se inicia la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas del tipo Th2, principalmente IL-4, IL-5 e IL-13 (Waserman y Watson 2011; Ontiveros y col 2014). Esta interacción entre las células presentadoras de antígenos, células T cooperadoras y las células B, conduce a que en estas últimas se produzca un cambio de isotipo de anticuerpo IgM al tipo IgE capaces de ligar epítopes proteicos del alérgeno. Eventualmente, los anticuerpos IgE son secretados hacia el plasma sanguíneo y aquellos que no interactúan con el antígeno pueden unirse a receptores de IgE (FcεRI) presentes en la membrana de mastocitos y



1

P P

basófilos, generándose de esta forma células sensibilizadas que pueden mantenerse por un periodo prolongado. La segunda fase llamada efectora, inicia cuando a través de la dieta se da una re-exposición al mismo alérgeno que dio lugar a la sensibilización. Después de que este atraviesa el epitelio intestinal, es reconocido por los anticuerpos IgE ligados a la membrana de basófilos o mastocitos, produciéndose un entrecruzamiento de dos IgE adyacentes. En consecuencia, se produce la degranulación de estas células, liberándose diversos mediadores inflamatorios como histamina y triptasa y otras moléculas que pueden servir como marcadores de la fase efectora de la alergia (e. g. MCP-1), desencadenando de este modo las manifestaciones clínicas (síntomas) de la alergia alimentaria mediada por IgE, entre los que se tienen urticaria, síndrome alergia oral y anafilaxis (Wastling y col 1998).

Resulta interesante destacar que, aunque comúnmente la sensibilización a los alérgenos alimentarios se induce a través de la vía oral, también puede ocurrir mediante otras vías diferentes, como son las exposiciones a través de la piel o el tracto respiratorio (Oyoshi y col 2014). Estas vías alternas de sensibilización a los alérgenos son recurrentes, debido a que el tejido linfoide del intestino y las mucosas son naturalmente tolerogénicos (Martos y col 2011). Sin embargo, existe evidencia de que proteínas que son resistentes a la digestión pueden aumentar la permeabilidad intestinal y asociarse a la producción de IgE y sensibilización a través de la vía oral (Untersmayr y col 2006).

## **C ORIGEN DE LOS ALÉRGENOS EN LOS ALIMENTOS**

La mayoría de las proteínas alergénicas, particularmente los alérgenos de plantas, parecen pertenecer a un grupo limitado de polipéptidos con características fisicoquímicas semejantes. Entre ellas destacan el ser glucoproteínas solubles en agua, tamaños de 10 a 70 kDa, y que estas son relativamente estables al calor, acidez y ante las proteasas (Breiteneder y Mills 2005; Sicherer y Sampson 2010). Los alérgenos desencadenantes de alergias alimentarias mediadas por IgE son fragmentos de moléculas de proteínas llamados epítopes que pueden desencadenar una respuesta inmune (Besler y col 2001; Breiteneder y Mills 2005). Los epítopes pueden ser lineales, es decir, secuencias consecutivas de aminoácidos reconocidos por los anticuerpos IgE, o bien conformacionales, polipéptidos reconocidos debido a la estructura adquirida en el espacio (Ontiveros y col 2014). Por otro lado, durante el procesamiento o almacenamiento de los alimentos, la actividad alergénica puede permanecer inalterada, disminuir o incrementar y debido a la amplia variedad de métodos de almacenamiento y procesamiento resulta complicado el estudio de su efecto particular sobre los alérgenos (Maleki y col 2003). La base molecular de los cambios en la actividad alergénica es la inactivación o destrucción de las estructuras de los epítopes, la formación de nuevos epítopes, o un mejor acceso a los epítopes crípticos mediada por la desnaturalización del alérgeno nativo (Barba y col 2015).

Hasta el momento, el único tratamiento disponible para evitar que se desencadene la fase efectora de este padecimiento es la restricción del consumo del alimento que contenga el alérgeno. No obstante, la falta de conocimiento de la composición de alimentos, la existencia de productos no etiquetados, la contaminación no intencional

de los alimentos en restaurantes hace difícil que se pueda evitar el contacto con los alérgenos. Como alternativa a esta medida de restricción, en el mercado existen alimentos medicinales indicados para pacientes alérgicos. Los alimentos medicinales, a diferencia de los conocidos como nutracéuticos, son aquellos que han sido formulados especialmente para utilizarse bajo supervisión médica y que reúnen las características nutrimentales para una enfermedad en particular. Adicionalmente, los efectos benéficos de estos alimentos deben estar sustentados en evidencia clínica (Ontiveros y Cabrera-Chávez 2015). Para el caso del tratamiento de las alergias alimentarias con alimentos medicinales se suelen utilizar fórmulas o alimentos hipoalergénicos. La característica de hipoalergenicidad hace referencia a que una amplia proporción de la población (más del 90%) que padece alergia alimentaria a una proteína determinada tolera bien el alimento hipoalergénico en cuestión (Koletzko y col 2012).

## **D AMARANTO**

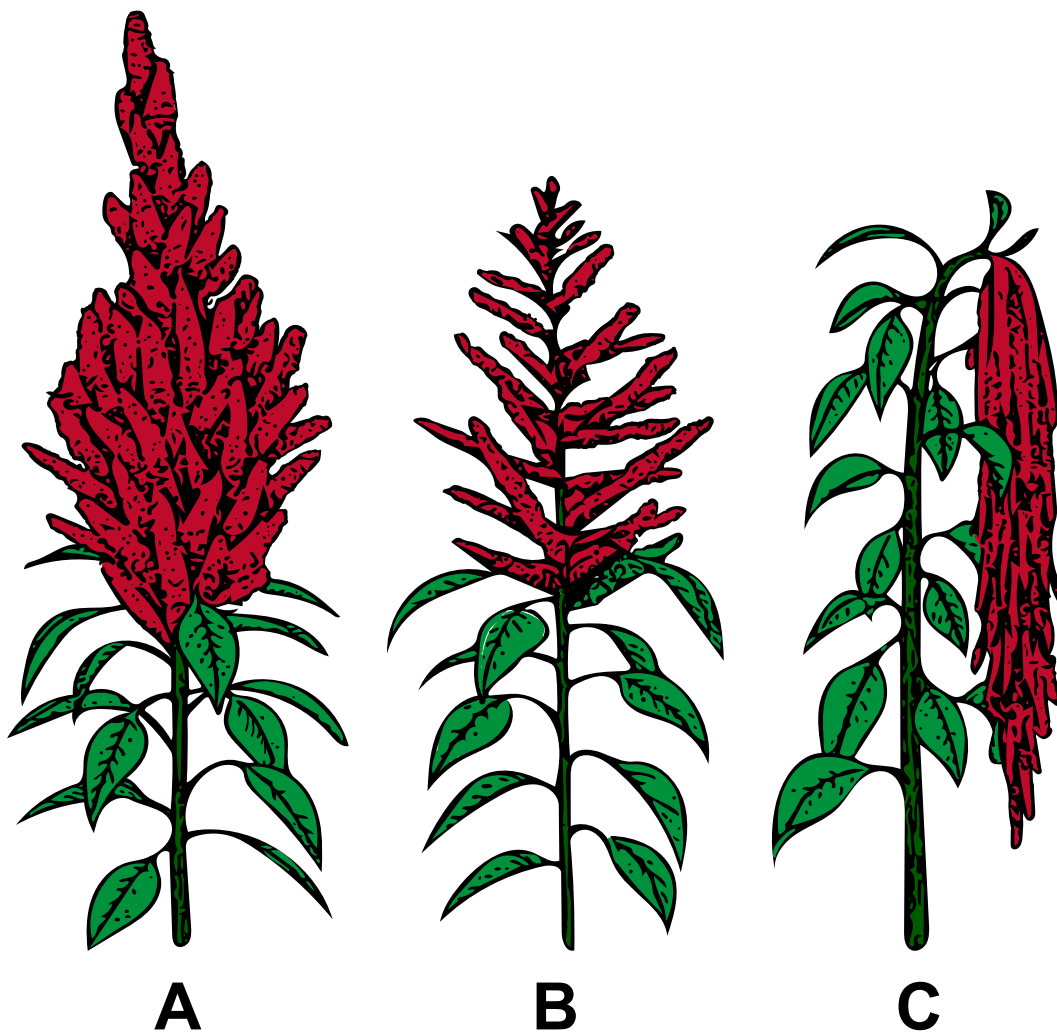
El amaranto es un tipo de planta anual que pertenece a la clase dicotiledónea de la familia *Amaranthaceae* y del género *Amaranthus*, originaria de México y parte de América del Sur (Brenner y col 2000; Milán-Carrillo y col 2012a). En la época precolombina era ampliamente cultivada por los Aztecas, los Incas y los Mayas, y los granos obtenidos eran parte fundamental de la cultura, ya que se utilizaba como parte esencial de la dieta local, así como en los rituales paganos y leyendas (Milán-Carrillo y col 2012b). No obstante, con la llegada de los españoles y la prohibición de este grano, quedó en parcial desuso. Aun así, algunas comunidades continuaron cultivándolo permitiendo que sobreviviese y pudiera así extenderse por el planeta.

El amaranto es un cultivo que presenta diversas ventajas agronómicas como un crecimiento rápido, un rendimiento relativamente alto y una tolerancia a las condiciones extremas y suelos que deficiencias en nutrimentos (Martínez-Cruz y col 2014). En la actualidad, se sabe de la existencia de 87 especies distintas, que varían tanto en su origen, así como en sus centros de domesticación y donde la mayoría de estas son especies salvajes que pueden crecer como malezas agresivas (Brenner y col 2000; Martínez-Cruz y col 2014), destacando 3 especies, *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus caudatus* (**Figura 2**), que se consideran viables para la producción de granos (Milán-Carrillo y col 2012b).

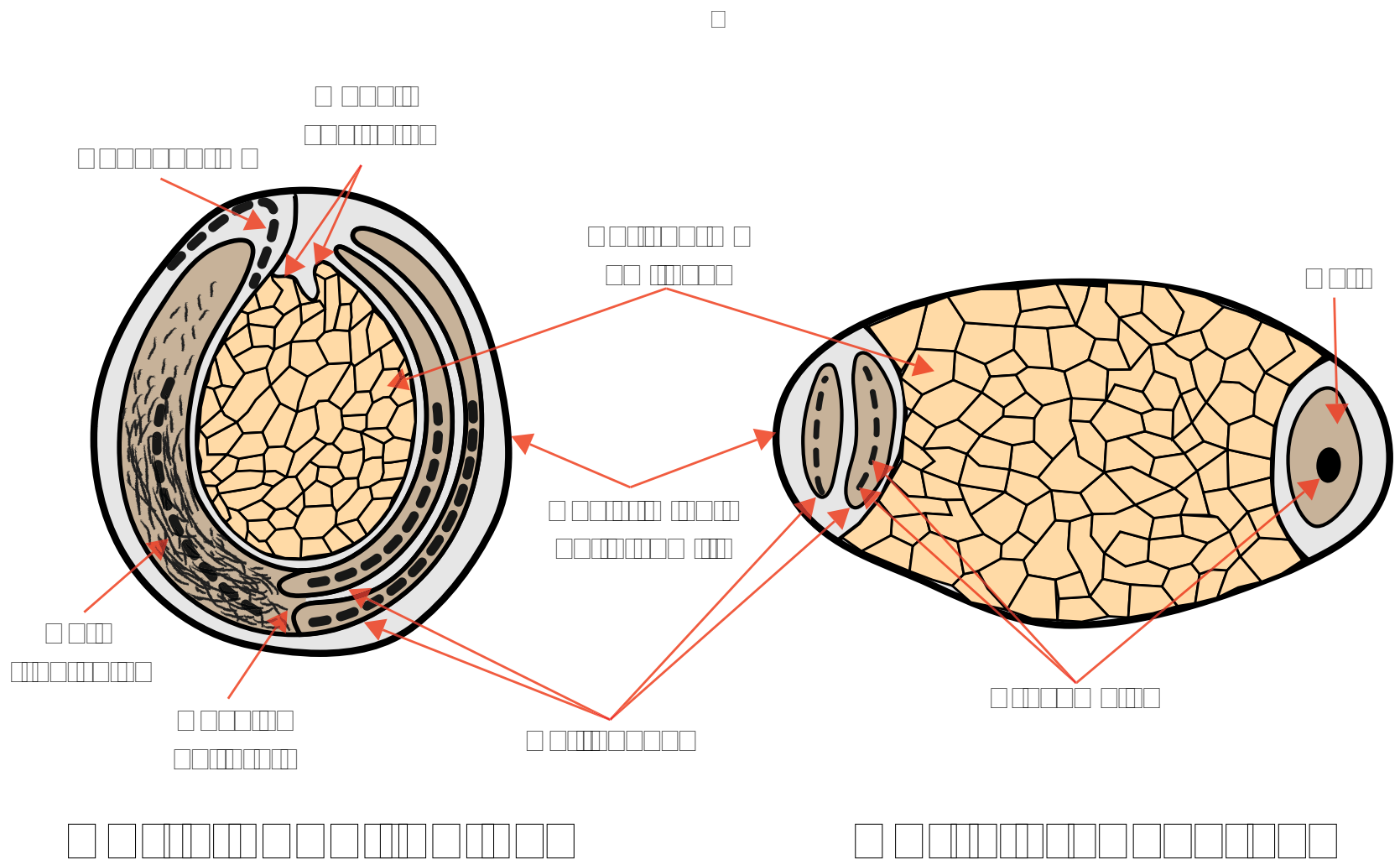
## **1 Estructura del grano de amaranto**

El grano que produce el amaranto es de un tamaño pequeño, midiendo alrededor de 1 a 1.5 mm, donde por cada gramo, se tienen alrededor de 1,000 a 3,000 granos. Estos presentan una forma circular y se pueden encontrar en alrededor de 19 colores, como pueden ser en rojo, rosa, dorado, amarillo, blanco y negro. Este último color se presenta en todas las especies salvajes, teniendo cubiertas de dureza muy alta (Montoya-Rodríguez y col 2015).

En el grano de amaranto (**Figura 3**) se pueden distinguir 4 partes importantes: la cubierta seminal denominada, como *epispermo*, la cual se constituye por una capa formada de células muy finas; la segunda capa, denominada endospermo; el embrión el cual está constituido por dos cotiledones; y una capa interna llamada perispermo, (Irving y col 1981).



**Figura 2.** Especies viables del genero *Amaranthus* para la producción de granos: **(A)** *Amaranthus hypochondriacus*; **(B)** *Amaranthus cruentus*; **(C)** *Amaranthus caudatus*.



晶状体 虹彩 角膜 巩膜 睫状肌 睫状小体 鳃弓 鳃耙 鳃丝 鳃小片 鳞片

□

□□

□



### **a Epispermo**

El epispermo, también denominada cubierta seminal, es una capa compuesta de células muy finas. Esta capa se forma a partir de los tegumentos del óvulo. A veces intervienen las capas periféricas de la nucela. En el epispermo se pueden observar 2 capas, la externa, llamada testa, que se deriva del tegumento externo, y la interna, llamada tegmen, que se deriva del tegumento interno del óvulo y/o de la nucela (Irving y col 1981).

### **b Endospermo**

Puede estar constituido por un tejido vacuolado y de membranas delgadas sin sustancia de reserva. En este caso el endospermo es utilizado parcial o totalmente para que se lleve a cabo el desarrollo del embrión. El material comúnmente almacenado es el almidón, aunque pudiese almacenarse otro tipo de carbohidratos como hemicelulosa y otros polisacáridos, y en menor proporción, proteínas y lípidos (Arellano y col 2007).

### **c Embrión**

Se localiza en el núcleo del grano, donde a partir de este se puede dar lugar al desarrollo de una nueva planta. En el grano de amaranto, el embrión se encuentra formado por dos cotiledones, siendo este la parte más rica en proteínas (Irving y col 1981). Los cotiledones pueden almacenar reservas energéticas para su posterior utilización. El cotiledón tiene a disposición un sistema enzimático necesario para promover la degradación y el transporte de sus sustancias de reserva, sirviendo como

fuerente de nutrientes para el crecimiento y desarrollo del eje embrionario en el proceso de germinación (Arellano y col 2007).

#### **d Perispermo**

El perispermo se caracteriza por poseer altas cantidades de almidón (Arellano y col 2007). Este es un tejido nucelar presente en el grano de familias *Polygonaceae*, *Chenopodiaceae* y *Amaranthaceae*.

## **2 Proteínas del amaranto**

En las últimas dos décadas ha habido un interés creciente para que el consumo para la nutrición humana de este grano se extienda, debido a los diversos beneficios y a la excelente calidad nutrimental que brinda (**Cuadro 1**). Además de ser una buena fuente de fibra soluble y minerales tales como magnesio, fósforo, cobre, y especialmente manganeso, una de las principales cualidades del amaranto es la cantidad y la calidad nutrimental de sus proteínas (Martínez-Cruz y col 2014). En los granos de amaranto se encuentra una cantidad importante de proteínas (17% en promedio), presentando un buen balance de aminoácidos esenciales (Rastogi y Shukla 2013). A diferencia de los granos de los cereales, donde las proteínas se encuentran principalmente en el endospermo, en el amaranto estas se localizan de manera preponderante en el embrión, con un contenido de alrededor 65% (Bressani 1989). En este sentido, se sabe que normalmente en cereales tales como maíz y arroz, las prolaminas son deficientes en los aminoácidos lisina y triptófano (**Cuadro 2**), mientras que las globulinas de las leguminosas presentan deficiencias en aminoácidos

**Cuadro 1.** Comparación del contenido nutrimental de amaranto con otros cereales.

<b>Composición química por cada 100 g b.s.</b>	<b>Cereal</b>				
	<b>Amaranto</b>	<b>Trigo</b>	<b>Maíz</b>	<b>Arroz</b>	<b>Avena</b>
Energía	414.0	334	365	360	389
Nutrientes					
Proteína	19.0	12.8	9.4	5.6	15.8
Grasa cruda	6.	1.7	4.7	0.6	6.9
Hidratos de carbono	62	71	74	79.4	66
Fibra cruda	5.6	2.3	3.0	0.3	3
Calcio (mg)	270	300	7	9	54
Hierro (mg)	15	4	3	5	5

(Malca y col 2001)

**Cuadro 2.** Concentración de aminoácidos esenciales en diferentes especies del grano de amaranto y de granos de interés alimentario.

Fuente de Proteína	Aminoácidos (g/100 g de proteína)									
	Trp	Met/Cys	Thr	Ile	Val	Lys	Phe/Tyr	Leu	LAA	EAA
FAO/WHO (1973)	1.0	3.5	4.0	4.0	5.0	5.5	6.0	7.0	-	-
Amaranto (promedio)	1.3	4.5	3.5	3.6	4.2	5.6	7.3	5.4	75	91
<i>A. hypochondriacus</i>	1.8	0.6	3.3	2.7	3.9	5.9	8.4	4.2	34	78
<i>A. caudatus</i>	1.1	4.9	4.0	4.1	4.7	5.9	8.1	6.3	90	98
<i>A. cruentus</i>	0.9	4.6	3.9	4.0	4.0	6.0	7.9	6.2	88	95
Cebada	1.2	3.2	3.2	4.0	4.7	3.2	8.2	6.5	83	97
Alforfón	1.4	3.7	3.9	3.8	5.2	5.9	5.8	5.8	83	97
Maíz	0.6	3.2	4.0	4.6	5.1	1.9	10.6	13.0	35	86
Avena	1.2	3.4	3.1	4.8	5.6	3.4	8.4	7.0	62	92
Arroz	1.0	3.0	3.7	4.5	6.7	3.8	9.1	8.2	69	94
Soya	1.4	3.1	3.9	5.4	5.3	6.3	8.1	7.7	89	98
Trigo	1.2	3.5	2.7	4.1	4.3	2.6	8.1	6.3	47	86

Adaptado de: (Montoya-Rodríguez 2011)

como cisteína y metionina. Por lo que una dieta basada en el consumo individual ya sea de cereales o leguminosas, traería como consecuencia deficiencias en aminoácidos (Shewry y col 1995; Rascón-Cruz y col 2004). No obstante, las proteínas contenidas en los granos de amaranto son ricas en lisina, y son una buena fuente de triptófano y aminoácidos azufrados (cisteína y metionina) (Morales de Leon y col 2005; Grobelnik Mlakar y col 2009; Awasthi y col 2011).

Se sabe que en el amaranto existen dos clases principales de globulinas. Estas proteínas se encuentran predominantemente en su forma de globulina salina-soluble, las cuales han sido clasificadas con base en sus similitudes estructurales y coeficientes de sedimentación como globulinas 11S (leguminas) y globulinas 7S (vicilinas). Las globulinas 11S (ej. legumina) son hexámeros de 300-400 kDa compuestos de 6 subunidades; cada una de estas subunidades consta de dos cadenas polipeptídica conectadas por enlaces disulfuro, donde una de estas consta de un polipéptido ácido (27-37 kDa) y la otra de uno básico (20-24 kDa). Por su parte las globulinas 7S (ej. evicilina) generalmente se encuentran como trímeros (150-200 kDa) y consisten de 3 subunidades distintas: a (57-68 kDa), a' (57-72 kDa) y b (42-52 kDa) (Wright 1988).

Las globulinas 11S están distribuidas en las semillas de muchas plantas monocotiledones y dicotiledones, por ejemplo, legumbres, arroz, avena, quinoa, calabaza; por otro lado, las globulinas 7S están presentes en legumbres (Fukushima 1991; Shewry y col 1995; Shewry 1998). La fracción de las globulinas es la que se encuentra en la mayor proporción, donde la amarantina (globulina 11S) representa el

90% de las globulinas y el 18.6% del total de las proteínas del grano (Martínez-Cruz y col 2014).

### **3 Usos del amaranto**

El amaranto tiene gran versatilidad en cuanto a los usos que se le puede dar. Puede ser consumido después de ser cocinado como cereal inflado, someterse a molienda para la elaboración de harinas, o ser inflado y posteriormente molido para así obtener harinas pre-gelatinizadas (Matías-Luis y col 2018). En México es comúnmente utilizado en la elaboración tradicional de 'alegrías' al mezclar los granos previamente inflados con miel. La harina de amaranto es usada como espesante en salsas, sopas, natillas; esta también puede ser mezclada con harina de trigo para la preparación de panes no leudados en forma de discos planos llamados 'chapatti' en la India o para la elaboración de 'tortillas' (Martínez-Cruz y col 2014).

Otro importante uso potencial del amaranto es como sustituto de las harinas de trigo en la elaboración de alimentos medicinales libres de gluten enfocados en el tratamiento de personas que padecen de enfermedad celiaca (Reyes-Moreno y col 2019). Las proteínas contenidas en las harinas de este grano se encuentran entre las mejores candidatas debido a que además de tener un balance en el contenido de aminoácidos que supera al de los cereales utilizados de manera convencional, sus polipéptidos tienen la capacidad de interactuar entre sí para lograr la formación de redes proteicas las cuales son estabilizadas por los enlaces disulfuro que se forman entre residuos de cisteína (Cabrera-Chávez y Vergara-Jiménez 2014). Entre los alimentos que se han elaborado donde el amaranto ha fungido como sustituto de harina de trigo

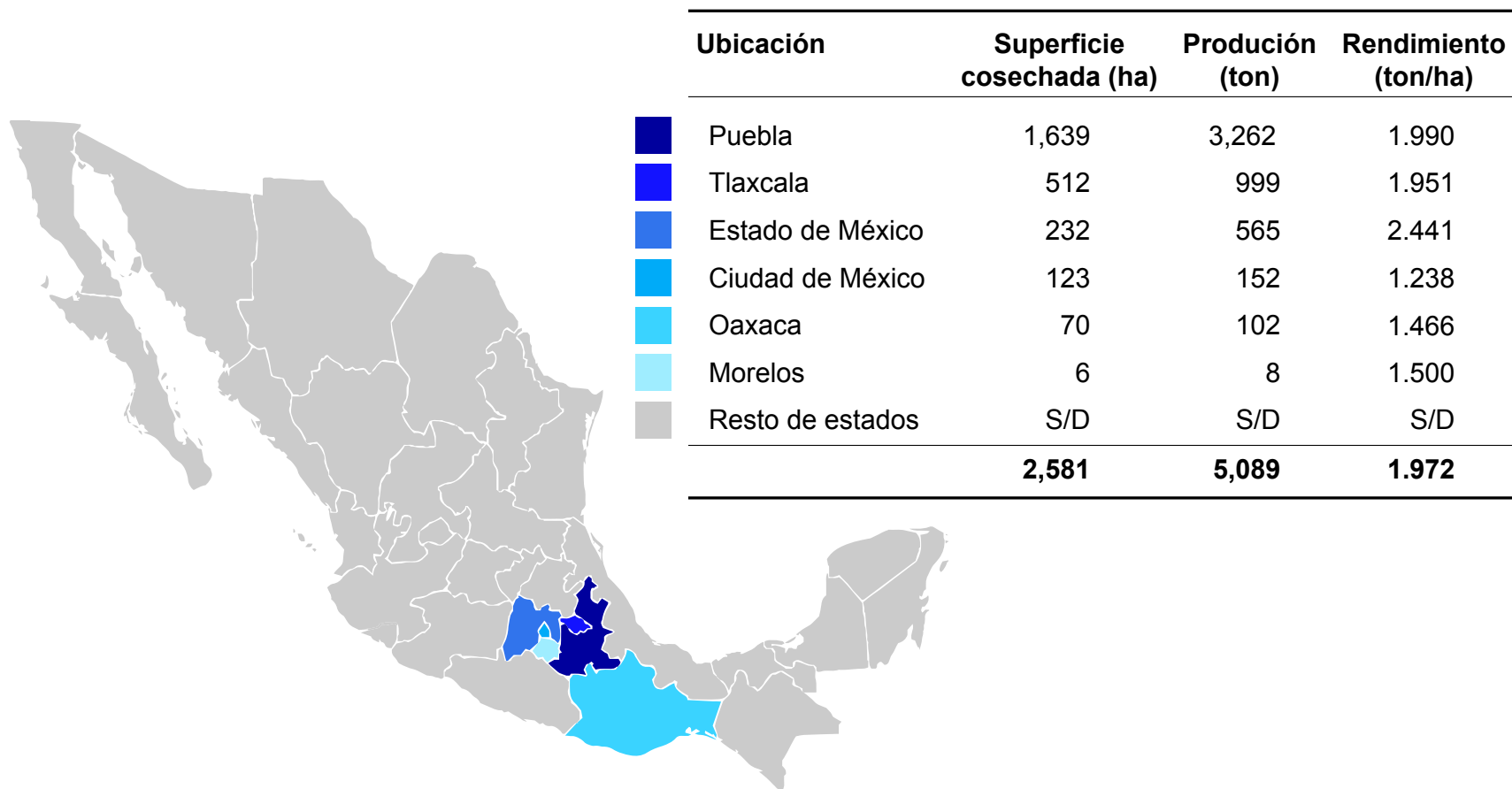
destacan galletas, panes y pastas (Calderón-de la Barca y col 2010; Cabrera-Chávez y col 2012).

#### **4 Producción nacional de amaranto**

El amaranto es un grano que con goza de una explotación masiva en comparación de otros granos. En el año 2018, en México se produjo poco más de 5,000 ton (**Figura 4**), distribuidas en 6 entidades federativas, donde el principal productor fue el estado de Puebla, aportando el 64.1% de la producción nacional con 3,262 ton, seguido de Tlaxcala y el Estado de México con alrededor de 999 y 565 ton, respectivamente. En el caso de Sinaloa, existen reportes de que la siembra de este cultivo se realiza en la modalidad de traspatio y en algunas zonas de la serranía de este estado; no obstante, esta entidad federativa no figuró como un productor importante, al no reportarse la producción de dicho estado (SADER-SIAP 2019).

#### **5 Formulación de alimentos hipoalergénicos a base de amaranto**

Además de las diversas ventajas nutrimentales que presenta el amaranto, este es un grano convencionalmente considerado hipoalergénico, por ello es usado en varias formulaciones de alimentos y suplementos dirigidos a individuos con alergias alimentarias. Sin embargo, en los últimos años se han reportado los primeros casos de alergias alimentarias desencadenadas por sus proteínas (Kasera y col 2013; Pföhler y col 2015; Deluze y Beaumont 2017; Vaswani y col 2018). Desde hace tiempo se conoce que la profilina contenida en el polen de las plantas del género *Amaranthus* actúa como un superantígeno desencadenador de los episodios de alergias



**Figura 4.** Producción nacional de amaranto durante el año 2018.



respiratorias (Tehrani y col 2011; Villalba y col 2014). Sin embargo, en la alergia alimentaria desencadenada con la ingesta de amaranto están involucradas varias proteínas que aún no han sido identificadas, de pesos moleculares mayores al de la profilina (Kasera y col 2013). De estas proteínas aún no se conocen ni sus potenciales de sensibilización ni alergénicos. Más aún, los efectos de las distintas operaciones unitarias involucradas en el procesamiento de este grano sobre los parámetros antes mencionados tampoco han sido determinados. Algunos alimentos especializados con formulaciones hipoalergénicas que involucran al amaranto utilizan proceso de extrusión (Cabrera-Chávez y col 2012). Por ello resulta relevante evaluar si esta operación unitaria altera el potencial alergénico de las proteínas convencionalmente consideradas hipoalergénicas.

## **E EVALUACIÓN DE POTENCIALES ALERGÉNICOS**

Respecto a la evaluación de la alergenicidad de proteínas nuevas, la organización para la alimentación y la agricultura, así como la organización mundial de la salud han propuesto la evaluación de la digestión gástrica (FAO/WHO 2001). Adicionalmente, la evaluación de la digestión intestinal de estas proteínas es de particular relevancia ya que, si después de esta solo quedan péptidos menores de 8 aminoácidos, ellos son inmunológicamente ignorados. Sin embargo, algunas proteínas fácilmente digeribles son alérgenos ampliamente conocidos. Por ello resulta necesaria la evaluación de la alergenicidad de proteínas en modelos *in vivo* adicionalmente a las evaluaciones *in vitro*. La cepa de ratones BALB/c se caracteriza por favorecer el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2 y la producción de anticuerpos IgE (Kimber y col 2003).

Utilizando esta cepa es posible evaluar la calidad y vigor de la respuesta inmune de las proteínas que son administradas de forma sistémica, así como definir si estas proteínas presentan un potencial de sensibilización o inmunogénico con base en la respuesta de anticuerpos IgE o IgG1 específicos, respectivamente (Kimber y col 2003; Dearman y col 2013).

Un protocolo de sensibilización libre de adyuvantes en un modelo murino ha sido implementado exitosamente para evaluar el potencial de sensibilización y alergénico de caseínas de leche bovina y ovoalbúmina (Arámburo-Galvez y col 2018), el cual podría ser usado para conocer los mismos parámetros cuando se exploran nuevos alérgenos alimentarios. Más aun, las proteínas con un mayor y un menor potencial de sensibilización hasta ahora reportadas son la ovoalbúmina y la fosfatasa ácida de papa (Dearman y Kimber 2001; Dearman y col 2001). Este potencial de sensibilización se relaciona igualmente con su potencial alergénico. De esta forma, es de esperarse que durante la caracterización de los potenciales de sensibilización y alergénico de proteínas dietarias, estos arrojen resultados en valores intermedios entre los de la ovoalbúmina y la fosfatasa ácida de papa.

## **F TECNOLOGÍA EN LA REDUCCIÓN DEL POTENCIAL ALERGÉNICO DE ALIMENTOS**

Los epítopes de los alérgenos en alimentos que son reconocidos por el sistema inmune para desencadenar la alergia alimentaria pueden ser lineales o conformacionales. Estos epítopes son susceptibles a la modificación por medio de las operaciones unitarias involucradas en el procesamiento de los alimentos. Por ejemplo,

los epítopes lineales pueden desaparecer al aplicar tratamientos con proteasas, mientras que los epítopes conformacionales pueden verse alterados con cualquier condición que induzca cambios en la estructura secundaria de las proteínas. Existe evidencia de que, en distintos alimentos, la aplicación de diversos tratamientos físicos, tales como tratamientos térmicos, irradiación y altas presiones tiene la capacidad de inducir una alteración en el potencial alergénico (Ontiveros y col 2014).

## **1 Tratamientos térmicos**

Existen diversos estudios que han descrito el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos en los alimentos alergénicos sobre la modificación de la respuesta inmune alérgica. Por ejemplo, Martos y col. (2011) concluyeron que el tratamiento térmico de la ovoalbúmina y el ovomucoide logra reducir la alergenicidad de estas proteínas en parte debido a las alteraciones de sus propiedades digestivas. Por su parte, Golias y col. (2012) encontraron una reducción en la respuesta inmune a la ovoalbúmina en un modelo murino, llegando a la conclusión de que la aplicación de un tratamiento térmico provocó cambios pequeños irreversibles en la estructura secundaria modificando su digestibilidad y al mismo tiempo llevando a que se diera la formación de epítopes. Por otra parte, Tong y col. (2012) encontraron que el efecto de la aplicación de tratamientos térmicos sobre la ovotransferrina era variable, dependiendo del tipo de modificación en la estructura nativa, ya que la alergenicidad de esta proteína se incrementaba con el desdoblamiento de su estructura; no obstante, cuando se presentaban re-arreglos de los enlaces disulfuro la alergenicidad se mostró disminuida.

Además, el tratamiento térmico de alérgenos ha sido usado en la desensibilización en modelo murinos. Por ejemplo, Leonard y col. (2012) encontraron que al sensibilizar oralmente a ratones con ovomucoide calentado, estos no desarrollaban síntomas de anafilaxis. Además, los niveles de IL-13, IL-10 Y IFN- $\gamma$  (Interferón- gamma) en suero sanguíneo se redujeron, permaneciendo este efecto durante dos semanas después del tratamiento. Estos resultados no fueron atribuidos a un efecto de despolarización Th-1, no obstante, se observó una supresión de la respuesta Th1/Th2.

Es importante mencionar que la reducción del potencial alergénico de las proteínas tratados térmicamente se atribuye principalmente a la modificación estructural de estos. De modo que es necesario primeramente caracterizar térmicamente al alérgeno, por ejemplo, determinar el calor necesario para alcanzar una modificación estructural irreversible de la proteína alergénica en cuestión.

## **2 Hidrólisis**

Generalmente los tratamientos de hidrólisis de proteínas (ya sea parcial o exhaustiva) reduce su potencial alergénico, pero no necesariamente lo elimina por completo. Estos tratamientos ya han sido estudiados en especial en fórmulas lácteas infantiles hipoalergénicas (sustitutos de leche). En el caso de las fórmulas lácteas que han sido sometidas a una hidrolisis exhaustiva, esta es tolerada por aproximadamente el 95 % de los individuos alérgicos; sin embargo, las fórmulas parcialmente hidrolizadas pueden conducir a que se produzcan reacciones alérgicas en 33-50 % de los casos de pacientes alérgicos, motivo por el cual no se considera un alimento hipoalergénico (Bahna 2008). La reducción del potencial alergénico de las proteínas

hidrolizadas es atribuida al rompimiento de los epítopes lineales y conformacionales. Para lograr esto, el tipo de hidrólisis es decisivo, ya que algunas proteínas son propensas o resistentes a la digestión dependiendo de la enzima que se utilice. También las condiciones de hidrólisis son de relevancia; por ejemplo, se ha observado que la hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina con tripsina, quimotripsina o pepsina reduce su alergenicidad y cuando la reacción enzimática involucra un tratamiento enzimático, la reducción es aún más pronunciada (Micinskia y col 2013). Aunque el enfoque del procesamiento de alimentos basado en la hidrólisis de proteínas ciertamente puede ser usado para la obtención de alimentos hipoalergénicos, presenta ciertas limitaciones. Desde el punto de vista de la ciencia y tecnología de alimentos, el uso de hidrolizados hipoalergénicos no es viable en diversos alimentos debido a que las propiedades funcionales de estos se ven afectadas por la acción de la hidrólisis (Ontiveros y col 2014).

### **3 Presiones altas**

Los tratamientos de presiones altas pueden conducir a que las proteínas se afecten en su estructura nativa como ocurre similarmente con los tratamientos térmicos (Gross y Jaenicke 1994; Heinz y Buckow 2010). La aplicación de presiones de magnitudes medianas (200 MPa) a menudo solo afecta la estructura cuaternaria de estas biomoléculas, provocando la disociación de proteínas oligoméricas, mientras que presiones por encima de los 400 MPa puede desnaturalizar las proteínas (Aertsen y col 2009). Esta tecnología ya ha sido probada en alimentos alergénicos como es el caso de la soya (Peñas y col 2011; Li y col 2012), almendra (Dhakal y col 2014),

cacahuete (Huang y col 2014), trigo serraceno (alforfón) (Lee y col 2015), entre otros, mostrando un efecto reductor de cuanto a la alergenicidad de estos alimentos.

#### **4 Irradiación**

De acuerdo con Lee y col. (2005), la aplicación de irradiación gamma es recomendada para la producción de productos procesados con huevo con un potencial alergénico reducido. La irradiación gamma causa desnaturalización de proteínas puesto que la radiólisis genera radicales hidroxilos, hidrógeno e hidroperóxido, y adicionalmente, la radiación gamma en las proteínas altera las interacciones intramoleculares causando fragmentación, agregación, o incluso la formación de enlaces disulfuro. Seo y col. (2007) encontraron que la irradiación de ovoalbúmina logró suprimir significativamente, en un modelo murino, la liberación de citocinas Th2 (IL-4 y IL-5) e indujo la producción de citocinas Th1 (IL-12 y IFN- $\gamma$ ). Este tipo de modificación también se ha aplicado a otros alimentos alergénicos, obteniendo diferentes resultados (Lee y col 2001). Por otro lado, el impacto de la aplicación de irradiación UV sobre el potencial alergénico de alimentos también ha sido objeto de estudio. Tammineedi y col. (2013) evaluaron el efecto de la irradiación UV-C sobre la alergenicidad de la  $\alpha$ -caseína y proteínas del suero de leche, encontrando que se lograba una reducción del 25% en la en el potencial alergénico de la  $\alpha$ -caseína, mientras que en las proteínas del suero de leche se alcanzó una reducción de 27.7%.

#### **5 Extrusión**

La extrusión también ha sido un proceso que se ha empleado para la elaboración de alimentos que debido a sus características podría modificar la alergenicidad de los

alimentos que se someten a dicha operación. La extrusión térmica expone a las proteínas a temperaturas y presiones altas y esfuerzos mecánicos intensos, los que se combinan para convertir a los materiales proteínicos en una masa plástica continua. A medida que esta masa viaja a través del extrusor, las características del flujo hacen que las cadenas de proteínas se alineen en capas paralelas al tornillo, formando una matriz tridimensional de polipéptidos parcialmente asociados, entre la cual se encuentra atrapada el agua. Una vez que la presión se libera a la salida extrusor, ocurre una vaporización de la humedad, lo que resulta en la formación de partículas de proteína fibrosas y porosas. Esta estructura conserva la capacidad de retener agua debido a la disposición de los grupos reactivos en el espacio (Stanley 1998). Las condiciones del procesamiento por extrusión (temperatura alta y contenido de humedad bajo) favorecen las reacciones de Maillard donde se ven involucrados grupos amino junto con azúcares reductores, dando como resultado la disminución de lisina disponible y la formación de compuestos coloreados. Dado que el proceso de extrusión involucra la aplicación tanto de calor, presión y esfuerzo de corte, dichos factores pueden alterar, de forma individual o conjunta, la conformación de las proteínas ya sea reversible o irreversiblemente, dando lugar a variaciones en su alergenicidad. En este sentido, el proceso de extrusión ha sido utilizado para disminuir la cantidad de epítopes conformacionales en harinas que contienen alérgenos como cacahuete y avellana (Chen y Phillips 2005; Ortiz y col 2016). Por otra parte, existen estudios donde se indica que la extrusión no induce efecto alguno sobre la alergenicidad de granos como es el caso del lupino (Álvarez-Álvarez y col 2005). Sin embargo, también existen reportes de que los cambios conformacionales de las proteínas pueden causar el aumento en su potencial alergénico (Nowak-Wegrzyn y Fiocchi 2009).

## **a Características del proceso de extrusión**

El procesamiento de alimentos por extrusión es una tecnología que implica un bajo costo y una eficiencia alta, que puede ser utilizada para el procesamiento de cereales o almidones en productos industriales y alimentarios, tales como botanas, cereales para desayuno y fórmulas infantiles (Zazueta-Morales y col 2002; Milán-Carrillo y col 2006). Este es un proceso continuo que involucra condiciones de temperaturas altas y tiempos cortos (HTST, por sus siglas en inglés), en combinación de corte mecánico y calor, propiciando que se lleve a cabo la gelatinización parcial del almidón, al tiempo que se presenta una desnaturalización parcial de proteínas. El producto plastificado que se obtiene se reestructura presentando formas y texturas distintas al material original antes de ser sometido a dicho proceso. Así, la extrusión de alimentos provee de diversas ventajas, ya que mejora la digestibilidad de proteínas, además que la pérdida de nutrimentos se ve disminuida (Asp y Bjorck 1989; Mercier 1993). Otra ventaja que presenta el proceso de extrusión es la destrucción de componentes antinutricionales, como taninos, fitatos, inhibidores de tripsina, hemaglutininas, los cuales impactan negativamente en la digestibilidad de las proteínas (Reyes-Moreno y col 2017). En este sentido, los productos de amaranto extrudidos presentan un valor nutrimental mejor que el amaranto crudo, puesto que los niveles de lisina disponible no se ven afectados significativamente, al mismo tiempo se favorece la disminución de algunos factores antinutricionales, haciendo prescindible la cocción final por parte del consumidor (Mendoza y Bressani 1987; Bressani y col 1992; Chávez-Jáuregui y col 2000). Además, el proceso de extrusión mejora las propiedades nutracéuticas, ya que se ha reportado que los hidrolizados proteínicos de amaranto extrudido demuestran



tener mayores propiedades anti-ateroscleróticas (Montoya-Rodríguez y col 2014a) y anti-inflamatorias (Montoya-Rodríguez y col 2014b) en comparación de sus contrapartes no extrudidas.

## **b Clasificación de los extrusores**

Los extrusores se pueden clasificar en tres tipos principales: pistón, rodillos y tornillo (Reyes-Moreno y col 2017). Los extrusores de pistón, son los más simples en diseño, se utilizan principalmente para dar forma a un material determinado. Consisten de un pistón o una batería de pistones, los cuales depositan cantidades muy precisas de material en una banda transportadora. Estas máquinas son comúnmente usadas en la industria de confitería, por ejemplo, para depositar el relleno en los chocolates (Dziezack 1989). Los extrusores de rodillos utilizados también para dar forma, consisten de dos rodillos contra-rotatorios que giran a velocidades iguales o diferentes y que tienen superficies lisas o perfiladas. El claro entre los rodillos puede cerrarse para comprimir el material que pasa a través de la unidad, o bien el extrusor se fabrica en una variedad de configuraciones y con capacidad para formar cilindros rellenos o placas. Los extrusores de tornillo son el tipo más común utilizado en la actualidad (Reyes-Moreno y col 2017). Estos constan de tornillos sencillos, dobles o múltiples, los que rotan en el interior de un cañón estacionario para empujar el material hacia y a través de un orificio de un dado (Dziezack 1989). Los extrusores se clasifican también de acuerdo al tipo de construcción en extrusores de tornillo simple y extrusor de tornillos gemelos. Los principios de operación son similares en los dos tipos.

## 1) Extrusor de tornillo simple

Los extrusores de tornillo simple (**Figura 5**) se utilizaron por primera vez en la década de 1940 para la producción de botanas expandidas ('infladas') a partir de harinas de cereales y grits. Durante el transporte a través del extrusor, la energía mecánica de la rotación del tornillo se convierte en calor, pudiendo alcanzar la mezcla temperaturas de alrededor 150°C. La mezcla plastificada resultante es entonces forzada a pasar a través del dado. La reducción repentina en la presión del dado produce una salida rápida de la humedad contenida en forma de vapor, hinchando el producto. A partir de finales de la década de 1950, el proceso de extrusión se fue desarrollando en la manufactura de productos tales como alimentos para mascotas expandidas, cereales para desayuno expandidos listos para consumir, y proteína vegetal texturizada. Dado que los extrusores de tornillo simple posee una capacidad de mezclado relativamente pobre, a menudo son utilizados con mezclas que han sido previamente mezcladas o preacondionadas. El preacondicionamiento es usado para incrementar el tiempo de residencia, para reducir el consumo de energía mecánica y/o para incrementar la capacidad. El preacondicionador es una cámara atmosférica o presurizada en la cual los ingredientes granulares del alimento son humectados o calentados (o ambos) uniformemente con el contacto de vapor vivo o agua antes de entrar al extrusor. El extrusor de tornillo simple se basa en el 'flujo de arrastre' para transportar el material de alimentación a través del barril del extrusor y para desarrollar presión en el dado. Para que el producto pueda avanzar a lo largo del barril no debe girar con el tornillo. La fuerza de fricción entre el material y la pared del barril es la



única fuerza que puede mantener el material gire con el tornillo y, por lo tanto, muchos extrusores con solo tornillo tienen ranuras o surcos en el barril para promover la adhesión a la pared del cilindro. El 'flujo de arrastre' resultante es aproximadamente la mitad de la capacidad volumétrica del tornillo, mientras que la mitad del producto es dejado atrás. La rotación del tornillo en el cilindro da lugar a un segundo flujo, llamado flujo cruzado de canal. Este flujo no contribuye al movimiento neto de material a lo largo del cañón, sino que recircula dentro de los vuelos de tornillo, y por lo tanto es en parte responsable de la acción de mezcla del extrusor. Al forzar el material de alimentación a lo largo del barril del extrusor y a través de la abertura restringida del dado, se genera un tercer flujo conocido como el flujo de presión. El flujo de presión provoca el movimiento hacia atrás por el cañón extrusor, causando más de mezcla del producto. Los tres flujos se combinan para formar el flujo neto del material fuera del dado (Dziezack 1989; Ainsworth 2012).

## **2) Extrusor de tornillo doble**

Los extrusores de tornillo doble se introdujeron en la industria alimentaria en la década de 1970 y ahora son ampliamente utilizados en la producción de alimentos. Además de la manufactura de alimento similares a aquellos producidos por los extrusores de tornillo sencillo, los extrusores de tornillo doble han encontrado una amplia aplicación en la industria alimentaria debido a que ofrecen mejor control del proceso, versatilidad y flexibilidad en el diseño flexible, permitiendo una limpieza facilitada, intercambio rápido del producto, y la capacidad de manejar una amplia variedad de fórmulas.

El extrusor de tornillo doble (de tornillos gemelos) está compuesto de un cilindro simple en cuyo interior rotan dos tornillos (**Figura 6**). Los extrusor de tornillo doble pueden tener configuraciones donde los tornillos estén en co-rotación o bien donde estos giren en sentido contrario, es decir, en contra-rotación. Ambas configuraciones, pueden tener tornillos totalmente, parcialmente o no engranados. Los tornillos co-rotatorios y contra-rotatorios difieren en sus características de transporte y por lo tanto son adecuados para diferentes aplicaciones tecnológicas (Harper 1986; Frame 1994). Los equipos provistos de tornillos contra-rotatorios son particularmente adecuados para el procesamiento de materiales con viscosidades relativamente bajas que requieren velocidades de tornillo bajas y tiempos de residencia largos. Como ejemplo de los productos que se producen con este tipo de extrusor están las gomas de mascar, golosinas de gomas y otros productos de confitería. Sin embargo, para la elaboración de productos extrudidos resulta poco económico. Los extrusores con tornillos co-rotatorios son adecuados para aplicaciones donde se requiere de un alto grado de transferencia de calor, pero no de convección forzada, por lo tanto, se usan ampliamente para la producción de productos expandidos. En este tipo de equipos de extrusión, el material que está siendo extruido se transfiere de un tornillo al otro. El mecanismo de flujo es una combinación tanto de arrastre como de flujo de desplazamiento positivo (Jager y col 1992). Los equipos co-rotatorios pueden ser operados a velocidades más altas que los de tornillos contra-rotatorios porque las fuerzas radiales generadas se distribuyen más uniformemente. La capacidad de convección de los extrusores de tornillo doble les permite manipular materiales pegajosos y otros difíciles de manejar (Fellows 2000; Ainsworth 2012). En general,



estos equipos de extrusión pueden estar contruidos en varios diseños, donde el diámetro puede ser constante, o desigual y cónico. A la vez, el ancho del canal y el espesor del alabe también puede ser variable. Aunque el calor que se genera en el material que se somete a extrusión se debe a la fricción causada por la acción del tornillo y las barras interiores del cilindro, algunos diseños de extrusores incorporan resistencias eléctricas como elementos calefactores, mientras que en otros se emplea vapor de agua para calentar directamente el cilindro (Fellows 2000).

#### IV JUSTIFICACIÓN

El amaranto es un grano ampliamente considerado como alimento hipoalergénico, por lo que la industria alimentaria lo ha venido utilizando frecuentemente como un reemplazo en la formulación de productos alimenticios (panes de trigo, papillas para bebe, entre otros) que de manera convencional se elaboran a partir de ingredientes más alergénicos. Sin embargo, la presentación de casos clínicos de anafilaxis inducida por la ingesta de amaranto hace necesario que se caractericen sus fracciones proteínicas desde un enfoque alergénico. Existen operaciones unitarias aplicadas en los alimentos que han demostrado alterar el potencial alergénico de las proteínas de diversos alimentos, de los cuales algunos de ellos logran disminuirlo generando proteínas hipoalergénicas comparadas con sus contrapartes convencionales. No obstante, cabe la posibilidad de que el potencial alergénico se vea aumentado por efecto de estas operaciones unitarias, motivo por lo cual, la evaluación de los potenciales de sensibilización y alergénico (con respecto a las proteínas de mayor y menor alergenicidad reportadas en la actualidad, ovoalbúmina y fosfatasa ácida de papa, respectivamente) de las proteínas de harinas de amaranto crudo y extrudido generaría datos relevantes para contextualizar el uso del amaranto en alimentos hipoalergénicos.



## V OBJETIVOS

### A OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la extrusión del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sobre los potenciales de sensibilización y alergénico de sus fracciones proteínicas en un modelo murino.

### B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Elaborar harinas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) crudo y extrudido.
- 2 Obtener los extractos de proteína total y fracciones proteínicas de acuerdo a la clasificación de Osborne a partir de las harinas de amaranto crudo y extrudido.
- 3 Caracterizar el perfil electroforético de la proteína total y las fracciones proteínicas extraídas de las harinas de amaranto crudo y extrudido.
- 4 Evaluar la resistencia a la digestión gástrica simulada de la proteína total y las fracciones proteínicas extraídas de las harinas de amaranto crudo y extrudido.
- 5 Montar un modelo murino de sensibilización alérgica en ratones BALB/c con las mejores condiciones de cantidad de proteína de las fracciones proteínicas a utilizar en los bioensayos.
- 6 Determinar los potenciales de sensibilización de las fracciones proteicas obtenidas a partir de harinas de amaranto crudo y extrudido en un modelo murino.
- 7 Evaluar los potenciales alergénicos de las fracciones proteínicas a partir de harinas de amaranto crudo y extrudido en un modelo murino.

## VI MATERIALES Y MÉTODOS

### A MATERIALES

#### 1 Obtención de los granos de amaranto

Se utilizaron granos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) de la cosecha 2016, cultivado y cosechado en Temoac, Morelos.

#### 2 Limpieza y acondicionamiento de los granos

En el Laboratorio de Bioprocesos y Alimentos Funcionales, se realizó una limpieza manual exhaustiva de estos, a fin de retirar cualquier tipo de materia extra y de evitar la presencia de granos de una especie distinta al amaranto que pudieran contaminar con sus proteínas a las harinas de amaranto obtenidas *a posteriori*.

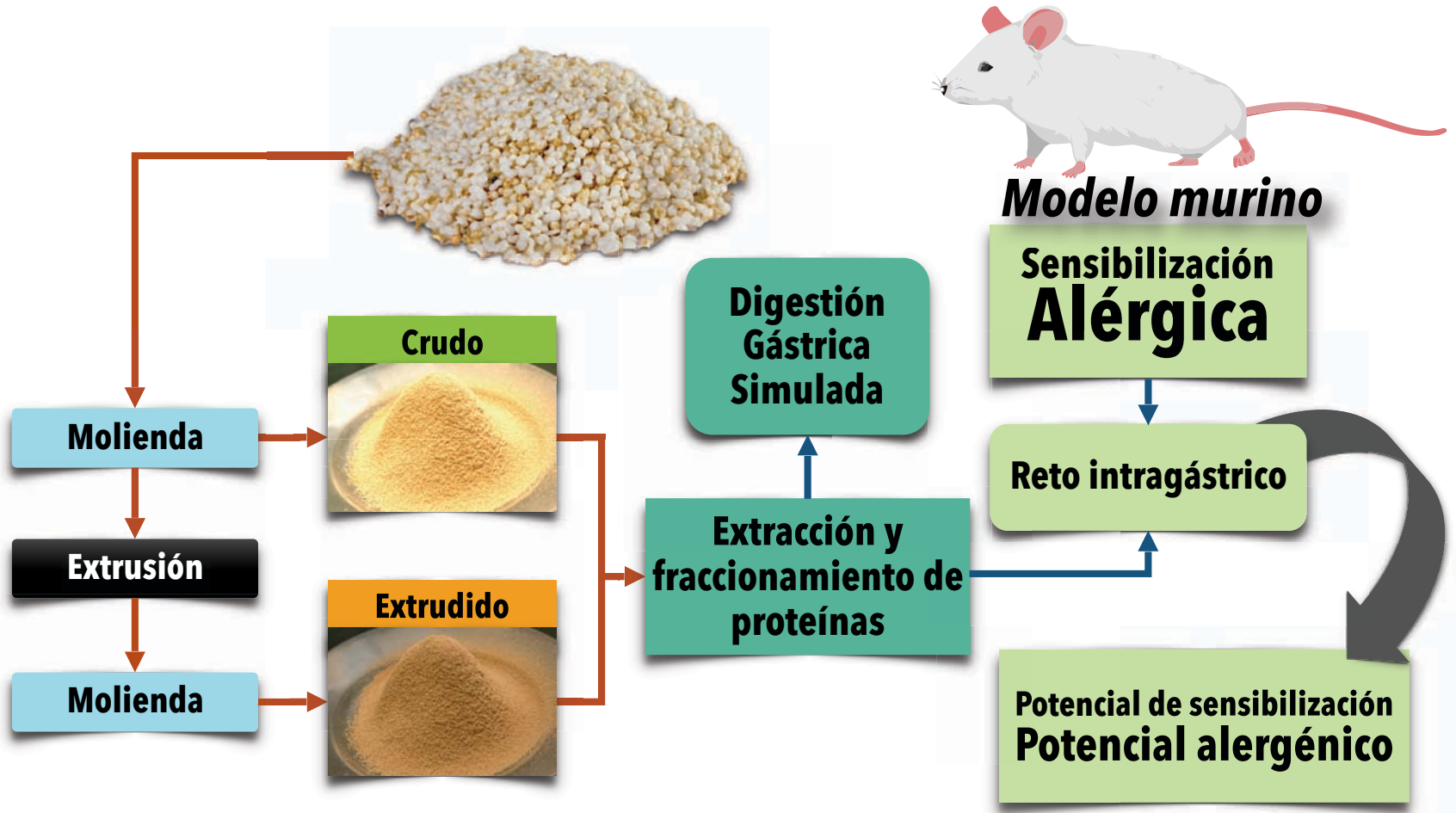
### B MÉTODOS

En la **Figura 7** se presenta el esquema de trabajo experimental realizado en el presente estudio del presente estudio.

#### 1 Obtención de harina de amaranto extrudido

Para la elaboración de la harina de amaranto extrudido (**Figura 8**) se utilizó la metodología descrita por Milán-Carrillo y col. (2012a). Lotes de 400 g de granos de amaranto se sometieron a molienda para obtener un tamaño de partícula malla 60, equivalente a 0.25 mm. Posteriormente se mezclaron con 0.21% de hidróxido de calcio con base en el peso del grano y luego se humectaron con agua purificada hasta

□



□□□□□□□□□□ □□□ □□□□□□□□□□□□ □□□□ □□□□□□

□

□

□□



alcanzar un contenido total de humedad de 28%. Cada uno de los lotes empleados se empacó en bolsas de polietileno y se almacenaron a 4 °C por 12 h para asegurar el equilibrio de la humedad. Después, las muestras se atemperaron a 25 °C por 3 h, previo a ser sometidas al proceso de extrusión.

El proceso de extrusión se llevó a cabo en un extrusor de tornillo simple modelo 20DN (CW Brabender Instruments, Inc, NY, EUA). Antes de iniciar el proceso, todas las piezas del equipo que entrarían en contacto con el producto durante la extrusión se sometieron a un exhaustivo lavado de forma secuencial con soluciones de jabón enzimático, hidróxido de amonio, etanol de 96°, y finalmente, agua destilada. Para el proceso, se aplicaron las siguientes condiciones: Velocidad del tornillo (VT) de 124 rpm; un contenido de humedad de alimentación (CH) de 28 % p/v; temperatura uniforme a lo largo del cilindro y en el dado de salida (TE=temperatura de extrusión) de 130 °C. El producto extrudido se colectó en charolas de aluminio perforadas para enfriarse y posteriormente someterse a un proceso de secado en una estufa con circulación forzada de aire a 50 °C durante 12 h. El material seco obtenido se molturó (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp, Boulder, CO, EUA) hasta alcanzar un tamaño de partícula capaz de atravesar una malla 60 (0.25 mm). La harina de amaranto extrudido se empacó en bolsas de polietileno y almacenó a -80 °C hasta su posterior utilización.

## **2 Obtención de los alérgenos**

### **a Desgrasado de las harinas de amaranto**

Las harinas de amaranto se molturaron en un mortero hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula aún más fino. Después, estas muestras se transfirieron a tubos de 50 mL y se les agregó acetona en una proporción 1:10 (p:v) para luego incubarse a 4°C durante 16 h con agitación a 150 rpm. Posteriormente, las muestras se centrifugaron ( $16,000 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/20 \text{ min}$ ) para retirar la acetona por decantación y secar las muestras a temperatura ambiente durante 16 h.

### **b Extracción de proteína total**

Se utilizó un kit de extracción de proteínas totales vegetales (Sigma-Aldrich, Cat. PE0230) a fin de extraer la proteína total de las harinas de amaranto crudo y extrudido, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit contiene inhibidores de proteasas ayudado a prevenir que las proteínas se degraden en el proceso de extracción. Además, contiene agentes caotrópicos (tio-urea) para de incrementar el rendimiento de extracción.

Los pasos de la extracción se realizaron manteniendo todos los reactivos en hielo molido para evitar la formación de precipitados. Se transfirieron 100 mg de las muestras desgrasadas en un vial de 2 mL previamente pesado y se agregaron 1.5 mL de metanol. Las muestras se agitaron en vortex durante 30 s e incubaron a  $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$  por 5 min; después se centrifugaron ( $16,000 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/5 \text{ min}$ ). Se descartó el sobrenadante y se repitieron los pasos dos veces más (desde la adición de metanol). Posteriormente,

se repitió la misma operación, pero con la adición 1.5 mL de acetona en lugar de metanol. Luego de retirar el sobrenadante de acetona, los viales con las muestras se sometieron a secado a temperatura ambiente por 10 min. Después, los viales con las muestras se pesaron y se calculó la masa por diferencia con el peso de los viales registrados en un inicio. Se agregaron 4  $\mu$ L de reactivo 4 (reactivo caotrópico incluido en el kit) por cada mg de las muestras recuperadas. Después, las muestras agitaron (300 rpm/25 °C/30 min) y después centrifugaron (16,000 x g/4 °C/5 min). Se recuperó el sobrenadante que contenía la proteína total, y se cuantificó la proteína soluble mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

### **c Fraccionamiento por clasificación Osborne**

Se llevó a cabo una extracción secuencial de albúminas, globulinas y prolaminas a partir de las harinas de amaranto crudo y extrudido (**Figura 9**), de acuerdo a la clasificación de Osborne (1924). Las muestras de las harinas se desgrasaron empleando un tratamiento con acetona en una relación 1:10 (p/v) a 4 °C durante 16 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (16,000 x g/4 °C/20 min) y decantadas para la eliminación del sobrenadante. Los residuos de acetona se eliminaron mediante secado con aire (36 °C/12 h). Después, las muestras se sometieron a solubilizaciones secuenciales (100 mg/mL) con duraciones de 1 h en agitación, ya sea en agua destilada (albúminas), 50 mM de Tris-HCl pH = 8 (globulinas), y etanol al 70% (prolaminas), respectivamente. Después de cada solubilización, las suspensiones se centrifugaron (16,000 x g/4 °C/20 min) para recuperar el sobrenadante y someterlo a diálisis contra agua desionizada en membranas de 1,000 Da.





### **3 Electroforesis SDS-PAGE**

#### **a Preparación y corrida de los geles**

Las fracciones proteínicas obtenidas de las harinas se caracterizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 15% (**Cuadro 3**). En el carril **M** (**Figura 10A**) se cargaron 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de amplio rango (SIGMA, Cat. S8445). En los carriles **1-6** se cargaron 20  $\mu$ L de las muestras a evaluar (**Figura 10A**). La electroforesis se corrió a un voltaje inicial de 70 V durante los primeros 10 min, seguido de 2 h a 200 V (**Figura 10B**), en un sistema mini-protean (**Figura 10C**) de la marca BioRad. Como solución amortiguadora de corrida se empleó tris-glicina con SDS al 0.1% a un pH de 8.3.

#### **b Lavado y fijación de geles SDS-PAGE**

Una vez que la electroforesis fue finalizada, cada uno de los geles se depositaron individualmente en recipientes de cristal y se lavaron tres veces consecutivas con aproximadamente 300 mL agua destilada, manteniendo los geles en agitación ligera durante 5 min. Posteriormente, los geles se fijaron empleando una solución de metanol/agua destilada/ácido acético en una proporción 50%/40%/10%, sometiendo en agitación ligera durante 30 min.

#### **c Tinción de geles SDS-PAGE**

Para llevar a cabo la tinción de los geles, primeramente, se retiró por decantación la solución de fijación. Posteriormente se agregaron 80 mL de la solución de tinción Bio-Safe Coomassie stain (BIO-RAD, Bio-Safe Coomassie G-250 Stain, Cat.

**Cuadro 3.** Fórmula empleada en la elaboración de los geles de concentración y de separación, en los geles de poliacrilamida. Las cantidades de reactivos se han calculado para la fabricación de dos geles.

Reactivo	Gel de concentración	Gel de separación
	8%	15%
dH <sub>2</sub> O	3.646 mL	2.82 mL
Acrilamida/bis-acrilamida 30%	830 µL	6 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	N/A	3 mL
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	420 µL	N/A
SDS 10%	50 µL	120 µL
APS 10%	50 µL	60 µL
TEMED	10 µL	6 µL

N/A: No aplica



161-0786) al gel contenido dentro del recipiente y mantenidos durante 4 h en agitación ligera.

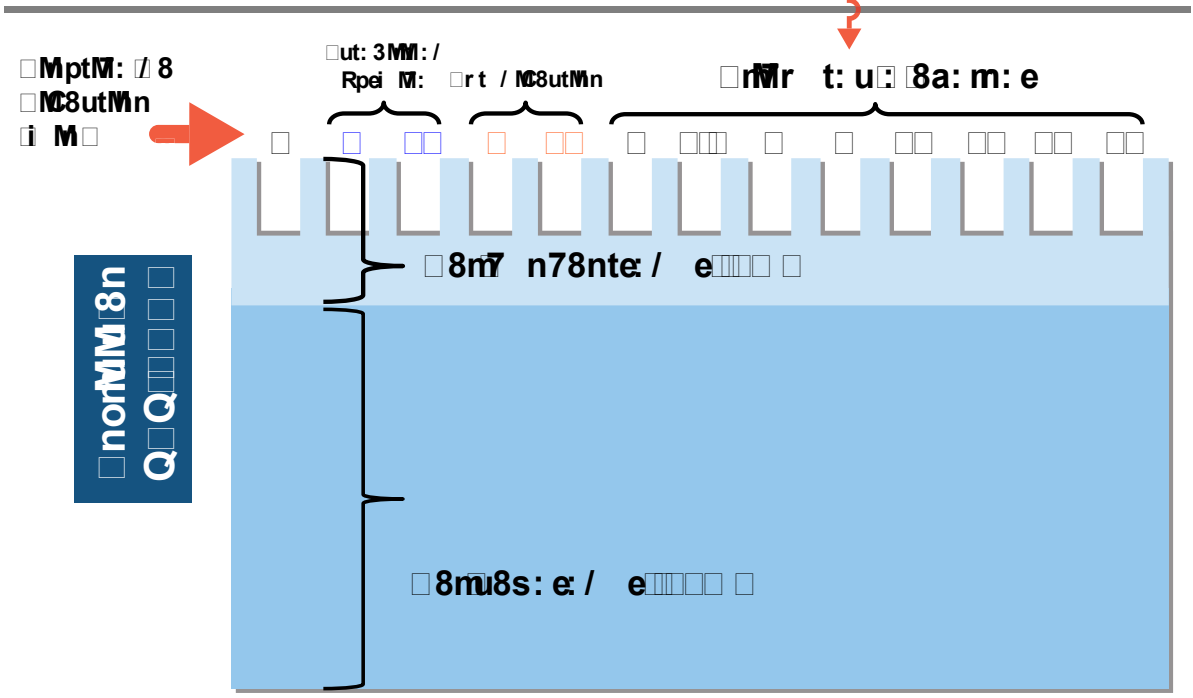
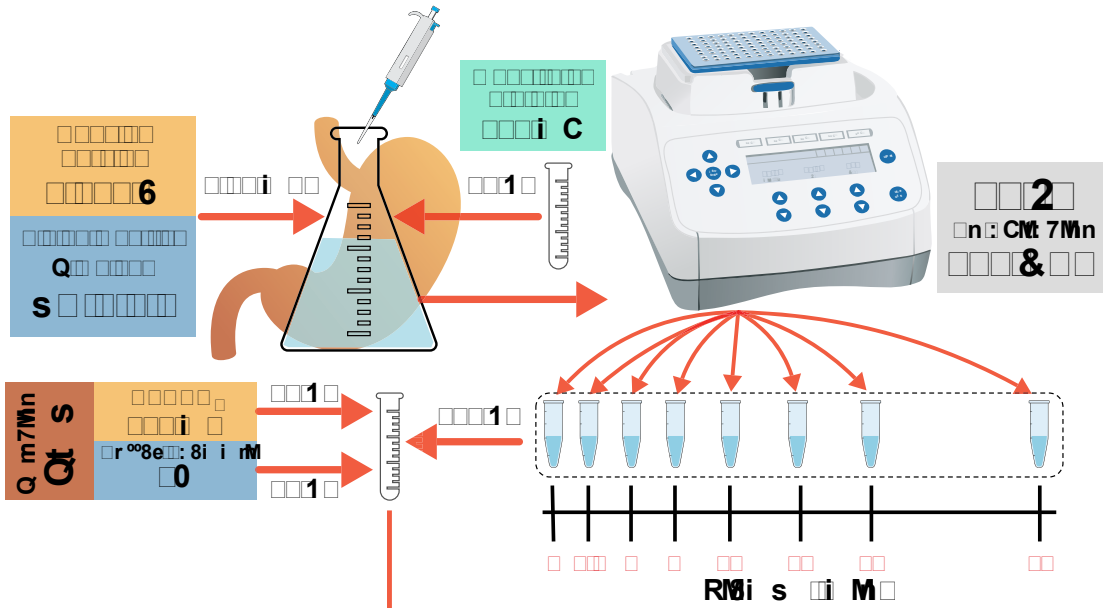
#### **d Desteñido de los geles SDS-PAGE**

Para proceder a retirar el exceso de tinción de los geles y revelar las bandas visibles, los geles se sometieron a tres lavados consecutivos con agua destilada y desteñidos con una solución de agua desionizada/metanol/ácido acético en una proporción 65%/30%/5%.

#### **4 Evaluación de la digestibilidad gástrica simulada**

Las evaluaciones de la digestibilidad gástrica de las fracciones proteínicas se llevaron a cabo acorde a la metodología descrita por Thomas y col. (2004) con algunas modificaciones (**Figura 11**). Primeramente, se prepararon soluciones de la proteína total y de las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto crudo y extrudido a una concentración de 5 mg/mL. Para el ensayo de digestibilidad, se agregaron 60 µL de la solución proteica de las muestras (300 mg de proteína) en un vial que contenía 1.14 mL de fluido gástrico simulado (FGS: HCl 0.084 N, NaCl 35 mM, pH 1.2) y 3,000 U de pepsina (Sigma, Cat. P-7000) (10 U de actividad de pepsina/µg de proteína). La solución de FGS se calentó previamente a 37°C durante 5 min antes de agregar la solución de las muestras de proteína. Una vez agregadas las proteínas, el contenido del vial se mezcló mediante agitación ligera e inmediatamente se colocó en baño maría a 37 °C. Se tomaron muestras de 100 µL a los tiempos 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30 y 60 min después del inicio de la incubación y a fin de detener la reacción se agregaron 35 µL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> 200 mM, pH 11.0, y 35 µL de buffer Laemmli 5X (glicerol

□



□

□ **dgi** □□□□□□ hu. ep ) (s) 4 ) r ) eP)r. ) It éy (ge r) (toehdattg) g oñhél) (ge s4n(y) h□□□□

) 4 ) gm4ge sehmp mel. r) 4□

□

□

□□

40%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 10%, Tris 0.33 M, azul de bromofenol 0.05%, pH 6.8) (Laemmli 1970). Para la preparación del tiempo 0 en las muestras de digestión, en la mezcla de FGS previamente se inactivó la pepsina mediante la adición de la solución de  $\text{NaHCO}_3$  200 mM, pH 11, y de buffer Laemmli 5X y posteriormente se agregó la solución de la de proteínas a evaluar al vial del ensayo. Adicionalmente, se incluyeron controles de autodigestión de la pepsina (FGS/con pepsina/sin proteína) y de estabilidad térmica de la proteína evaluada (FGS/sin pepsina/ con proteína), los cuales se prepararon de la misma forma, pero solo se incluyeron los tiempos 0 y 60 min. Una vez detenida la reacción, las muestras se sometieron a calentamiento a 95 °C por 10 min y analizaron mediante SDS-PAGE en geles al 15% con las condiciones previamente descritas (**Cuadro 3**).

## **5 Determinación de la cantidad de proteína soluble**

La cuantificación de proteína soluble en las muestras se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), empleando un kit comercial (Pierce™ BCA, Cat. 23227). Este se basa en la reacción de biuret, en la que se produce la reducción de iones de cobre ( $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ ) por parte de la proteína en un medio alcalino, presentando una selectividad y sensibilidad adecuada para la detección espectrofotométrica del catión  $\text{Cu}^{+1}$  mediante el uso del BCA (Smith y col 1985). El desarrollo de color es dependiente la estructura molecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la presencia de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano, y de los aminoácidos azufrados cisteína y cistina (Wiechelman y col 1988). Aunque, éste no es un método de punto final, al incubar las mezclas de reacción a una temperatura de 37 °C, estas desarrollan paulatinamente un color púrpura, el cual puede ser monitoreado

espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm, lo cual permite la cuantificación de muestras con la ayuda de una curva estándar de concentraciones conocidas.

Las evaluaciones con este método se realizaron en apego al protocolo descrito por el fabricante. La preparación de la curva estándar (**Cuadro 4**) se llevó a cabo con albúmina sérica bovina incluida en el kit (stock: 2 mg/mL). Para llevar a cabo las cuantificaciones, se emplearon microplacas de 96 pozos donde el rango de trabajo para la curva fue de 5-250  $\mu\text{g/mL}$ . Todas las muestras y los puntos de la curva estándar se analizaron por duplicado. Las proteínas analizadas y los puntos de la curva estándar fueron disueltas en PBS pH 7.4 (SIGMA; Cat. P-5368) y se prepararon diluciones seriadas de dichas proteínas a fin de asegurar que las concentraciones cayesen en el rango de trabajo. El reactivo de trabajo se preparó mezclando los reactivos A:B del kit en una proporción 50:1, obteniéndose un reactivo de color verde que al interactuar con la proteína de las muestras genera un viraje a color púrpura. Posteriormente, se colocaron 25  $\mu\text{L}$  de la curva estándar y las muestras de proteína a evaluar (con sus respectivas diluciones) en una microplaca. Después, a cada pozo con las muestras o puntos de la curva estándar se les agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo y la microplaca se agitó suavemente por 30 s. A continuación, se procedió a incubar la microplaca en oscuridad a 37 °C por 30 min, seguido de 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, la absorbancia se midió a 540 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific. Cat. 51119000). Para la determinación de las concentraciones, se utilizaron las ecuaciones obtenidas después de realizar una regresión lineal de la concentración conocida de los puntos de la curva contra su absorbancia medida a 540 nm.

**Cuadro 4.** Preparación de curva estándar para la determinación de proteína soluble mediante el método del ácido bicinconírico

Vial	Volumen del diluyente <sup>A</sup> (μL)	Volumen de BSA (μL)	Concentración final de BSA (μg/mL)
<b>A</b>	700	100 del stock <sup>B</sup>	250
<b>B</b>	400	400 del vial A	125
<b>C</b>	450	300 del vial B	50
<b>D</b>	400	400 del vial C	25
<b>E</b>	400	100 del vial D	5
<b>F</b>	400	No requerido	0 <sup>C</sup>

**BSA:** Albúmina sérica bovina

<sup>A</sup>PBS pH 7.4; <sup>B</sup> Concentración de 2 mg/mL; <sup>C</sup>Blanco



## 6 Análisis *in silico*

Se llevó a cabo el análisis *in silico* de proteínas representativas de albúminas y globulinas del amaranto crudo. Para ello, primeramente, se realizó una búsqueda en las secuencias lineales (estructura primaria) de las proteínas en formato FASTA en la base de datos UniProtKB (UniProtKB 2019), empleando la estrategia de búsqueda (“amaranth albumin”). Primeramente, se realizó un análisis de inmunogenicidad *in silico* utilizando la herramienta Predicting Antigenic Peptide (Inmunomedicine Group 2019). Este análisis se basa en el algoritmo desarrollado por Kolaskar y Tongaonkar (1990) en el cual se analizan las secuencias proteínicas de las proteínas que se presumen alergénicas y se comparan las zonas inmunogénicas prevalentes de proteínas que se saben alergénicas. Posteriormente, los análisis bioinformáticos se realizaron en el sitio web Expasy (Expasy 2019), donde se llevó a cabo un análisis de simulación *in silico* de digestión con pepsina a un pH 1.3, utilizando la herramienta Peptide cutter, a fin de determinar los epítopes persistentes después de la simulación digestión *in silico*.

## 7 Evaluación de potenciales de sensibilización y alergénicos

### a Animales y aspectos éticos

Para todos los bioensayos se utilizaron ratones hembra BALB/c, completamente libres de patógenos (**Figura 12**), con una edad de 4 a 5 semanas, un peso corporal aproximado de 25 g, cuidando que fueran criados y alimentados con una dieta libre de amaranto por al menos dos generaciones. Los animales se adquirieron con la compañía Bioinvert (Ecatepec, Estado de México, México). El agua y el alimento estuvo disponible *ad libitum* y durante el periodo de ejecución todos los experimentos



- Sexo:** Hembras
- Cepa:** BALB/C
- Edad:** 4-6 semanas
- Cuidados:** Libres de patógenos
- Dieta:** Libre del alérgeno a evaluar, por al menos 2 generaciones
- Agua y alimento:** *Ad libitum*
- Ciclo de luz/oscuridad:** 12 h

**Figura 12.** Animales empleados para los bioensayos.

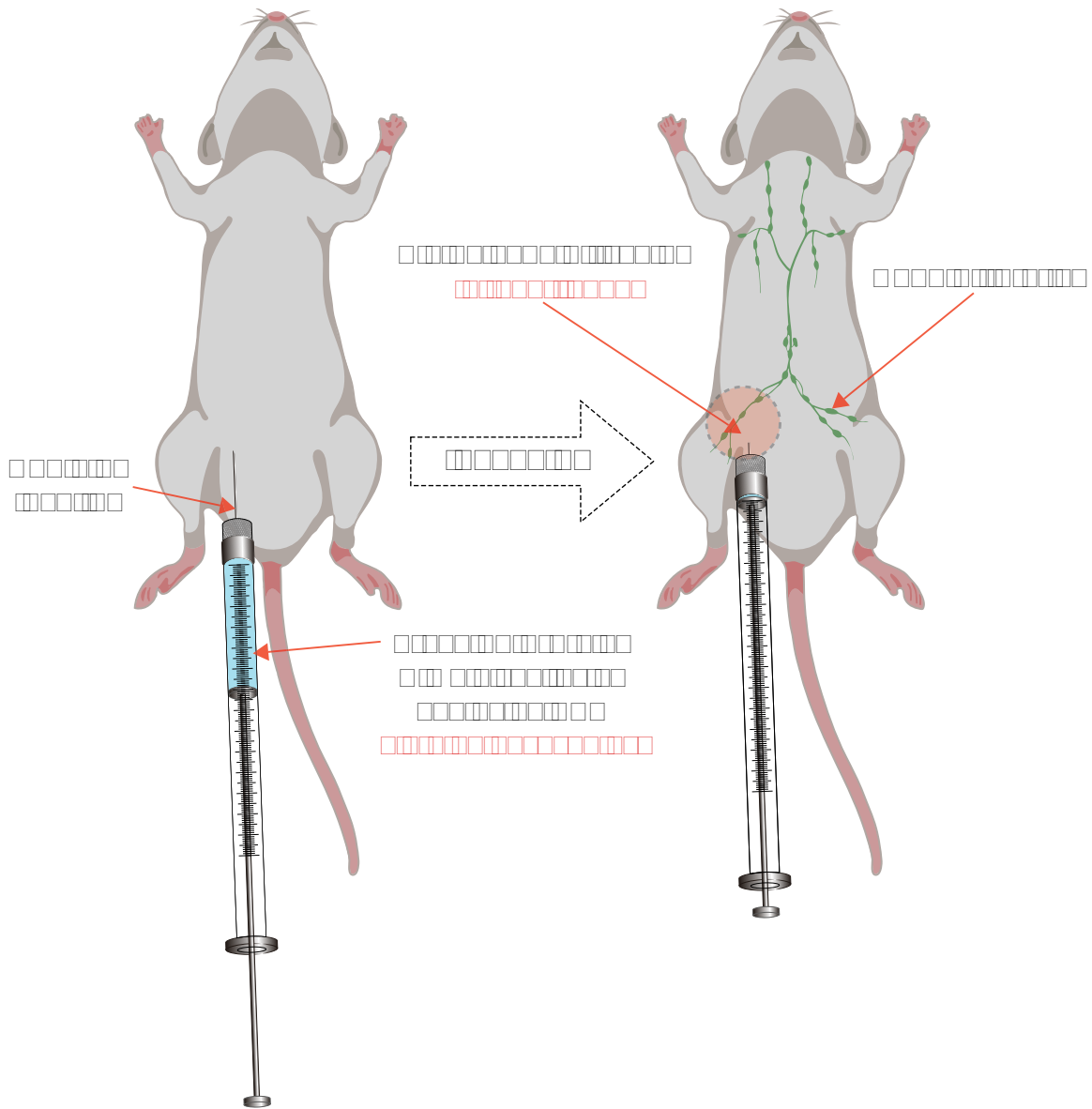
estuvieron sujetos a una dieta libre de amaranto. La temperatura del ambiente se mantuvo a 25 °C con una humedad relativa entre 45 y 55 % con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Todos los experimentos realizados en los animales se aprobaron por el H Comité de Ética, Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa (No. Aprobación: CE-UACNyG-2014-JUL-001).

### **b Preparación de los alérgenos de referencia**

Se utilizó ovoalbúmina (OVA, pureza  $\geq$  98%, Sigma-Aldrich, Cat. A5503) y fosfatasa ácida de papa (FAP, 0.5–3.0 unidades/mg, Sigma-Aldrich, Cat. P3752) como alérgenos e hipoalérgenos de referencia, respectivamente. Estos se diluyeron en PBS (pH 7.4) a fin de obtener soluciones de OVA (0.2 mg/mL) y de FAP (2.0 mg/mL). Estas concentraciones de proteína se evaluaron mediante el método de BCA (Smith y col 1985).

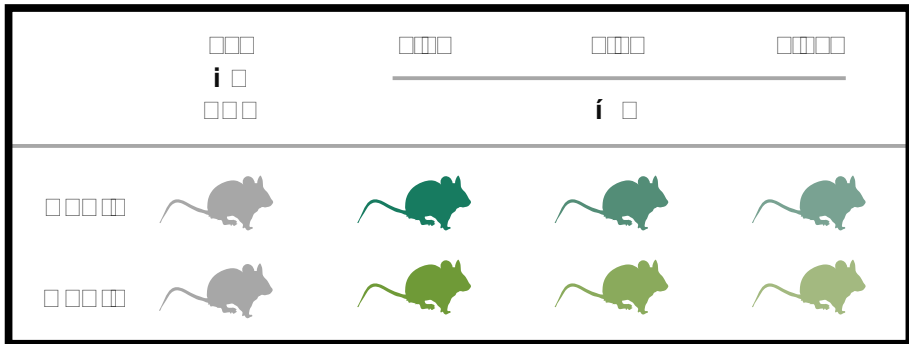
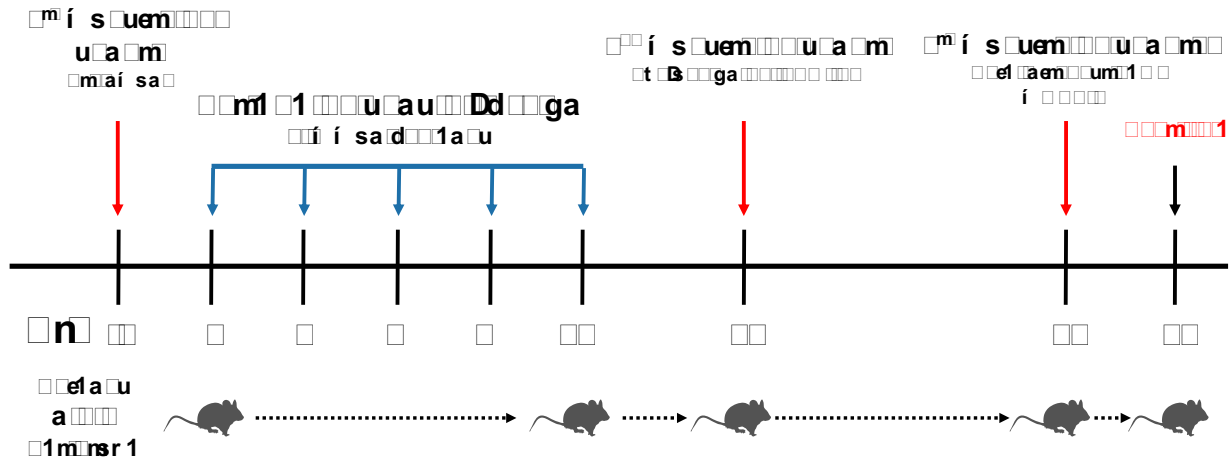
### **c Determinación de la mejor cantidad de proteína para lograr una sensibilización reproducible**

Para establecer las concentraciones adecuadas de las fracciones de albúminas y globulinas capaces de inducir una sensibilización reproducible en el modelo murino, grupos de 6 ratones se sensibilizaron de manera intraperitoneal (**Figura 13**) con 0.25, 0.5, o 0.025 mg de las fracciones proteicas disueltas en 0.25 mL de PBS (pH = 7.4) (**Figura 14**). Las inmunizaciones se llevaron a cabo los días 0, 3, 6, 9, y 12. Los animales no sensibilizados (grupo control) recibieron solamente solución PBS (pH = 7.4). Se colectaron muestras de sangre en los días 0 y 28, asimismo al día 35, una vez que se realizó el reto intragástrico con las fracciones proteicas.



□□□□□□□□ i b2jt jg4suj/ b j b5s. i p5mbi sd□□□□□ m u j/ b □sl m p5o° svms □2sqbs □vi □  
 m2rs 5r2□





2 6 2 E 2

□

□

□□

#### **d Protocolo de sensibilización de 28 días**

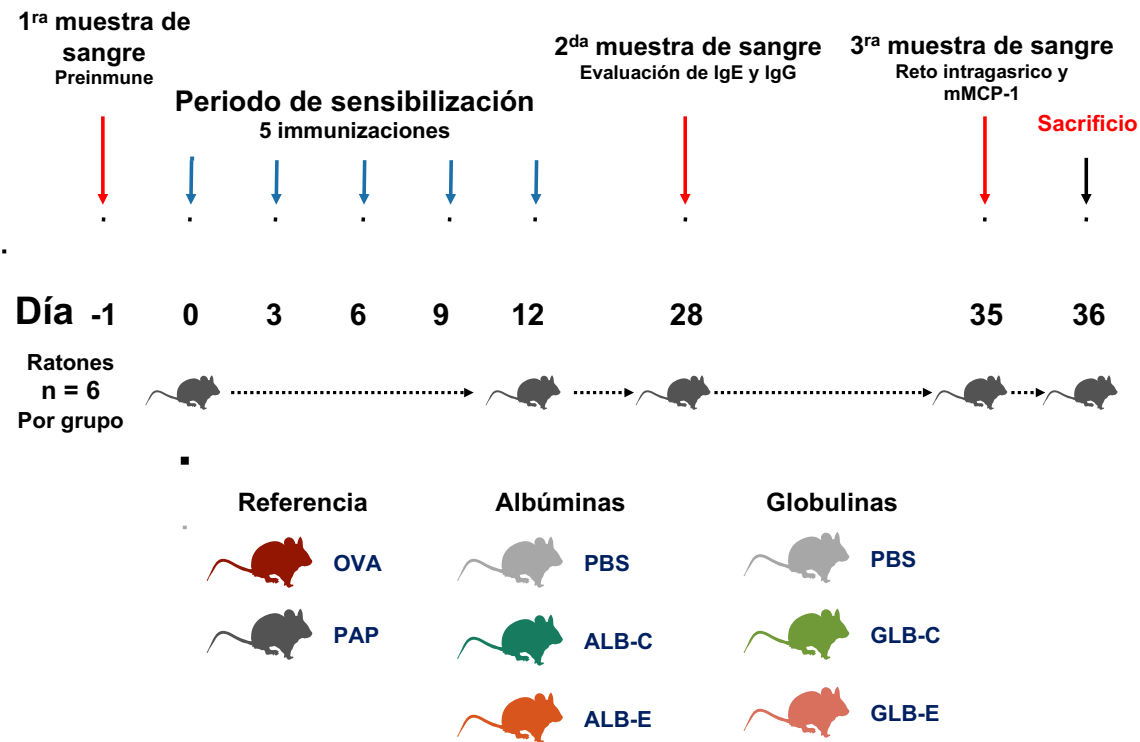
Una vez establecida la cantidad adecuada de las fracciones proteínicas de amaranto crudo capaces de inducir una sensibilización reproducible en el modelo murino, grupos de seis ratones se sensibilizaron de forma intraperitoneal con la cantidad de proteína disuelta en 0.25 mL de PBS (pH 7.4) (**Figura 15**). Las inmunizaciones se realizaron en los días 0, 3, 6, 9, y 12. Los animales no sensibilizados (grupo control) recibieron solamente PBS. Se colectaron muestras en sangre al inicio de los experimentos y después de 28 días, y al día 35 una vez que se realizó el reto intragástrico con la fracción proteica alergénica (**Cuadro 5**).

#### **e Reto intragástrico**

Con el objetivo de evaluar la fase efectora de la alergia alimentaria, los animales sensibilizados se sometieron a un reto intragástrico el cual consistió en la administración de 2.5 mg de las fracciones proteicas de amaranto, ovoalbúmina o fosfatasa ácida de papa disueltos en 250  $\mu$ L de PBS (**Figura 16**). Posteriormente, a los 30 min de haber realizado el reto intragástrico, se colectaron las muestras de sangre de la vena de la cola para realizar los análisis de anticuerpos IgE e IgG, y proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1) como un indicador indirecto de actividad de mastocitos.

#### **f Toma de muestra de sangre y sacrificio de animales**

En cada toma de muestra fue obtenido de la vena de la cola de los ratones un volumen de sangre de 100-150  $\mu$ L. Las muestras se dejaron coagular toda la noche a



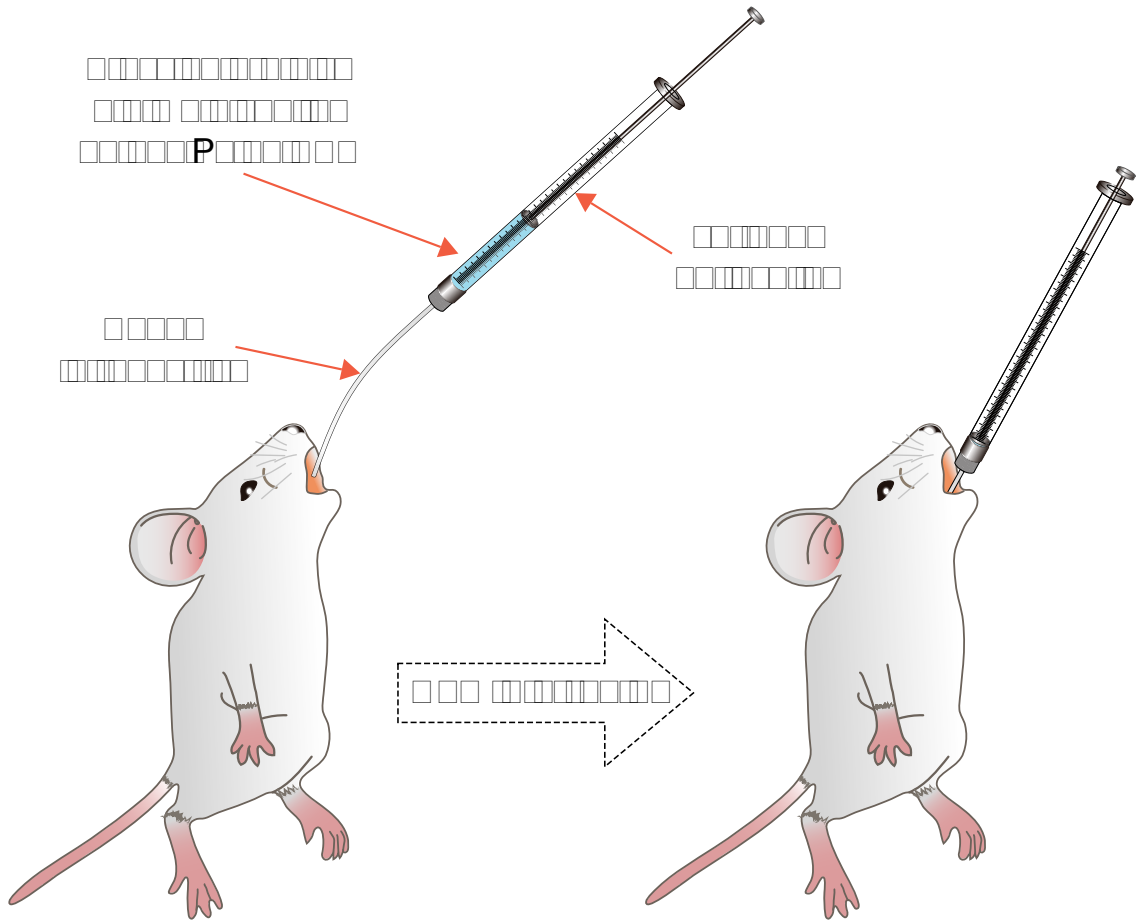
**Figura 15.** Esquema de sensibilización intraperitoneal con las fracciones proteínicas alergénicas en el modelo murino con ratones BALB/c. **OVA:** Ovoalbúmina; **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **ALB-C:** Fracción de albúminas de amaranto crudo; **ALB-E:** Fracción de albúminas de amaranto extrudido; **GLB-C:** Fracción de globulinas de amaranto crudo; **GLB-E:** Fracción de globulinas de amaranto extrudido; **mMCP-1:** Proteasa 1 de los mastocitos de ratón.

**Cuadro 5.** Esquema de sensibilización intraperitoneal con las fracciones proteicas alergénicas en el modelo murino con ratones BALB/c.

<b>Grupo</b>		<b>Sensibilizado a</b>	<b>Retando con</b>
<b>Referencias</b>		OVA (proteína alergénica)	OVA
		FAP (proteína hipoalergénica)	FAP
	<b>Evaluación</b>		
<b>Control</b>		PBS	Proteína de amaranto <b>crudo</b>
	Alergenicidad intrínseca	Proteína de amaranto <b>crudo</b>	Proteína de amaranto <b>crudo</b>
<b>Albúminas</b>	Alergenicidad intrínseca	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>
	Alergenicidad residual	Proteína de amaranto <b>crudo</b>	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>
<b>Control</b>		PBS	Proteína de <b>amaranto crudo</b>
	Alergenicidad intrínseca	Proteína de amaranto <b>crudo</b>	Proteína de amaranto <b>crudo</b>
<b>Globulinas</b>	Alergenicidad intrínseca	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>
	Alergenicidad residual	Proteína de amaranto <b>crudo</b>	Proteína de amaranto <b>extrudido</b>

**OVA:** Ovoalbumina; **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos.





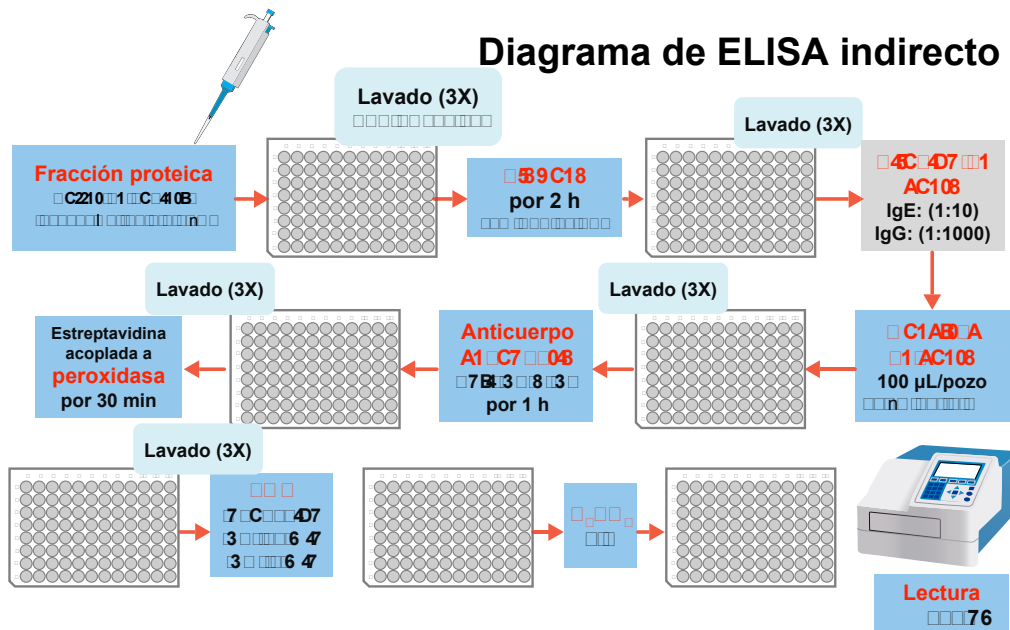
Placeholder boxes and a large '6 cE' are located below the diagram.

4 °C y posteriormente se centrifugaron (1,500xg /4°C/15 min). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Una vez que se extrajeron las muestras de sangre los animales se sacrificaron por dislocación cervical, de acuerdo con el protocolo del H Comité de Ética, Unidad Académica de Ciencias de la Nutrición y Gastronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa (No Aprobación: CE-UACNyG-2014-JUL-001).

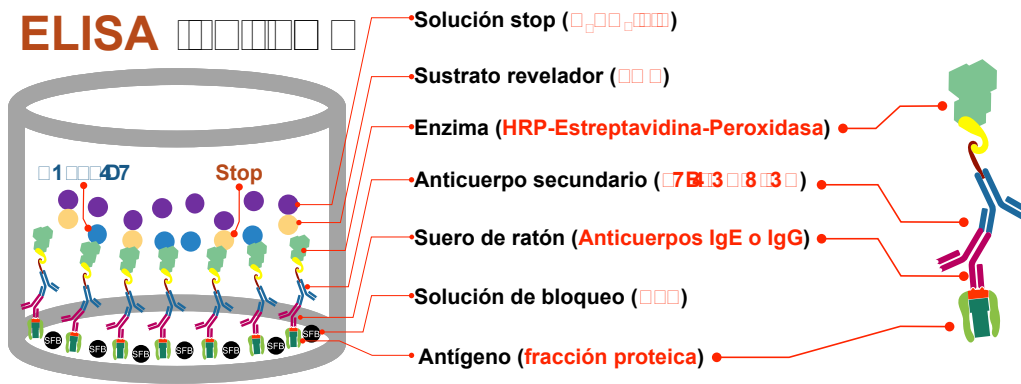
### **g Evaluación de Anticuerpos IgE e IgG**

Los anticuerpos IgE e IgG específicos a las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto, ovoalbúmina o fosfatasa ácida de papa se determinaron mediante ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, acrónimo en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Para la realización del ensayo (**Figura 17**), microplacas de 96 pozos se cubrieron con 20 µg de albúminas o globulinas en 100 µL de buffer de cubierta pH 9.5 (NaHCO<sub>3</sub> 0.099 mol/L; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.033 mol/L) e incubaron por 18 h a 4 °C. Las placas se lavaron (200 µL/pozo) con una solución de PBS pH 7.4 (NaCl 0.1368 mol/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.0081 mol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0014 mol/L; KCl 0.0026 mol/L) / Tween 20 (FagaLab, Cat. 2377) al 0.05% y bloquearon por 2 h con una solución de suero fetal bovino al 10% en PBS pH 7.4. Las muestras de suero de los ratones se diluyeron (1:10 y 1:1000, para IgE e IgG, respectivamente) con solución de bloqueo (suero fetal bovino al 10% en PBS pH 7.4). Volúmenes de 100 µL de los sueros diluidos se colocaron en los pozos de las microplacas y se dejaron incubar toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las placas se lavaron por triplicado y se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-IgEa (BioLegend. Cat. 408804) o anti-IgG (BioLegend. Cat. 405303) de ratón acoplado a biotina diluido en una proporción 1:250 en solución de bloqueo

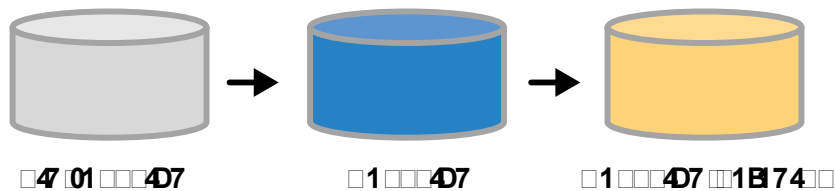
## Diagrama de ELISA indirecto



## ELISA



## Desarrollo de color en ensayo de ELISA



6 cE /c %cSfy d u cy0Sxu, ( p5 m u m Spy0c c5 qcSSpyu5(, p0zyfSc5 d u cCc,cy0 Cul fcy0 c( ,xu. c d u Rr fcm,cCc d u 0x7 d u c( ,xu. c Rr fyl f,uS0 xyl cCuy0 d u c( ,xu. c d u Rr fyl f,uS0 u5c, p p ScC. fp5 l u Spp,cSfy d x,cy0 c,ucSSfy d u Rr fyl f,uS0

(concentración final de 2 µg/mL). Las placas se incubaron (25°C/ 01 h) y subsecuentemente se lavaron por triplicado. Después, se agregaron 100 µL por pozo de conjugado de estreptavidina/peroxidasa de rábano (BioLegend, Cat. 405210) a una dilución 1:1000 en solución de bloqueo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 30 min y, después, se lavaron seis veces. Posteriormente se agregaron 100 µL por pozo de sustrato TMB (Thermo Scientific, Cat. 34028). Las placas se incubaron en oscuridad (por 30 min y 3 min, para IgE e IgG, respectivamente) para permitir el desarrollo de color. La reacción se detuvo agregando 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific, Cat. 51119000). Todos los sueros se analizaron por duplicado.

#### **h Evaluación de mMCP-1 en suero**

La proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1) es un indicador de la degranulación de estas células, por lo que se usa como un marcador de la fase efectora de las alergias alimentarias. La concentración sérica de mMCP-1 en suero de los ratones se evaluó empleando un kit comercial mMCP-1 ELISA kit (BioLegend, Cat. 432702) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (**Figura 18**). La concentración de proteasa 1 de mastocitos (mMCP-1) en suero se evaluó mediante el kit comercial mMCP-1 ELISA kit (BioLegend, Cat. 432702) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve, el anticuerpo de captura se diluyó 1:200 en buffer de cubierta y se agregó un volumen de 100 µL por cada pozo y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron (cuatro veces) con 300 µL de buffer de lavado. Las placas se bloquearon con suero fetal bovino al 10% por 2 horas a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las placas se lavaron (cuatro veces) y se agregaron por duplicado 100 µL del estándar



de mMCP-1 (siete diferentes concentraciones 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 pg/mL) (**Cuadro 6**) y las muestras a evaluar. Las placas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente y después se lavaron nuevamente (cuatro veces). Posteriormente se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección y se incubó de nuevo durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente en 4 ocasiones y a cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ L del complejo Avidina-HRP. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente las placas se lavaron (seis veces). Después, se agregaron 100  $\mu$ L del sustrato TMB y se incubó en oscuridad durante 15 min. La reacción se detuvo agregando 100  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  2N y la absorbancia se leyó a 450 nm.

## **8 Análisis estadístico**

Se integraron grupos de seis ratones/tratamiento. Los datos se analizaron usando GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se usó la prueba de Kolmogorov–Smirnov a fin de comprobar la normalidad de los datos. Los datos con una distribución normal se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Tukey para determinar diferencias en las comparaciones de múltiples grupos, En las comparaciones de pares de grupos se empleó la prueba t-student. En los datos que no presentaron una distribución normal, se usó la prueba de Kruskal-Wallis para determinar la existencia de diferencias entre grupos, y la prueba de Dunn para determinar los grupos donde hubo diferencias. Para la comparación entre pares de grupos se empleó la prueba U de Mann-Whitney. Los datos distribuidos normalmente se expresaron como medias y desviaciones estándar. Los datos que no siguieron una distribución normal se expresaron como medianas y rangos intercuartílicos.

**Cuadro 6.** Preparación de curva estándar para la determinación de mMCP-1 en suero.

<b>Vial</b>	<b>Volumen del diluyente* (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Volumen de estándar de mMCP-1 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentración final de mMCP-1 (<math>\text{pg/mL}</math>)</b>
	200	16 ng liofilizado	80,000
<b>A</b>	500	50 del stock 80,000 $\text{pg/mL}$	4,000
<b>B</b>	500	500 del vial A	2,000
<b>C</b>	500	500 del vial B	1,000
<b>D</b>	500	500 del vial C	500
<b>E</b>	500	500 del vial D	250
<b>F</b>	500	500 del vial E	125
<b>G</b>	500	500 del vial F	62.5

\*SFB 10%

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A EXTRACCIÓN DE FRACCIONES PROTEÍNICAS

En La **Figura 19** se muestran los resultados del contenido de proteína cruda total evaluada mediante el método de Kjeldahl (Método 46-11A) (AACC 1999) y las cantidades extraídas de las fracciones proteínicas de albúminas y globulinas de amaranto crudo y extrudido de acuerdo con la metodología de Osborne (1924). Los resultados mostraron que la cantidad de proteína cruda total de amaranto crudo fue de 22.87 g/100 g de harina base seca (BS), mientras que la de amaranto extrudido fue de 21.01 g/100 g de harina BS, en las cuales no se encontró una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ). No obstante, en cuanto a la cantidad de las fracciones de albúminas y globulinas extraídas, se obtuvieron cantidades significativamente mayores ( $P < 0.05$ ) en el amaranto crudo en comparación del amaranto extrudido. Lo anterior se tradujo en un rendimiento de extracción del 26% para el amaranto crudo y 15.6% en el caso del amaranto extrudido. Con respecto a esto, existen estudios donde se han reportado rendimientos de extracción con valores por encima del 80% (Tapia-Blácido 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con lo reportado por estos autores, no obstante, las muestras de las fracciones de albúminas y globulinas obtenidas de amaranto crudo y extrudido confieren una representatividad del total de las proteínas presentes en el grano.

El menor rendimiento de extracción en las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto extrudido puede deberse a los fenómenos de gelatinización-retrogradación del almidón contenido en las harinas. El hecho de que el proceso extrusión implica un

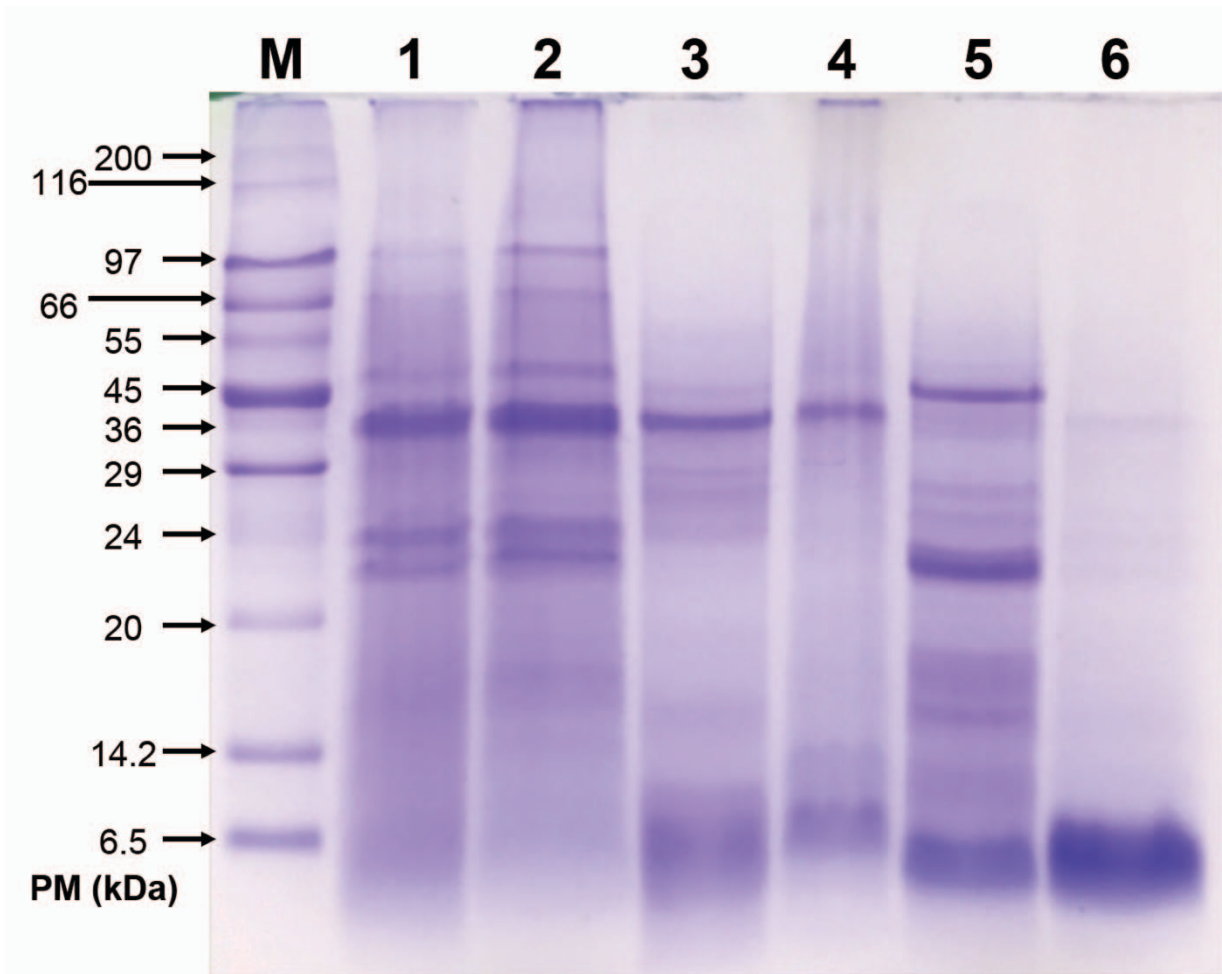




incremento en la temperatura de la masa que circula a través del barril que en combinación con la humedad de la masa pre-acondicionada pueden inducir a que se presente la pre-gelatinización del almidón y su posterior retrogradación. Así, la formación de cristales de almidón insolubles en agua pudo haber atrapado a las proteínas, imposibilitando que estas fueran extraídas en las fracciones de albúminas o de globulinas (Cabrera-Chávez y col 2012).

## **B ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE (**Figura 20**) con el objetivo de evaluar los cambios que se pudieran suscitar por efecto del proceso de extrusión. En el carril **M** se depositó un marcador de pesos moleculares de amplio rango (SIGMA, Cat. S8445), con pesos moleculares que van desde los 6.5 kDa hasta los 200 kDa. En la **Figura 20** se depositaron los extractos de proteína total, tanto de amaranto crudo como extrudido, respectivamente. En los resultados de la electroforesis SDS-PAGE no se observaron cambios en el patrón del perfil electroforético, ya que se apreció la presencia de las mismas bandas en ambos carriles. Sin embargo, las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto presentaron cambios después del proceso de extrusión (**Figura 20**). En general, las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto crudo tenían más bandas de proteínas que las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto extruido. De este modo, las bandas de proteínas de 24 a 29 kDa, que son visibles en albúminas de amaranto crudo, no se detectaron después del proceso de extrusión. De manera similar, la mayoría de las bandas de proteína en la fracción de globulinas de amaranto crudo entre 14.2 y 45 kDa no fueron visibles en el gel de electroforesis en la fracción de globulinas de amaranto extruido. En estudios previos



BLE  7-o-lipo  m  z  b-x  n  b  t  o  q  ó-bzoér  z  z  q  t  o  q  g  l-r  m  é  o  g  ó-bzoér  m  r  g  t  o   
 r  v  r -r  é  z  m  y  t  b  í  o  A  z  y  t  ú  b  r - u  p  g  r - m  t  b - t  o  ó  g  b  v  b  o  m  y  t  o  r  v  ó  p - é  a  b   
 7-bzoér  z  z  q  t  o  r  v  r -r  é  z  m  y  t  b  7-bzoér  z  z  q  t  o  r  v  r -r  é  z  o  A  z  y  t  ú  b   
-r  m  é  t  o  r  o  v  é  r  g  t  o  r  v  r -r  é  z  m  y  t  b -r  m  é  t  o  r  o  v  é  r  g  t  o  r  v  r -r  é  z   
 o  A  z  y  t  ú  b -r  m  é  t  o  a  p  e  y  é  r  g  t  o  r  v  r -r  é  z  m  y  t  b -r  m  é  t  o  a  p  e  y  é  r  g  t  o   
 r  v  r -r  é  z  o  A  z  y  t  ú  b

se observó que, de manera similar, en las proteínas de granos de lupino sometidos al proceso de extrusión, se observaron modificaciones en el patrón electroforéticos de las proteínas de este grano (Álvarez-Álvarez y col 2005).

Estas discrepancias dadas en cuanto a la disminución en el número de bandas después de la extrusión en las fracciones de albúminas y globulinas, pero no en la proteína total podría estar relacionada con el método de extracción. Para las proteínas totales se involucraron compuestos caotrópicos y reductores que aseguran una solución completa de proteínas independientemente del procesamiento. No obstante, la extracción de la fracción proteínica solo involucró el uso de agua y TRIS-HCl (pH = 8), sin el uso de agentes caotrópicos ni reductores, en apego a la definición de fracciones de albúminas y globulinas, respectivamente (Osborne 1924). De manera general, los resultados soportan la noción de que algunas proteínas del amaranto pueden perder su solubilidad en soluciones acuosas después del proceso de extrusión (Cabrera-Chávez y col 2012), esto evidenciándose en el hecho de que en el patrón electroforético también se disminuya el número de bandas de proteínas.

## **C EVALUACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD GÁSTRICA SIMULADA**

Las evaluaciones de digestión gástrica simulada forman parte de las determinaciones de alergenicidad de nuevas proteínas producidas mediante modificaciones genéticas y de nuevos alérgenos descubiertos (FAO/WHO 2001), donde las proteínas del amaranto tienen cabida, dada la presentación de diversos casos de alergia alimentaria. Además, estas evaluaciones de digestión gástrica simulada son una primera evaluación de la alergenicidad, según las directrices de las

Farmacopeas Americana y Europea. En el presente estudio se determinó la digestibilidad gástrica de la proteína total (**Figura 21**) y de las fracciones de albúminas (**Figura 22**) y globulinas (**Figura 23**) de amaranto crudo y extrudido.

Como se puede observar, los resultados mostraron que tanto la proteína total (**Figura 21**), como las fracciones de albúminas (**Figura 22**) y globulinas (**Figura 23**) del amaranto mostraron una baja resistencia a la hidrólisis con pepsina a un pH de 1.2, donde a partir de los primeros 5 min de hidrólisis, la mayoría de las bandas desplegadas en los geles ya no eran perceptibles a simple vista. Sin embargo, se pudo observar que, en la fracción de albúminas de amaranto crudo y de extrudido, una banda de correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 36 kDa presentó una mayor resistencia a la hidrólisis, persistiendo esta inclusive después de 60 min de digestión gástrica simulada. Puesto que, en la digestión de la proteína total, los geles revelaron una banda persisten en el orden de los 36 kDa aproximadamente, de principio podría inferirse que esta banda pertenece a la fracción de albúminas, ya que los geles de la fracción de globulinas no mostraron un patrón donde esta banda permaneciera visible en el lapso que duró la digestión gástrica simulada. Por otra parte, en la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido, se observó una hidrólisis que alcanzó su totalidad después de los primeros 2 min de digestión, observándose una banda resistente a la digestión por debajo de los 6.5 kDa, donde a este nivel, estos fragmentos peptídicos no representan una relevancia inmunológica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio están en línea con lo reportado con diversos autores, quienes indican que el amaranto tiene una digestibilidad proteínica alta con valores de entre 85.5 a 89 % (Bressani y col 1993). No obstante, es









importante señalar que en el estudio de Kasera y col. (2013), se reportó que los principales alérgenos del grano de amaranto se encontraban en pesos moleculares que iban desde 16 hasta 45 kDa, aproximadamente.

Las directrices enmarcadas por la FAO (FAO/WHO 2001) indican que hasta el momento no se cuenta con una metodología considerada como estándar de oro en la evaluación de la alergenicidad de las proteínas. Sin embargo, la evaluación de la resistencia a la digestión gástrica adquiere relevancia, puesto que existe evidencia que, de manera general, una alta resistencia a la digestión proteolítica esta asociada con una mayor alergenicidad de las proteínas (Thomas y col 2004; Foster y col 2013; Lee y col 2013), puesto que los epítopes alergénicos, ya sea lineales o conformacionales, tendrían mayores probabilidades de sobreponerse ante una digestión gástrica.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos de en el presente estudio, dada la baja resistencia a la digestión gástrica de la proteína total y de las fracciones proteicas (albúminas y globulinas), y de la persistencia de una banda de las albúminas, son un indicativo de que el amaranto presenta una alergenicidad baja, pero que de igual manera se tiene que tomar en consideración, dados los casos de alergia alimentaria al amaranto que se han venido presentando recientemente (Kasera y col 2013; Pföhler y col 2015; Deluze y Beaumont 2017; Vaswani y col 2018).

## D ANÁLISIS *IN SILICO*

Los análisis bioinformáticos para la evaluación de potenciales alérgenos alimentarios y aéreos, así como la caracterización de probables epítopes es una herramienta que ha ayudado a explicar la especificidad ante alérgenos alimentarios, la reactividad cruzada entre diversos alérgenos en alimentos (Ashok Kumar y Venkatesh 2014; Kadam y col 2016). En el presente estudio, después de llevar a cabo la búsqueda con la estrategia mencionada (“amaranth albumin”), los resultados arrojaron a la proteína Invertasa Neutral/alcalina, con una longitud de 281 aminoácidos y un peso molecular de 33 kDa, por lo que se procedió a consultar la secuencia de aminoácidos de esta proteína en formato FASTA en la base de datos UniProtKB (UniProtKB 2019). El análisis *in silico* de inmunogenicidad con la herramienta Predicting Antigenic Peptide (Inmunomedicine Group 2019) detectó un total de 10 zonas antigénicas contra anticuerpos, a lo largo de la cadena peptídica (**Figura 24**), con longitudes que fueron desde los 8 hasta los 19 residuos de aminoácidos. Después de realizar la simulación *in silico* de digestión gástrica con pepsina con la herramienta Peptide cutter (Expasy 2019), se presentaron siete sitios de corte en diversas posiciones a lo largo de la cadena, generando potenciales fragmentos de cadenas peptídicas. Sin embargo, de estos fragmentos, solo se generó uno con persistencia antigénica (de la posición 88 a la 96), es decir, una cadena peptídica que contuviese una región antigénica completa de las que se habían detectado mediante el ensayo de antigenicidad.

Dado que el peso molecular de esta proteína (33 kDa) (**Figura 24**) se aproxima al peso molecular de la banda resistente a la digestión gástrica simulada (36 kDa) de la fracción de albúminas (**Figura 22**), probablemente forme parte de las que generaron

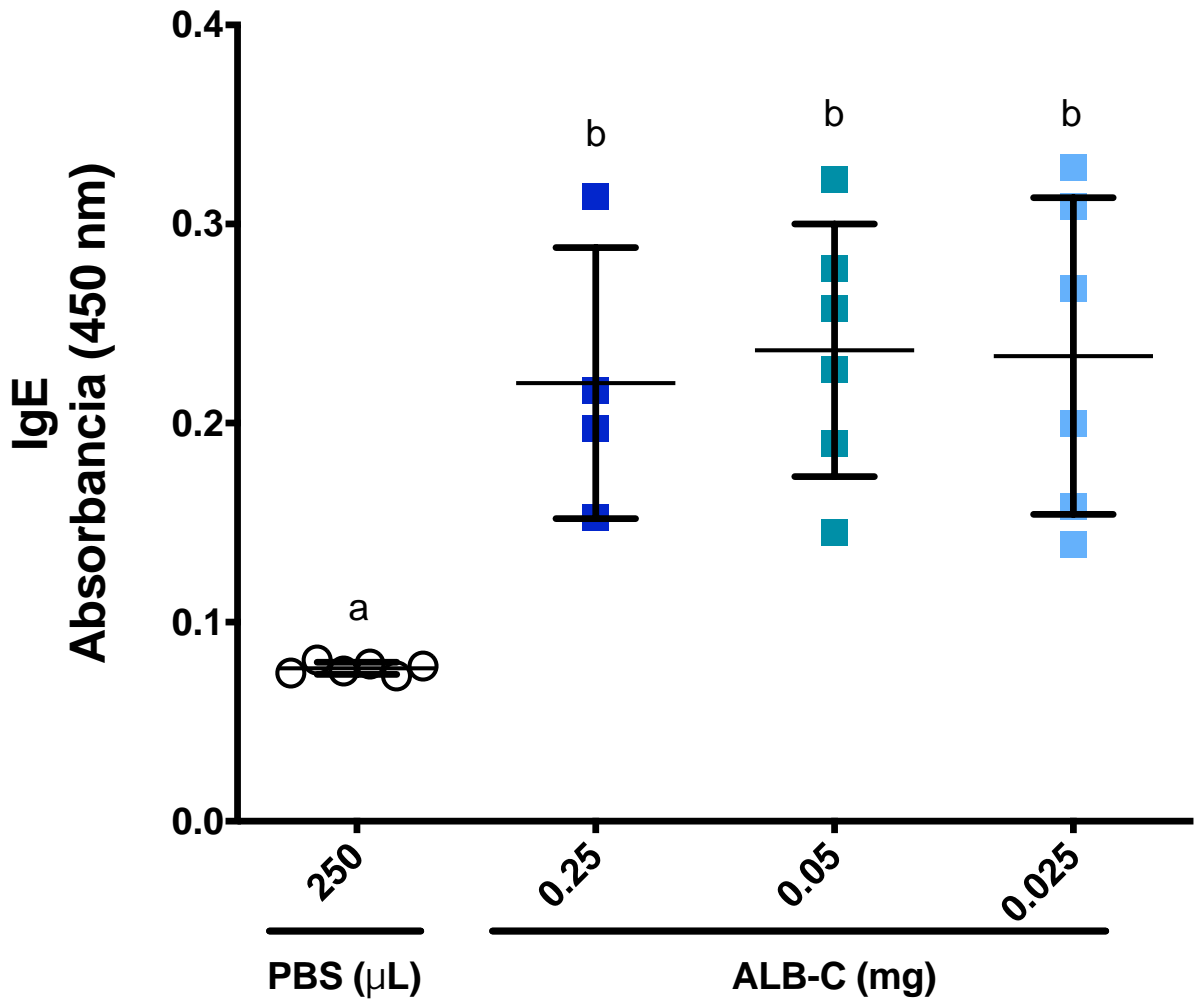


una sensibilización de anticuerpos IgE (**Figuras 25, 29**). Además, esto coincide con lo reportado por Kasera y col. (2013), quienes indicaron que las bandas reactivas contra anticuerpos IgE detectadas mediante un análisis de inmunotransferencia, se encontraban aproximadamente en el rango de 16 a 45 kDa.

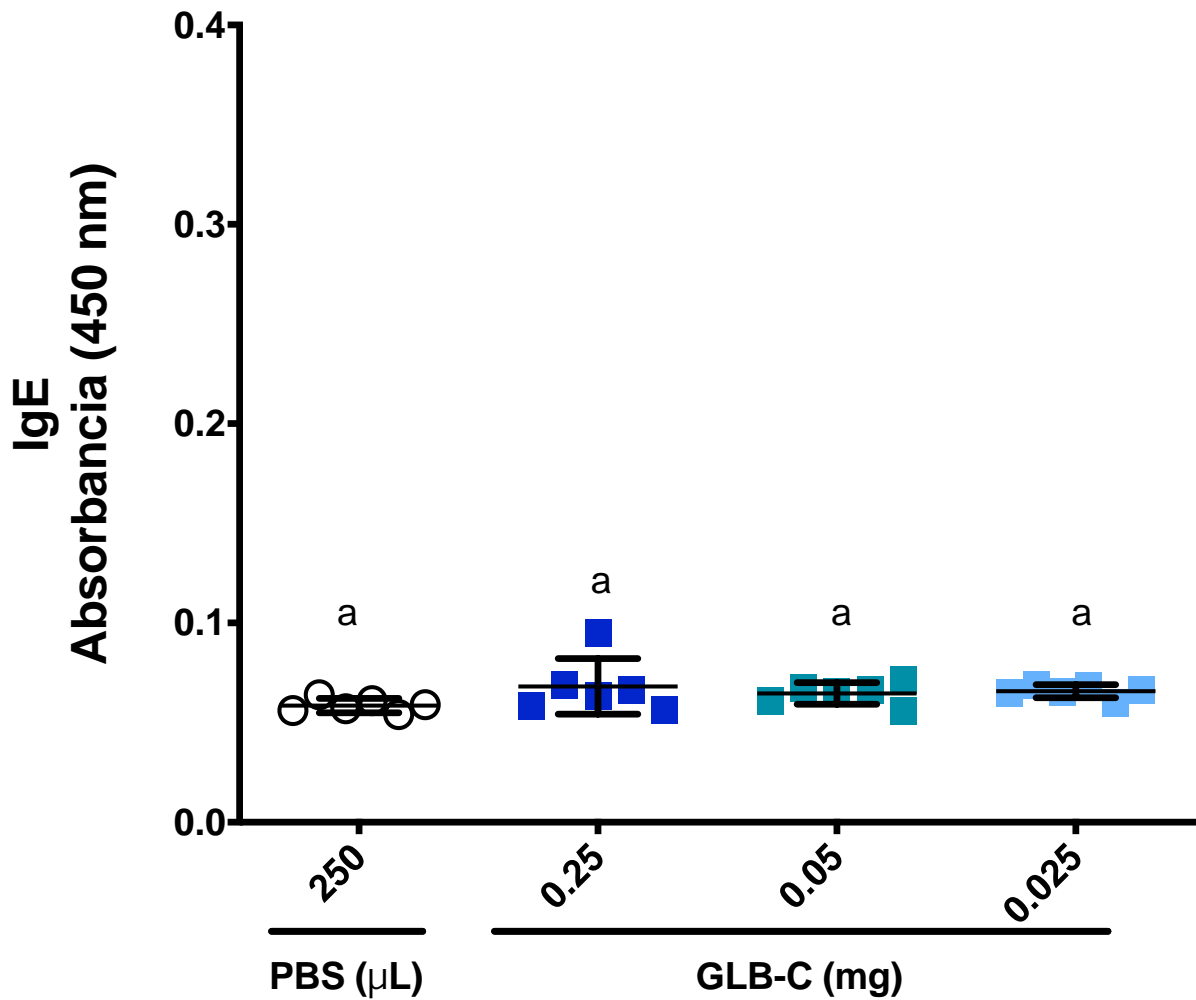
## **E SELECCIÓN DE LA MEJOR CANTIDAD PARA INDUCIR UNA SENSIBILIZACIÓN REPRODUCIBLE**

A fin de determinar las mejores cantidades de proteína que lograsen una sensibilización alérgica reproducible contra las albúminas y globulinas del amaranto, grupos conformados por seis ratones se inyectaron con tres cantidades distintas (0.25, 0.05 y 0.025 mg) de estas fracciones proteínicas de amaranto crudo, en un protocolo de sensibilización de 28 días. Posteriormente se evaluaron las respuestas de anticuerpos IgE para albúminas (**Figura 25**) y globulinas (**Figura 26**) en el día 28 de estos protocolos. Los grupos que fueron inyectados con 0.25, 0.05 y 0.025 mg de la fracción de albúminas desarrollaron una respuesta de anticuerpos IgE significativamente superior ( $P < 0.05$ ) que el grupo que recibió solamente PBS (control negativo) (**Figura 25**). Contrariamente, los grupos inyectados con 0.25, 0.05 y 0.025 mg de la fracción de globulinas no mostraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en cuanto a la respuesta IgE con respecto al grupo inyectado con PBS.

De esta manera, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales inyectados, ya sea con la fracción de albúminas o con la de globulinas, los grupos inyectados con 0.05 mg de albúminas y 0.25 mg de globulinas se seleccionaron para realizar las evaluaciones de los



**Figura 25.** Respuesta de anticuerpos IgE contra la fracción de albúminas de amaranto crudo para determinar la cantidad adecuada de proteína que generó una sensibilización reproducible. Las evaluaciones en el suero se llevaron a cabo después del día 28 del protocolo de sensibilización. **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos. **ALB-C:** Fracción de albúminas de amaranto crudo. Se realizaron las pruebas de Anova/Tukey.

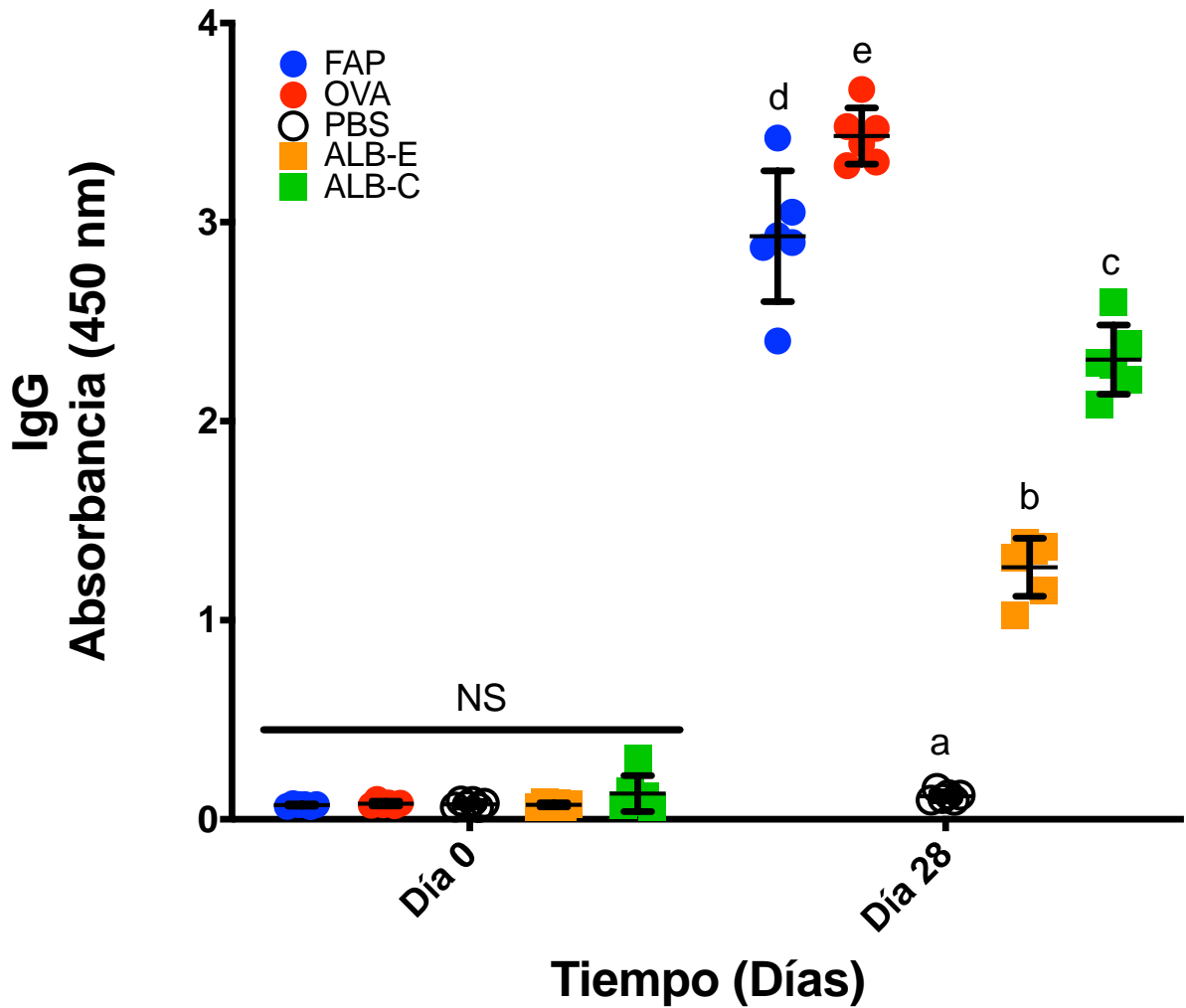


**Figura 26.** Respuesta de anticuerpos IgE contra la fracción de globulinas de amaranto crudo para determinar la cantidad adecuada de proteína que generó una sensibilización reproducible. Las evaluaciones en el suero se realizaron después del día 28 del protocolo de sensibilización. **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos. **GLB-C:** Fracción de globulinas de amaranto crudo. Se realizaron las pruebas de Anova/Tukey.

potenciales de sensibilización y alergénicos. Lo anterior, debido a que estas cantidades de proteína de las fracciones amaranto crudo desencadenaron una mayor (ligeramente) respuesta reproducible de anticuerpos IgE entre sus respectivos grupos. Para la evaluación de los potenciales de sensibilización y alergénicos, se utilizaron las mismas concentraciones de proteína en grupos de seis ratones inyectados intraperitonealmente con las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto extruido. De acuerdo con estudios previos, la concentración de la dosis, así como el número de veces y la frecuencia con que se administran las proteínas en los protocolos de sensibilización, son factores clave en la sensibilización de ratones BALB/c a alérgenos alimentarios (Ladics y col 2010; Morin y col 2011; Arámburo-Galvez y col 2018). El protocolo de 28 días con 5 inmunizaciones libres de adyuvantes que se utilizó en el presente estudio ha mostrado ser efectivo para detectar inclusive alérgenos que difícilmente desencadenan respuestas inmunes IgE después de la administración intraperitoneal (Arámburo-Galvez y col 2018).

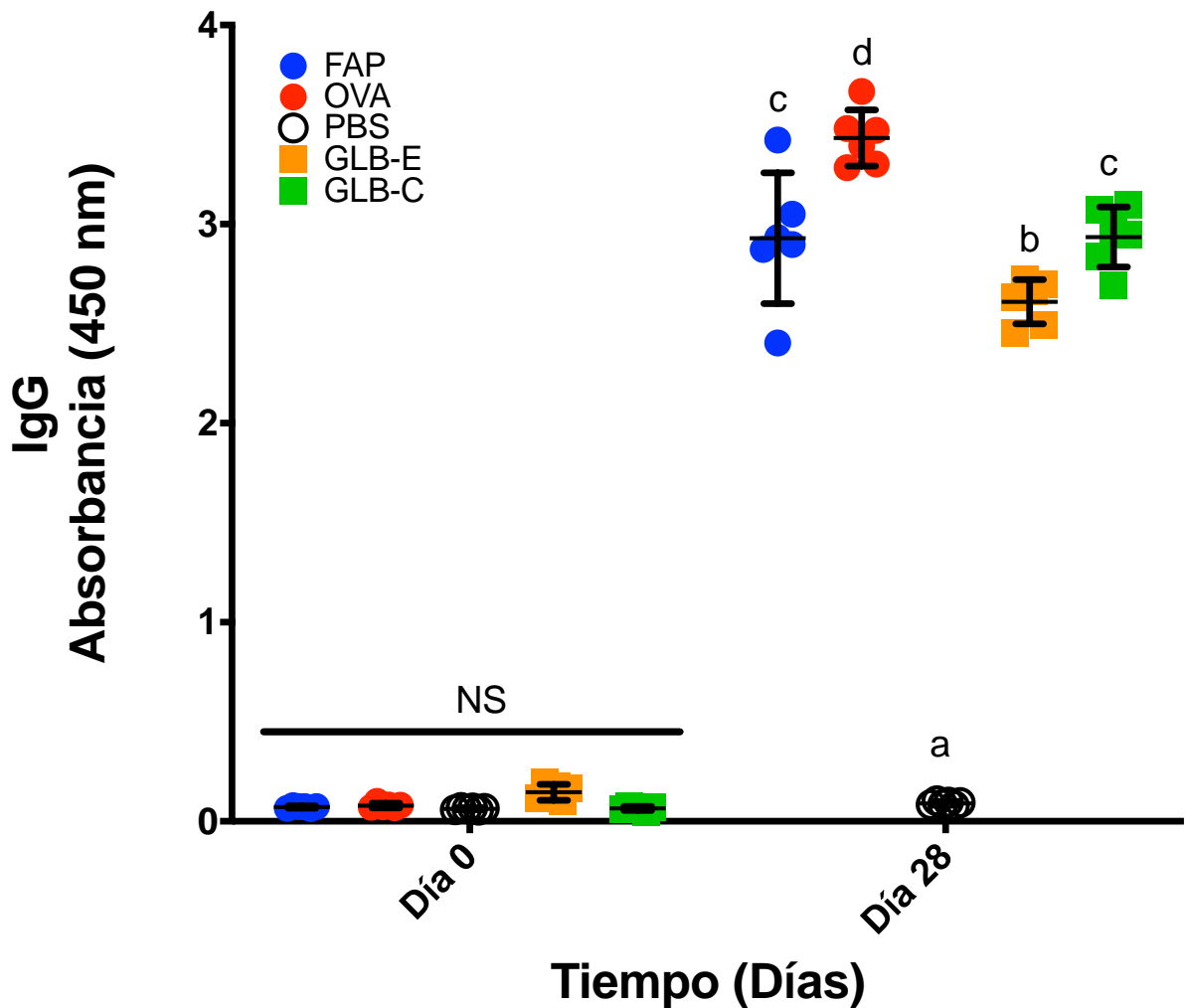
## **F POTENCIAL INMUNOGÉNICO**

El potencial inmunogénico de las fracciones de albúminas y globulinas se evaluó mediante la medición de la respuesta de anticuerpos IgG contra las fracciones de albuminas (**Figura 27**) y globulinas (**Figura 28**) de la proteína de amaranto y los alérgenos de referencia (OVA y PAP) a los 0 y 28 días del protocolo de sensibilización. Esto con el fin de verificar que aquellas proteínas que generaron una baja sensibilización de anticuerpos IgE tuviesen al menos una relevancia inmunológica.



**Figura 27.** Potencial de inmunogénico evaluado como la respuesta de anticuerpos IgG contra la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **ALB-E:** Fracción de albúminas de amaranto extrudido; **ALB-C:** Fracción de albúminas de amaranto crudo. Las pruebas de Anova/Tukey se aplicaron por separado los días 0 y 28.



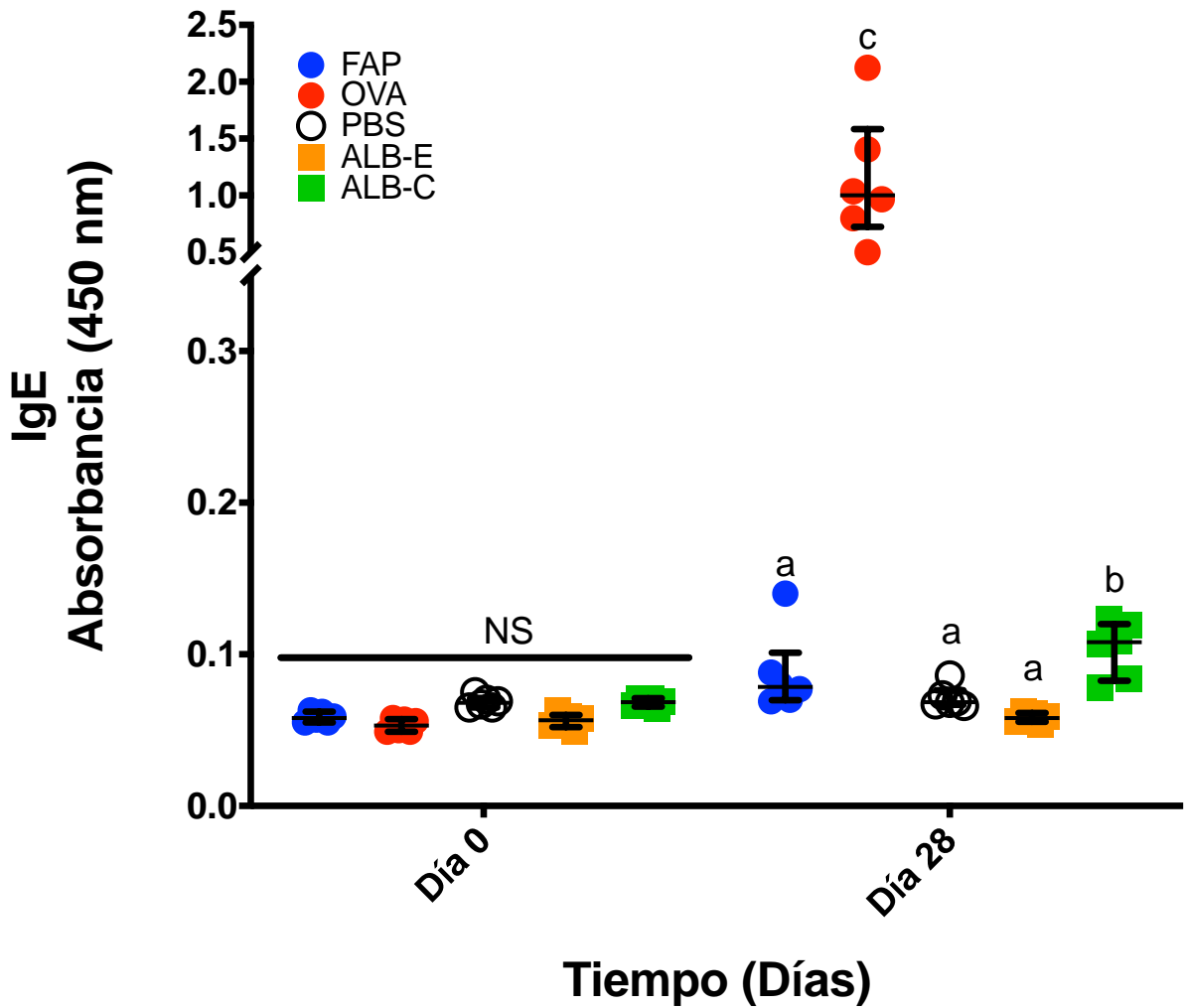


**Figura 28.** Potencial de inmunogénico evaluado como la respuesta de anticuerpos IgG contra la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **GLB-E:** Fracción de globulinas de amaranto extrudido; **GLB-C:** Fracción de globulinas de amaranto crudo. Las pruebas de Anova/Tukey se aplicaron por separado los días 0 y 28.

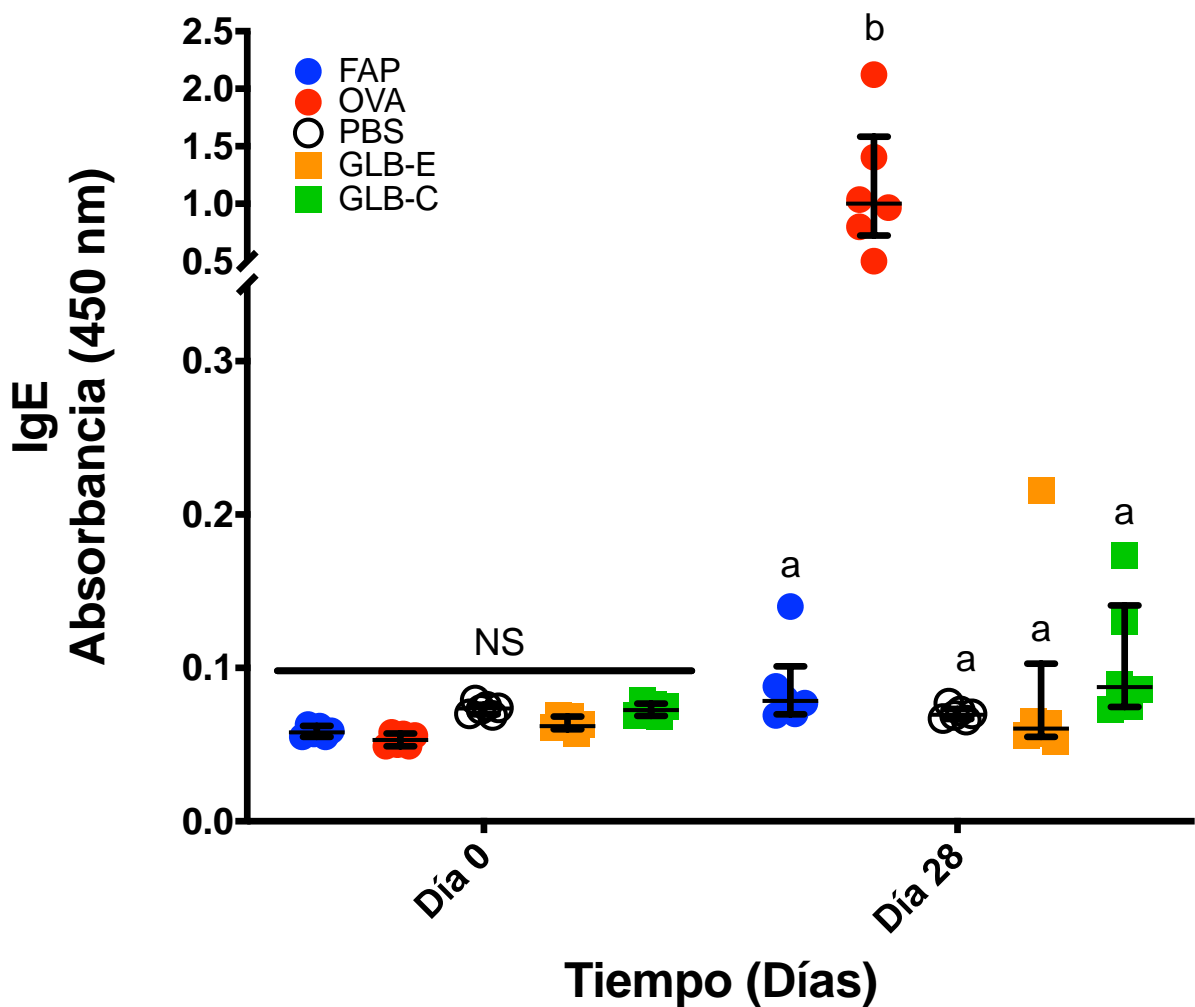
Como era de esperarse, no hubo respuesta de anticuerpos IgG en los sueros preinmunes de todos los grupos de ratones. Al día 28 del protocolo de sensibilización hubo una respuesta robusta de anticuerpos IgG en los grupos de ratones inyectados con las fracciones proteicas (albúmina y globulina de amaranto crudo y extruido) o los alérgenos de referencia (OVA y PAP). Sin embargo, el grupo inyectado con PBS no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la respuesta de IgG a los 0 y 28 días. De este modo, los resultados indican que las dosis de las proteínas probadas fueron inmunológicamente relevantes, pero esto no implicó que se haya alcanzado la fase de sensibilización (Dearman y Kimber 2001).

## **G POTENCIAL DE SENSIBILIZACIÓN**

La alergenidad o el potencial alérgico se asocia frecuentemente con la presencia de anticuerpos IgE (Verhoeckx y col 2015) y generalmente se denomina potencial de sensibilización, en referencia a la fase de sensibilización de la patogénesis de la alergia alimentaria. En el presente estudio se evaluó la respuesta de los anticuerpos IgE contra las albúminas (**Figura 29**) y las globulinas (**Figura 30**) del amaranto crudo y extruido, utilizando a su vez como alérgenos de referencia a la OVA y la FAP a los 0 y 28 días del protocolo de sensibilización. Los grupos inyectados con FAP, PBS, la fracción de albúminas de amaranto extruido y las fracciones de globulinas de amaranto crudo y extruido no aumentaron la respuesta de IgE después del protocolo de sensibilización ( $P > 0.05$ ). A los 28 días del protocolo de sensibilización, solo se dio un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ ) de la respuesta de anticuerpos IgE en ratones inyectados con OVA y la fracción de albúminas de amaranto crudo, aunque la respuesta de IgE contra la fracción de



**Figura 29.** Potencial de sensibilización evaluado como la respuesta de anticuerpos IgE en grupos inyectados con la fracción de albúminas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **ALB-E:** Fracción de albúminas de amaranto extrudido; **ALB-C:** Fracción de albúminas de amaranto crudo. Las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis/Dunn se aplicaron por separado en los días 0 y 28.



**Figura 30.** Potencial de sensibilización evaluado como la respuesta de anticuerpos IgE en grupos inyectados con la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido en el protocolo de sensibilización. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **GLB-E:** Fracción de globulinas de amaranto extrudido; **GLB-C:** Fracción de globulinas de amaranto crudo. Las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis/Dunn se aplicaron por separado los días 0 y 28.

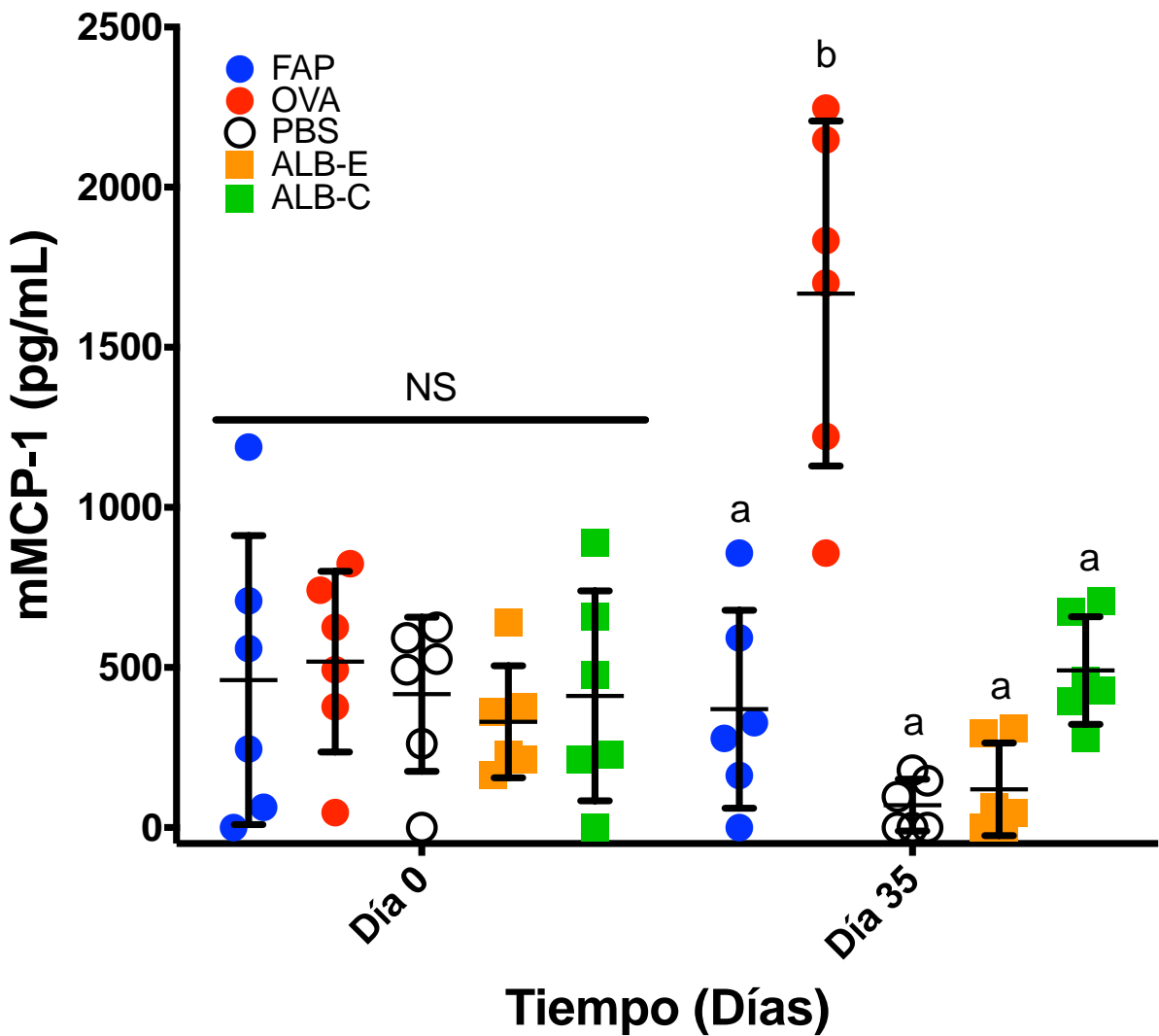
albúmina fue más baja ( $P < 0.05$ ) que aquella contra OVA. Estos resultados pueden verse limitados por el hecho de que, en las evaluaciones mediante ELISA, las cantidades bajas de anticuerpos IgE específicos contra los alérgenos podrían estarse viendo enmascaradas por la presencia de anticuerpos IgG específicos contra los alérgenos (Arámburo-Galvez y col 2018).

Por otra parte, la respuesta de anticuerpos IgE de la fracción de albúminas de amaranto extrudido fue significativamente inferior ( $P < 0.05$ ) que la de las albúminas de amaranto crudo. En este marco, se observó que hubo una disminución en el ya débil potencial de sensibilización de la fracción de albúmina debido al efecto de la extrusión, mientras que las fracciones de globulinas no presentaron un potencial de sensibilización significativo ( $P > 0.05$ ). Estos resultados apoyan el concepto de hipoadlergenicidad del amaranto como ingrediente alimentario. Por lo tanto, aunque esta visión se ha visto comprometida con la presentación de los primeros casos de alergia alimentaria al amaranto que han desatado cuadros de anafilaxis (Kasera y col 2013; Pföhler y col 2015; Deluze y Beaumont 2017; Vaswani y col 2018) los resultados del presente estudio apuntan a que es difícil que las proteínas del amaranto activen la fase de sensibilización. Además, la respuesta de IgE no fue significativa ( $P < 0.05$ ) después de la extrusión, lo cual está de acuerdo con diversos autores que han demostrado que este proceso reduce el potencial de sensibilización de las proteínas (Chen y col 2015; Ortiz y col 2016). En el presente estudio utilizó un protocolo de sensibilización sin adyuvantes, lo cual es de importancia ya que se ha sugerido evitar adyuvantes cuando se evalúa el potencial de sensibilización, a fin de evitar falsos positivos (Kimber y col 2003; Chen y col 2013). Además, se eligió un protocolo de

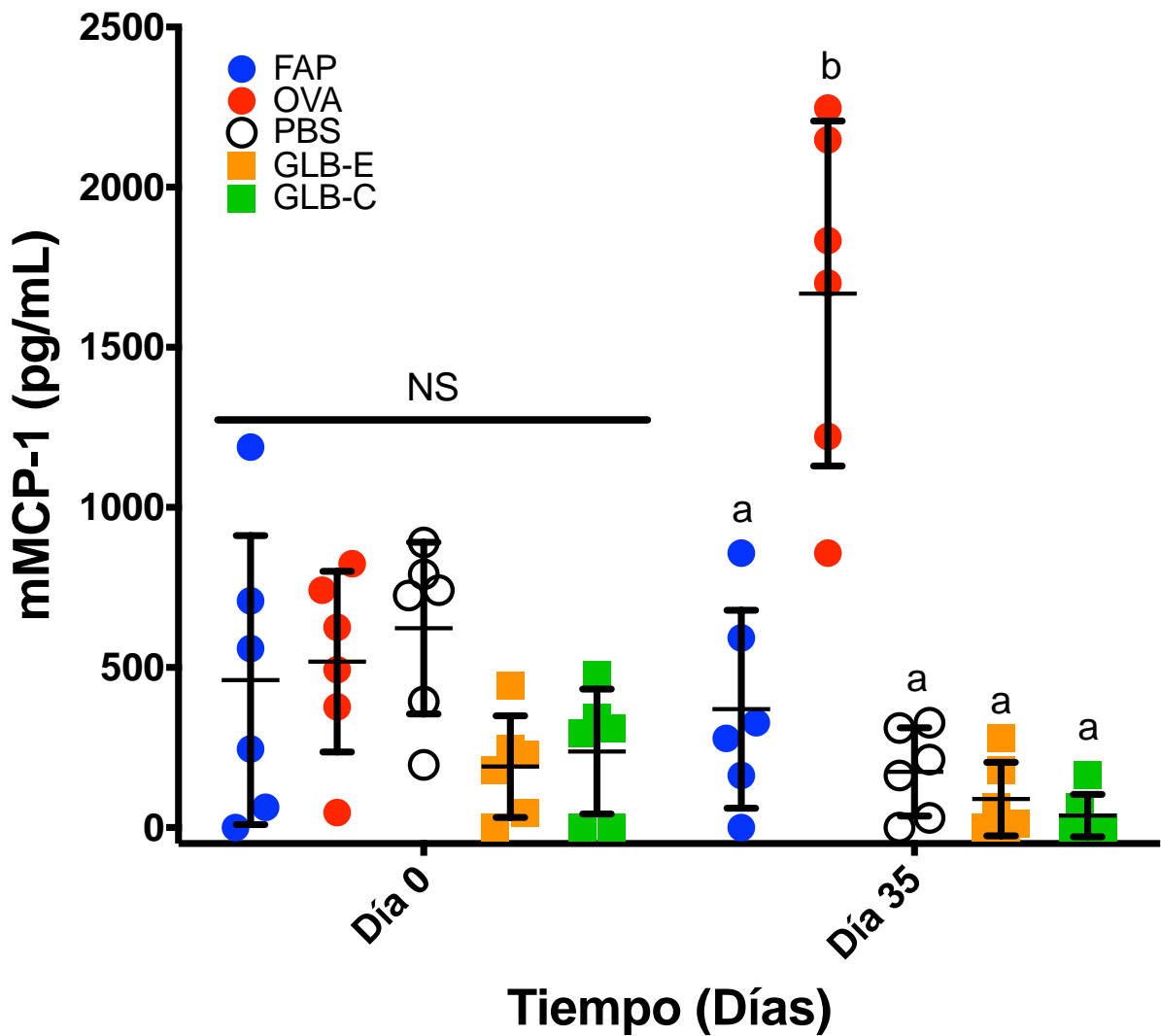
sensibilización intraperitoneal en lugar de un protocolo de administración oral de alérgenos, debido a que este último puede inducir tolerancia a proteínas alérgicas a evaluar (Dearman y Kimber 2001; Arámburo-Galvez y col 2018). Los resultados de la respuesta IgE de este estudio son similares a los reportados por Ortiz y col. (2016) quienes evaluaron el efecto de la extrusión sobre la alergenicidad de proteínas de avellana en un modelo murino. Estos autores reportaron una respuesta reducida de anticuerpos IgE en ratones sensibilizados a la avellana sometidos a extrusión térmica en comparación con el crudo, lo cual apunta a una reducción en el potencial de generar una sensibilización contra los alérgenos.

## **H POTENCIAL ALERGÉNICO (RESPUESTA mMCP-1)**

El potencial alergénico se determinó mediante la evaluación de la presencia de mMCP-1, la cual se utilizó como como marcador de la degranulación de mastocitos para monitorear la fase efectora de la alergia alimentaria. En el presente estudio se evaluó la concentración de mMCP-1 en ratones inyectados con las fracciones de albúminas (**Figura 31**) y globulinas (**Figura 32**) de amaranto crudo y extrudido, OVA, PAP y PBS, después de 30 min del reto intragástrico con la proteína respectiva o PBS. Se observó que, después del reto intragástrico al día 35 del protocolo de sensibilización, solo los valores de mMCP-1 del grupo de ratones inyectado con OVA se incrementaron significativamente ( $P < 0.05$ ), comparado con el resto de los grupos. Así, los grupos de ratones inyectados con PBS, asimismo, con las proteínas que no indujeron una la respuesta de anticuerpos IgE en los ratones, los valores de mMCP-1 medidos en suero después del reto intragástrico fueron similares a los valores de mMCP-1 de los sueros preinmunes ( $P > 0.05$ ). Inclusive en el grupo inyectado con la



**Figura 31.** Potencial alergénico evaluado como la concentración de mMCP-1 en suero después del reto intragástrico con la fracción de albúminas de amaranto crudo y extruido. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **ALB-E:** Fracción de albúminas de amaranto extruido; **ALB-C:** Fracción de albúminas de amaranto crudo; Las pruebas de Anova/Tukey se aplicaron por separado los días 0 y 35.



**Figura 32.** Potencial alergénico evaluado como la concentración de mMCP-1 en suero después del reto intragástrico con la fracción de globulinas de amaranto crudo y extrudido. **FAP:** Fosfatasa ácida de papa; **OVA:** Ovoalbúmina; **PBS:** Solución amortiguadora salina de fosfatos; **GLB-E:** Fracción de globulinas de amaranto extrudido; **GLB-C:** Fracción de globulinas de amaranto crudo. Las pruebas de Anova/Tukey se aplicaron por separado los días 0 y 35.



fracción de albúmina de amaranto crudo, el cual estaba ligeramente sensibilizado, una fracción proteica que mostró el potencial para desencadenar una respuesta inmune débil y consistente de anticuerpos IgE detectable mediante ELISA (**Figuras 25, 29**).

Aunque las muestras de suero de los ratones no se evaluaron después de haber reducido la cantidad de anticuerpos IgG, no hubo un incremento en la cantidad de mMCP-1 de los sueros de los ratones obtenidas después del reto intragástrico con la fracción de globulinas. Así, se puede hipotetizar que las globulinas del amaranto no son capaces de desencadenar una alergia alimentaria después de la exposición oral debido a la falta de, o al muy bajo, potencial de sensibilización. Por otra parte, la fracción de albuminas de amaranto crudo desencadenó una respuesta inmune de anticuerpos IgE. Esta respuesta fue débil en comparación de la respuesta anti-OVA, pero consistente en los experimentos independientes que se llevaron a cabo (**Figura 25, 29**). Basado en los resultados del presente estudio, las características de los epítopes alergénicos de las albúminas que llevan a que se dé la sensibilización en ratones BALB/c aún son desconocidos. En la mayoría de los casos, los epítopes conformacionales no son capaces de desencadenar una respuesta alérgica en los casos de alergia alimentaria ya que estos epítopes son degradados después de la ingestión por las enzimas gástricas o intestinales (Micinskia y col 2013). Por lo anterior, se cree que los epítopes lineales son los principalmente implicados en las alergias alimentarias. No obstante, la obtención de estos resultados, el reto intragástrico de los ratones sensibilizados con albúminas de amaranto crudo no logró incrementar los niveles séricos del marcador de degranulación de los mastocitos mMCP-1. Los resultados muestran que las albúminas del amaranto tienen el potencial de sensibilizar

y son más propensas a desencadenar reacciones alérgicas que las globulinas después de la ingestión de amaranto.

Contrariamente a la fracción de albúminas de amaranto crudo, la fracción de albuminas de amaranto extrudido no desencadenó una respuesta de anticuerpos IgE (**Figura 29**). Además, no se incrementaron los niveles séricos de mMCP-1 después del reto intragástrico con las proteínas de interés. La falta de una respuesta IgE anti-albúminas se puede deber a la pérdida de epítopes alérgicos como consecuencia del proceso de extrusión, ya que se perdieron bandas de proteínas después del proceso de extrusión (**Figura 20**). Estudios previos han mostrado que el proceso de extrusión impacta negativamente en los potenciales de sensibilización y alérgicos de alérgenos alimentarios, ya sea reduciendo el desencadenamiento de la respuesta inmune de anticuerpos IgE o bien disminuyendo los niveles séricos de MCP-1 (Chen y Phillips 2005; Ortiz y col 2016). Tomando todo en conjunto, y con base en las evaluaciones de los potenciales de sensibilización y alérgicos en un modelo murino con ratones BALB/c, los resultados muestran que las albúminas y las globulinas del amaranto pueden considerarse como ingredientes hipoalérgicos en la formulación de alimentos especializados, más aún cuando el procesamiento involucra el proceso de extrusión.

## VIII CONCLUSIONES

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de la proteína total del amaranto no fue modificado por efecto del proceso de extrusión.

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de las fracciones proteicas de amaranto se modificó sustancialmente por efecto del proceso de extrusión.

Las cantidades de proteína extraída en las fracciones de albúminas y globulinas de amaranto extrudido fueron significativamente menores en comparación a la harina de amaranto crudo.

No se obtuvieron cantidades significativas de proteína en la fracción de prolaminas de amaranto crudo y extrudido.

La digestión gástrica simulada evidenció la presencia una banda en la fracción de albúminas y otra en las globulinas resistentes a la digestión con pepsina

Las fracciones proteicas de amaranto crudo y extrudido fueron inmunológicamente relevantes.

Solo la fracción de albúminas de amaranto crudo causó una sensibilización, aunque mediana, pero no un potencial alergénico.

El proceso de extrusión eliminó el potencial de sensibilización dando lugar a un producto alimenticio aún más hipoalergénico.

El resto de las proteínas de amaranto no tuvieron potenciales de sensibilización ni alergénicos

El presente estudio sugiere que el amaranto es un alimento con un bajo potencial de sensibilización, potencialmente apropiado para usarse como subrogado de otros granos más alergénicos.

## IX BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 1999. American Association of Cereal Chemists. En: *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th ed.*
- Aertsen A, Meersman F, Hendrickx MEG, Vogel RF, Michiels CW. 2009. Biotechnology under high pressure: Applications and implications. *Trends in Biotechnology* 27:434–441. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.04.001.
- Ainsworth P. 2012. Extrusion. En: Brennan JG, Grandison AS, editores. *Food Processing Handbook*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 429–453. DOI: 10.1002/9783527634361.ch13.
- Álvarez-Álvarez J, Guillamón E, Crespo JF, Cuadrado C, Burbano C, Rodríguez J, Fernández C, Muzquiz M. 2005. Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1294–1298. DOI: 10.1021/jf0490145.
- Arámburo-Galvez JG, Sotelo-Cruz N, Flores-Mendoza LK, Gracia-Valenzuela MH, Chiquete-Elizalde FIR, Espinoza-Alderete JG, Trejo-Martínez H, Canizalez-Román VA, Ontiveros N, Cabrera-Chávez F. 2018. Assessment of the sensitizing potential of proteins in BALB/c Mice: Comparison of three protocols of intraperitoneal sensitization. *Nutrients* 10, 903; DOI: 10.3390/nu10070903
- Arellano M, Florentino C, Guerra M, Iribarren M, Torresani M. 2007. Seeds in human diet. *Actualización en Nutrición* 8:144–161.
- Ashok Kumar HG, Venkatesh YP. 2014. In silico analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (*Manilkara zapota*) acidic thaumatin-like protein in

- comparison with allergenic plant TLPs. *Molecular Immunology* 57:119-128; DOI: 10.1016/j.molimm.2013.08.010.
- Asp NG, Bjorck I. 1989. Nutritional Properties of “Extrusion-Cooking.” En: Merciers C, Linko P, Harper JM, editores. American Association of Cereal Chemists. St Paul, MN. p 339–434.
- Awasthi CP, Kumar A, Singh N, Thakur R. 2011. Biochemical composition of grain amaranth genotypes of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry* 24(2):141-144
- Bahna SL. 2008. Hypoallergenic formulas: Optimal choices for treatment *versus* prevention. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 101:453–459. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)60281-5.
- Barba FJ, Terefe NS, Buckow R, Knorr D, Orlie V. 2015. New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International* 77:725–742. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.05.015.
- Besler M, Steinhart H, Paschke A. 2001. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 756:207–28. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00110-4
- Breiteneder H, Mills C. 2005. Nonspecific lipid-transfer proteins in plant foods and pollens: an important allergen class. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 5:275–279

- Brenner D, Baltensperger D, Kulakow P, Lehmann J, Myers R, Slabbert M, Sleugh B. 2000. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Reviews* 19:227–285.
- Bressani R. 1989. The proteins of grain amaranth. *Food Reviews International* 5:13–38. DOI: 10.1080/87559128909540843
- Bressani R, de Martell EC, de Godinez CM. 1993. Protein quality evaluation of amaranth in adult humans. *Plant Foods for Human Nutrition* 43:123–143.
- Bressani R, Sánchez-Marroquín A, Morales E. 1992. Chemical composition of grain amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. *Food Reviews International* 8:23–49. DOI: 10.1080/87559129209540928.
- Cabrera-Chávez F, de la Barca AM, Islas-Rubio AR, Marti A, Marengo M, Pagani MA, Bonomi F, Iametti S, Calderón de la Barca AM, Islas-Rubio AR, Marti A, Marengo M, Pagani MA, Bonomi F, Iametti S. 2012. Molecular rearrangements in extrusion processes for the production of amaranth-enriched, gluten-free rice pasta. *LWT - Food Science and Technology* 47:421–426. DOI: 10.1016/j.lwt.2012.01.040.
- Cabrera-Chávez F, Vergara-Jiménez MJ. 2014. Manipulaciones químicas y bioquímicas de alimentos para pacientes que requieren una dieta libre de gluten. En: Valdez EP, editores. *La Química y Bioquímica en la Alimentación en México*. p 103–113.
- Calderón-de la Barca AM, Rojas-Martínez ME, Islas-Rubio AR, Cabrera-Chávez F. 2010. Gluten-free breads and cookies of raw and popped amaranth flours with

- attractive technological and nutritional qualities. *Plant Foods for Human Nutrition* 65:241–246. DOI: 10.1007/s11130-010-0187-z.
- Casañal A, Zander U, Dupeux F, Valpuesta V, Marquez JA. 2013. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 69:510–514. DOI: 10.1107/S1744309113006945.
- Chávez-Jáuregui RN, Silva MEMP, Arões JAG. 2000. Extrusion cooking process for amaranth (*Amaranthus caudatus* L.). *Journal of Food Science* 65:1009–1015. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb09408.x.
- Chen L, Phillips RD. 2005. Effects of twin-screw extrusion of peanut flour on *in vitro* digestion of potentially allergenic peanut proteins. *Journal of Food Protection* 68:1712–9.
- Chen X, Qin W, Ma L, Xu F, Jin P, Zheng Y. 2015. Effect of high pressure processing and thermal treatment on physicochemical parameters, antioxidant activity and volatile compounds of green asparagus juice. *LWT - Food Science and Technology* 62:927–933. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.10.068.
- Chen C, Sun N, Li Y, Jia X. 2013. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food and Chemical Toxicology* 62:41–47. DOI: 10.1016/j.fct.2013.08.004.



- Codex Alimentarius. 2009. *Foods Derived from Modern Biotechnology*. Second edition. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- Dearman RJ, Basketter DA, Kimber I. 2013. Inter-relationships between different classes of chemical allergens. *Journal of Applied Toxicology* 33:558–565. DOI: 10.1002/jat.1758.
- Dearman RJ, Caddick H, Stone S, Basketter DA, Kimber I. 2001. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: Influence of route of exposure. *Toxicology* 167:217–231. DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00462-0.
- Dearman RJ, Kimber I. 2001. Determination of protein allergenicity: studies in mice. *Toxicology Letters* 120:181–186. DOI: 10.1016/S0378-4274(01)00276-4.
- Dearman RJ, Kimber I. 2007. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods* 41:91–98. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.07.008.
- Deluze C, Beaumont P. 2017. Allergie alimentaire à la graine d'amarante. *Revue Française d'Allergologie* 57:337–340. DOI: 10.1016/j.reval.2017.02.007.
- Dhakal S, Liu C, Zhang Y, Roux KH, Sathe SK, Balasubramaniam VM. 2014. Effect of high pressure processing on the immunoreactivity of almond milk. *Food Research International* 62:215–222. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.02.021.
- Dziezack DJ. 1989. Single and twin extruders in food processing. *Food Technology* 43:163–174.
- Expasy. 2019. Expasy Bioinformatics Source Portal. *Disponible de:* <https://www.expasy.org>. Consultado el 18 de agosto de 2019.

- FAO/WHO. 2001. Evaluación de los Alimentos Modificados Genéticamente. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.
- Fellows PJ. 2000. Extrusion. En: Food Processing Technology: Principles and Practice. Cambridge, England: CRC Press. p 294–308.
- Foster ES, Kimber I, Dearman RJ. 2013. Relationship between protein digestibility and allergenicity: Comparisons of pepsin and cathepsin. *Toxicology* 309:30–38. DOI: 10.1016/j.tox.2013.04.011.
- Frame ND. 1994. Operational Characteristics of the Co-rotating Twin-screw Extruder. En: Frame ND, editores. The Technology of Extrusion Cooking. Glasgow: Blackie Academic and Professional. p 1–51.
- Fukushima D. 1991. Structures of plant storage proteins and their functions. *Food Reviews International* 7:353–381. DOI: 10.1080/87559129109540916.
- Golias J, Schwarzer M, Wallner M, Kverka M, Kozakova H, Srutkova D, Klimesova K, Sotkovsky P, Palova-Jelinkova L, Ferreira F, Tuckova L. 2012. Heat-induced structural changes affect OVA-antigen processing and reduce allergic response in mouse model of food allergy. *Plos One* 7:1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0037156.
- Grobelnik Mlakar S, Turinek M, Jakop M, Bavec M, Bavec F. 2009. Nutrition value and use of grain amaranth: potential future application in bread making. *Agricultura* 6:43–53. DOI: 10.1016/j.learninstruc.2016.07.002.
- Gross M, Jaenicke R. 1994. Proteins under pressure. The influence of high hydrostatic pressure on structure, function and assembly of proteins and protein complexes.

*European journal of biochemistry / FEBS* 221:617–630. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18774.x.

Harper JM. 1986. Processing Characteristics of Food Extruders. En: Maguer ML, Jelem P, editores. *Food Engineering and Process Applications, Unit Operations*, Vol.2. London: Elsevier Applied Science. p 101–114.

He S, Zhang H, Zeng X, Yang P. 2012. Self-amplification mechanisms of mast cell activation: A new look in allergy. *Current Molecular Medicine* 12:1329–1339. DOI: 10.2174/156652412803833544.

Heinz V, Buckow R. 2010. Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5:73–81. DOI: 10.1007/s00003-009-0311-x.

Huang H-W, Yang BB, Wang C-Y. 2014. Effects of high pressure processing on immunoreactivity and microbiological safety of crushed peanuts. *Food Control* 42:290–295. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.02.030.

Inmunomedicine Group. 2019. Predicting Antigenic Peptide. *Disponible de: <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>*. Consultado el 18 de agosto de 2019.

Irving DW, Betschart AA, Saunders RM. 1981. Morphological studies on *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food Science* 46:1170–1174.

Jager T, van Zuilichem DJ, Stolp W. 1992. Residence Time Distribution, Mass Flow, and Mixing in a Co-rotating Twin-screw Extruder. En: NKokini JL, Ho C, Karwe MV, editores. *Food Extrusion Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p 71–78.

- Kadam K, Sawant S, Jayaraman VK, Kulkarni-Kale U. 2016. Databases and Algorithms in Allergen Informatics. En: Abdurakhmonov IY, editores. Bioinformatics: Updated Features and Applications. Rijeka, Croatia: INTECH OPEN. p 53–84. DOI: 10.5772/63083.
- Kasera R, Niphadkar P V, Saran A, Mathur C, Singh AB. 2013. First case report of anaphylaxis caused by Rajgira seed flour (*Amaranthus paniculatus*) from India: A clinico-immunologic evaluation. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 31:79–83.
- Kimber I, Dearman RJ, Penninks AH, Knippels LMJ, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM, Knippels LMJ, Buchanan RB, Hammerberg B, Jackson HA, Helm RM. 2003. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: Animal models. *Environmental Health Perspectives* 111:1125–1130. DOI: 10.1289/ehp.5813.
- Kimber I, Stone S, Dearman RJ. 2003. Allergenicity models minimonograph assessment of the inherent allergenic potential of proteins in mice. *Environmental Health* 111:227–231. DOI: 10.1289/ehp.5703.
- Kolaskar AS, Tongaonkar PC. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *Febs Letters* 276:172–174.
- Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Rueemmele FM, Staiano A, Schäppi MG, Vandenplas Y. 2012. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: Espghan gi committee practical guidelines. *Journal of Pediatric*

*Gastroenterology and Nutrition* 55:221–229. DOI:  
10.1097/MPG.0b013e31825c9482.

Ladics GS, Knippels LMJ, Penninks AH, Bannon GA, Goodman RE, Herouet-GuiGuichenev C. 2010. Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56:212–224. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.09.018.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. DOI: 10.0.4.14/227680a0.

Lee S, Han Y, Do J, Oh S. 2013. Allergenic potential and enzymatic resistance of buckwheat. *Nutrition Research and Practice* 7:3–8.

Lee C, In S, Han Y, Oh S. 2015. Reactivity change of IgE to buckwheat protein treated with high-pressure and enzymatic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96:2073–2079. DOI: 10.1002/jsfa.7321.

Lee JW, Kim JH, Yook HS, Kang KO, Lee SY, Hwang HJ, Byun MW. 2001. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. *Journal of Food Protection* 64:272–276.

Lee JW, Seo JH, Kim JH, Lee SY, Kim KS, Byun MW. 2005. Changes of the antigenic induces local protective mechanisms in the gastrointestinal mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129:1579–1587. DOI:  
10.1016/j.jaci.2012.04.009.

Li H, Zhu K, Zhou H, Peng W. 2012. Effects of high hydrostatic pressure treatment on allergenicity and structural properties of soybean protein isolate for infant formula. *Food Chemistry* 132:808–814. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.040.

- Maleki SJ, Viquez O, Jacks T, Dodo H, Champagne ET, Chung SY, Landry SJ. 2003. The major peanut allergen, Ara h 2, functions as a trypsin inhibitor, and roasting enhances this function. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112:190–195. DOI: 10.1067/mai.2003.1551.
- Martínez-Cruz O, Cabrera-Chávez F, Paredes-López O. 2014. Biochemical Characteristics, and Nutraceutical and Technological Uses of Amaranth Globulins. En: Milford SD, editores. *Globulins: Biochemistry, Production and Role in Immunity*. New York, NY: Nova Science Publishers, Inc. p 1–29.
- Martos G, Lopez-Exposito I, Bencharitiwong R, Berin MC, Nowak-Węgrzyn A. 2011. Mechanisms underlying differential food allergy response to heated egg. The *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 127:990–992. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.01.057.
- Matías-Luis G, Hernández-Hernández BR, Peña-Caballero V, Torres-López NG, Espinoza-Martínez VA, Ramírez-Pacheco L. 2018. Current and potential uses of Amaranth (*Amaranthus* spp.). *Journal of Negative and No Positive Results* 3:423–436. DOI: 10.19230/jonnpr.2410.
- Mendoza C, Bressani R. 1987. Nutritional and functional characteristics of extrusion-cooked amaranth flour. *Cereal Chemistry* 64:218–222. DOI: 10.1021/je980159f.
- Mercier C. 1993. Nutritional appraisal of extruded flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 44:545–553.
- Micinska J, Kowalski IM, Zwierzchowska G, Szarek J, Pierożyński B, Zablocka E. 2013. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties

and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine* 20:69–76. DOI: 10.1016/j.poamed.2013.07.006.

Milán-Carrillo J, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez JXK, Cuevas-Rodríguez E-O, Ramírez-Wong B, Reyes Moreno C. 2006. The optimization of the extrusion process when using maize flour with a modified amino acid profile for making tortillas. *International Journal of Food Science and Technology* 41:727–736. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.00997.x.

Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Gutiérrez-Dorado R, Perales-Sánchez X, Reyes-Moreno C. 2012a. Optimization of extrusion process for producing high antioxidant instant amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) flour using response surface methodology. *Applied Mathematics* 3:1516–1525. DOI: 10.4236/am.2012.330211.

Milán-Carrillo J, Montoya-Rodríguez A, Reyes-Moreno C. 2012b. High-antioxidant capacity beverages based on extruded and roasted amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) flour. *ACS Symposium Series* 1109:199–216. DOI: 10.1021/bk-2012-1109.ch013.

Montoya-Rodríguez A. 2011. Nuevos Productos Alimenticios a Partir de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) Integral. Efecto del Proceso Extrusión / Cocción Sobre la Capacidad Antioxidante y Niveles de Fitoquímicos. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México.

Montoya-Rodríguez A, Milán-Carrillo J, Dia VP, Reyes-Moreno C, González de Mejía E. 2014a. Pepsin-pancreatin protein hydrolysates from extruded amaranth inhibit markers of atherosclerosis in LPS-induced THP-1 macrophages-like

- human cells by reducing expression of proteins in LOX-1 signaling pathway. *Proteome science* 12:30. DOI: 10.1186/1477-5956-12-30.
- Montoya-Rodríguez A, González de Mejía E, Dia VP, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J. 2014b. Extrusion improved the anti-inflammatory effect of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) hydrolysates in LPS-induced human THP-1 macrophage-like and mouse RAW 264.7 macrophages by preventing activation of NF- $\kappa$ B signaling. *Molecular Nutrition and Food Research* 58:1028–1041. DOI: 10.1002/mnfr.201300764.
- Montoya-Rodríguez A, Gómez-Favela MA, Reyes-Moreno C, Milán-Carrillo J, González de Mejía E. 2015. Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14:139–158. DOI: 10.1111/1541-4337.12125.
- Morales de Leon J, Camacho ME, Bourges H. 2005. Amino acid composition of some mexican foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 55:172–186.
- Morin S, Bernard H, Przybylski-Nicaise L, Corthier G, Rabot S, Wal JM, Hazebrouck S. 2011. Allergenic and immunogenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Molecular Nutrition and Food Research* 55:1700–1707. DOI: 10.1002/mnfr.201100024.
- Nowak-Wegrzyn A, Fiocchi A. 2009. Rare, medium, or well done? The effect of heating and food matrix on food protein allergenicity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 9:234–237. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32832b88e7.



- Oettgen H, Broide DH. 2012. Introduction to mechanisms of allergic disease. En: Holgate ST, Church MK, Broide DH, Martinez FD, editores. Allergy. Edinburgh: W.B. Saunders. p 1–32. DOI: 10.1016/B978-0-7234-3658-4.00005-6.
- Ontiveros N, Cabrera-Chávez F. 2015. Nutraceutical/functional and medical foods in food industry. *Industria Alimentaria* 36:26–35.
- Ontiveros N, Flores-Mendoza L, Canizalez-Roman V, Cabrera-Chavez F. 2014. Food allergy: Prevalence and food technology approaches for the control of IgE-mediated food allergy. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences* 2:1029.
- Ontiveros N, Valdez-Meza EE, Vergara-Jimenez MJ, Canizalez-Roman A, Borzutzky A, Cabrera-Chavez F. 2016. Parent-reported prevalence of food allergy in Mexican schoolchildren: A population-based study. *Allergologia et Immunopathologia* 44:563–570. DOI: 10.1016/j.aller.2016.03.003.
- Ortiz T, Para R, Gonipeta B, Reitmeyer M, He Y, Srkalovic I, Ng PKW, Gangur V. 2016. Effect of extrusion processing on immune activation properties of hazelnut protein in a mouse model. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 67:660–669. DOI: 10.1080/09637486.2016.1191445.
- Osborne TB. 1924. The Vegetable Proteins. En: Monographs on Biochemistry. London: Longmans Green and Co. pp xiii+154. DOI: 10.1002/jctb.5000431704.
- Oyoshi MK, Oettgen HC, Chatila TA, Geha RS, Bryce PJ. 2014. Food allergy: Insights into etiology, prevention and treatment provided by murine models. *The Journal of allergy and clinical immunology* 133:309–317. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.12.1045.

- Peñas E, Gomez R, Frias J, Baeza ML, Vidal-Valverde C. 2011. High hydrostatic pressure effects on immunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chemistry* 125:423–429. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.023.
- Pföhler C, Merkoureas A, Müller CS, Vogt T. 2015. Fading due the unfading: Repeated anaphylaxis caused by amaranth grains. *Journal of Allergy and Therapy* 6:5–6. DOI: 10.4172/2155-6121.1000205.
- Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn JK, Fiocchi A, Ebisawa M, Sampson H a, Beyer K, Lee B-W. 2013. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *The World Allergy Organization Journal* 6:21. DOI: 10.1186/1939-4551-6-21.
- Rascón-Cruz Q, Sinagawa-García S, Osuna-Castro JA, Bohorova N, Paredes-López O. 2004. Accumulation, assembly, and digestibility of amarantin expressed in transgenic tropical maize. *Theoretical and Applied Genetics* 108:335–342. DOI: 10.1007/s00122-003-1430-x.
- Rastogi A, Shukla S. 2013. Amaranth: A new millennium crop of nutraceutical values. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53:109–125. DOI: 10.1080/10408398.2010.517876.
- Reyes-Moreno C, Reyes-Fernández PC, Cuevas-Rodríguez EO, Milán-Carrillo J, Mora-Rochín S. 2017. Changes in nutritional properties and bioactive compounds in cereals during extrusion cooking. En: Qamar SZ, editores. *Extrusion of Metals, Polymers and Food Products*. Intech Open. p 103–124. DOI: 10.5772/intechopen.68753.

- Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez EO, Reyes-Fernández PC. 2019. Amaranth. In: Mir SA, Manickavasagan A, Shah MA, editores. Whole Grains: Processing, Product Development, and Nutritional Aspects. CRC Press. p 1–23. DOI: 10.1201/9781351104760.
- Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. 2007. The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120:638–646. DOI: 10.1016/j.jaci.2007.05.026.
- SADER-SIAP. 2019. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. Avance de siembras y cosechas. *Disponible de: <http://www.siap.gob.mx/>*. Consultado el 19 de agosto de 2019.
- Seo JH, Lee JW, Kim JH, Byun EB, Lee SY, Kang IJ, Byun MW. 2007. Reduction of allergenicity of irradiated ovalbumin in ovalbumin-allergic mice. *Radiation Physics and Chemistry* 76:1855–1857. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2007.02.094.
- Shewry PR. 1998. Manipulation of Seed Storage Proteins. En: Lindsey K, editores. Transgenic Plant Research. UK: Harwood Academic Publishers: Reading. p 135–149.
- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. 1995. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *The Plant Cell* 7:945–956. DOI: 10.1105/tpc.7.7.945.
- Sicherer SH, Sampson HA. 2010. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S116–S125. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.08.028.

- Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Burks AW SH. 1999. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 103:559–562.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150:76–85. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- Stanley DW. 1998. Protein Reactions During Extrusion Processing. En: Mercier C, Linko P, Harper JM, editores. Extrusion Cooking”. Minnessota, USA. *American Association of Cereal Chemistry*. p 321–341.
- Tamineedi CVRK, Choudhary R, Perez-Alvarado GC, Watson DG. 2013. Determining the effect of UV-C, high intensity ultrasound and nonthermal atmospheric plasma treatments on reducing the allergenicity of  $\alpha$ -casein and whey proteins. *LWT - Food Science and Technology* 54:35-41 DOI: 10.1016/j.lwt.2013.05.020.
- Tapia-Blácido DR, Sobral PJA, Menegalli FC. 2010. Potential of *Amaranthus cruentus* BRS Alegria in the production of flour, starch and protein concentrate: Chemical, thermal and rheological characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:1185–1193. DOI: 10.1002/jsfa.3946.
- Tehrani M, Sankian M, Assarehzadegan MA, Falak R, Noorbakhsh R, Moghadam M, Jabbari F, Varasteh A. 2011. Identification of a new allergen from *Amaranthus retroflexus* pollen, *Amaranthus retroflexus* 2. *Allergology International* 60:309–16. DOI: 10.2332/allergolint.10-OA-0279.

- Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, Van Ree R, Woolhiser M, Zawodny J. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common *in vitro* pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39:87–98. DOI: 10.1016/j.yrtph.2003.11.003.
- Tong P, Gao J, Chen H, Li X, Zhang Y, Jian S, Wichers H, Wu Z, Yang A, Liu F. 2012. Effect of heat treatment on the potential allergenicity and conformational structure of egg allergen ovomucoid. *Food Chemistry* 131:603–610. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.08.084.
- UniProtKB. 2019. UniProt. Disponible de: <https://www.uniprot.org/uniprot/>. Consultado el 18 de agosto de 2019.
- Untersmayr E, Szalai K, Riemer AB, Hemmer W, Swoboda I, Hantusch B, Schöll I, Spitzauer S, Scheiner O, Jarisch R, Boltz-Nitulescu G, Jensen-Jarolim E. 2006. Mimotopes identify conformational epitopes on parvalbumin, the major fish allergen. *Molecular Immunology* 43:1454–1461. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.07.038.
- Vaswani R, Garg V, Khim B, Huang Y, Vaswani S. 2018. Anaphylactic reaction to amaranth (*Amaranthus paniculatus*). *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 121:S113–S114. DOI: 10.1016/j.anai.2018.09.375.
- Verhoeckx K, Vissers Y, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, Herouet-Guicheney C, Holzhauser T, Shimojo R, van der Bolt N, Wichers H, Kimber I.

2015. Food processing and allergenicity. *Food and Chemical Toxicology* 80:223–240. DOI: 10.1016/j.fct.2015.03.005.
- Villalba M, Barderas R, Mas S, Colás C, Batanero E, Rodríguez R. 2014. Amaranthaceae pollens: Review of an emerging allergy in the mediterranean area. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 24:371–381.
- Waserman S, Watson W. 2011. Food allergy. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* 7:S7. DOI: 10.1186/1710-1492-7-S1-S7.
- Wastling JM, Knight P, Ure J, Wright S, Thornton EM, Scudamore CL, Mason J, Smith A, Miller HRP. 1998. Histochemical and ultrastructural modification of mucosal mast cell granules in parasitized mice lacking the  $\beta$ -chymase, mouse mast cell protease-1. *American Journal of Pathology* 153:491–504. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65592-7.
- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 175:231–237. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90383-1.
- Wright DJ. 1988. The Seed Globulins - part II. En: Hudson BJF, editors. *Developments in Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science. p 119–177.
- Zazueta-Morales J, Martinez-Bustos F, Jacobo-Valenzuela N, Ordorica-Falomir C, Paredes-Lopez O. 2002. Effects of calcium hydroxide and screw speed on physicochemical characteristics of extruded blue maize. *Journal of Food Science* 67:3350–3358. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09590.x.

## ABREVIATURAS

%	Por ciento, porcentaje
°C	Grados Celsius
$\alpha$	Nivel de significancia
AACC	American Association of Cereal Chemists
ac	Ácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALB	Albúminas de amaranto
ALB-C	Albúminas de amaranto crudo
ALB-E	Albúminas de amaranto extrudido
APC	Célula presentadora de antígeno
APS	Persulfato de amonio
b.s.	Base seca
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
Cat	Catálogo
col	Colaboradores
dH <sub>2</sub> O	Agua desionizada
FAO	Food and agriculture organization
FAP	Fosfatasa ácida de papa
Fc $\epsilon$ RI	Receptor $\epsilon$ I de la región de la fracción cristalizable
FGS	Fluido gástrico simulado
GLB	Globulinas de amaranto

GLB-C	Globulinas de amaranto crudo
GLB-E	Globulinas de amaranto extrudido
ha	Hectárea (s)
HCl	Ácido clorhídrico
HR	Humedad relativa
HRP	Peroxidasa de rábano
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IFN- $\gamma$	Interferón- gamma
MCP-1	Proteasa 1 de los mastocitos
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase 2
Min	Minuto (s)
mMCP-1	Proteasa 1 de los mastocitos de ratón
Mod	Modelo
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
OVA	Ovoalbúmina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
SDS	Sulfato dodecil de sodio








SFB	Suero fetal bovino
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
Th-1	Células colaboradoras de tipo 1
Th-2	Células colaboradoras de tipo 2
U	Unidades de actividad enzimática
WHO	World health organization

## ANEXOS

Article

# Assessing the Sensitizing and Allergenic Potential of the Albumin and Globulin Fractions from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Grains before and after an Extrusion Process

Feliznando Isidro Cárdenas-Torres <sup>1</sup>, Cuauhtémoc Reyes-Moreno <sup>1,\*</sup>,  
Marcela de Jesús Vergara-Jiménez <sup>2</sup>, Edith Oliva Cuevas-Rodríguez <sup>1</sup>, Jorge Milán-Carrillo <sup>1</sup>,  
Roberto Gutiérrez-Dorado <sup>1</sup>, Jesús Gilberto Arámburo-Gálvez <sup>3</sup>, Noé Ontiveros <sup>4,\*</sup> and  
Francisco Cabrera-Chávez <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Food Science and Technology Post-Grade, Chemistry-Biological Sciences Faculty, University of Sinaloa, Culiacán 80019, Sinaloa, Mexico; feliznandoc@hotmail.com (F.I.C.-T.); edith.cuevas.r@uas.edu.mx (E.O.C.-R.); jmilanc@uas.edu.mx (J.M.-C.); robe399@hotmail.com (R.G.-D.)

<sup>2</sup> Nutrition Sciences Academic Unit, University of Sinaloa, Culiacán 80019, Sinaloa, Mexico; mjvergara@uas.edu.mx (M.d.J.V.-J.); fcabrera@uas.edu.mx (F.C.-C.)

<sup>3</sup> Department of Chemical and Biological Sciences, University of Sonora, Hermosillo 83000, Sonora, Mexico; gilberto.aramburo.g@gmail.com

<sup>4</sup> Division of Sciences and Engineering, Department of Chemical, Biological, and Agricultural Sciences, University of Sonora, Navojoa 85880, Sonora, Mexico

\* Correspondence: creyes@uas.edu.mx (C.R.-M.); noe.ontiveros@unison.mx (N.O.); Tel.: +52-667-713-7860 (C.R.-M.); +52-642-425-9950 (N.O.)

Received: 22 December 2018; Accepted: 14 March 2019; Published: 20 March 2019



**Abstract:** *Background:* The first cases of food allergy to amaranth grain have recently been published. This pseudocereal is considered hypoallergenic, and there is scarce information about the allergenic potential of amaranth proteins, either before or after food processing. *Objective:* To evaluate, in a mouse model of food allergy, the sensitizing and allergenic potential of extruded and non-extruded albumin and globulin fractions from amaranth grains. *Materials and Methods:* Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) flour was obtained and the albumin and globulin fractions isolated. These protein fractions were also obtained after flour extrusion. An intraperitoneal 28-day protocol was carried out to evaluate the sensitizing and allergenic potential of the proteins. The common and rarely allergenic proteins ovalbumin and potato acidic phosphatase were utilized as reference. Specific IgE and IgG antibodies were evaluated for all the proteins tested. Mast cell protease-1 (mMCP-1) responses were evaluated in serum samples collected after intragastric challenges with the proteins of interest. All serological evaluations were carried out using ELISA. *Results:* Mice were sensitized to the non-extruded albumin fraction from amaranth grains and to ovalbumin ( $p = 0.0045$ ). The extrusion process of amaranth proteins abrogated the IgE responses triggered under non-extruded conditions ( $p = 0.0147$ ). mMCP-1 responses were significantly detected in the group of mice sensitized to ovalbumin ( $p = 0.0138$ ), but not in others. *Conclusions:* The non-extruded albumin fraction from amaranth has the potential to sensitize BALB/c mice, but this sensitizing potential fails to induce detectable serum levels of the mast cell degranulation marker mMCP-1 after intragastric challenges. Furthermore, the extrusion process abolished the sensitization potential of the amaranth albumins.

**Keywords:** food allergy; amaranth; extrusion; murine model; sensitization

## 1. Introduction

Food allergy is defined as a reproducible adverse reaction to food which is mediated by immunological mechanisms. This disorder is the most common cause of allergic reactions, either in children or adults [1]. Individuals are sensitized once B cells produce allergen-specific IgE antibodies and these IgEs are bound by their Fc region to FcεRI receptors present on the cell surface of mast cells [2,3]. Upon re-exposure to the relevant allergen, two adjacent allergen-specific IgEs on the surface of mast cells could crosslink with the allergenic protein, and this triggers the degranulation of the cells, which releases mediators of the allergic response, such as histamine and tryptase, and mast cell protease-1 (MCP-1) [4]. Certainly, sensitization per se is not enough to trigger the symptoms associated with allergic reactions, but is essential for potential IgE-mediated allergic disease.

Food allergy affects 1%–2% of the adult population [5,6] with peanuts, tree nuts, egg, soybeans, fish, crustacea, milk, and wheat being the main allergens [7]. On the contrary, amaranth is considered hypoallergenic, and it is used to replace other commonly allergenic grains in foodstuff formulations. Particularly, amaranth has been used in some Latin American countries as an ingredient to produce muesli bars (traditionally called “alegrías”), but in other regions, it has become popular as an ingredient for industrialized goods (e.g., breakfast cereals, bread, pasta, milk surrogates, and protein isolates, among others) [8]. However, a few cases of amaranth allergy have been reported [9–11]. Although profilin from pollen of *Amaranthus* plants can trigger episodes of respiratory allergies [12,13], this is not the relevant allergen in allergy cases triggered by amaranth ingestion. Evidence suggests that other unidentified proteins with molecular mass greater than profilin are the triggers of allergy reactions in such cases [9]. Notably, recent studies have shown the ability of a murine model to discriminate between common and rarely allergenic proteins [14], and this allows the evaluation of the sensitizing and allergenic potential of proteins before and after food processing.

Certainly, the molecular conformation of proteins could change after food processing, modifying their allergenic characteristics [15]. For instance, some studies have shown that the extrusion process could reduce the number of conformational epitopes in flours containing allergens such as peanuts and hazelnuts [16,17], but other studies have reported no effect of extrusion on the allergenicity of proteins [18]. Amaranth proteins could be used as ingredients to give texture and improve the nutritional quality of extruded food products. However, the impact of food processing, such as extrusion, on the sensitizing and allergenic potential of amaranth proteins remains uncertain. Thus, our aim was to evaluate the effect of the extrusion process on the sensitizing and allergenic potential of the albumin and globulin fractions from amaranth in a BALB/c mouse model of food allergy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Amaranth Flour and Extrusion Process

Amaranth grains (*Amaranthus hypochondriacus*) were purchased at a local market in Temoac, Morelos, Mexico. The grains were cleaned, and amaranth flour was obtained. For the extrusion process, batches of the flour (400 g) were nixtamalized with calcium hydroxide (0.21% (w/w)) and distilled water (28% (w/w)) [19]. The extrusion was carried out in a single-screw extruder model 20DN (CW Brabender Instruments, Inc., New York, NY, USA). The extrusion conditions were screw speed of 124 rpm; moisture = 28%; constant temperature = 130 °C [19]. The extruded product was collected, tempered, dried, and milled (UD Cyclone Sample Mill, UD Corp., Boulder, CO, USA) until a particle size of 0.25 mm was obtained.

### 2.2. Protein Extraction

Proteins were obtained using an extraction kit for total vegetable proteins, following the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Cat. PE0230). A sequential extraction of albumins and globulins was carried out according to the Osborne classification [20]. Briefly, the flour was resuspended in acetone in a 1:10 (w/v) ratio and incubated at 4 °C for 16 h with continuous

stirring. Subsequently, the samples were centrifuged ( $16,000\times g$ , 20 min, 4 °C) and the pellets collected and dried with air at room temperature (12 h). Afterward, the samples were resuspended (100 mg/mL) in distilled water (1 h, continuous stirring) and centrifuged ( $16,000\times g$ , 20 min, 4 °C). The supernatants containing the albumin fraction were collected and the pellets resuspended (100 mg/mL) in 0.05 mol/L Tris-HCl, (pH = 8, 1 h, continuous stirring). After centrifuging as previously described, the supernatants containing the globulin fraction were collected. Both albumin and globulin fractions were dialyzed against distilled water in 1 kDa membranes (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA, Cat. 132105) and lyophilized.

### 2.3. Ovalbumin and Potato Acid Phosphatase Preparations

Ovalbumin (OVA, grade V  $\geq 98\%$  pure, Sigma-Aldrich, Cat. A5503) and potato acid phosphatase (PAP, 0.5–3.0 unit/mg solid, Sigma-Aldrich, P3752) were used as allergenic and hypoallergenic proteins, respectively [21,22]. The proteins were dissolved in PBS (pH 7.4) in order to obtain a 0.2 mg/mL OVA solution and 2.0 mg/mL PAP solution, as previously described [14]. All protein concentrations were measured using the bicinchoninic acid method following the manufacturer's instructions (BCA assay, Thermo Scientific Pierce™, Rockford, IL, USA).

### 2.4. SDS-PAGE Analysis

Total protein and the albumin and globulin fractions were electrophoretically separated in 15% polyacrylamide gels under denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE). Wide Range Molecular Weight Markers (Sigma-Aldrich, Cat. S8445, 6500–200,000 Da) were used, and 20  $\mu\text{g}$  of test protein were loaded per lane. The electrophoresis was run in a Mini-PROTEAN®TGX system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at an initial voltage of 70 V during the first 10 min and at 200 V for additional 2 h. A commercial running buffer was used (Bio-Rad, Cat. 1610732). The gels were stained using Bio-Safe Coomassie stain (Bio-Rad, Cat. 161-0786), and the resulting gel image was digitalized.

### 2.5. Sensitization Protocol and Ethical Aspects

Four- to five-week-old female BALB/c mice ( $n = 6$  per group) were used. All animals (a total of 72) were free of pathogens and were fed a diet free of proteins from amaranth, egg, or potato for at least two generations. Water and food were available ad libitum. The room temperature was maintained at 25 °C, 50%  $\pm$  10% relative humidity, and 12 h light/dark cycle. The ethics review board of the Nutrition Sciences Academic Unit of the Autonomous University of Sinaloa approved the study protocol (Ethical approval number: CE-UACNyG-2014-JUL-001).

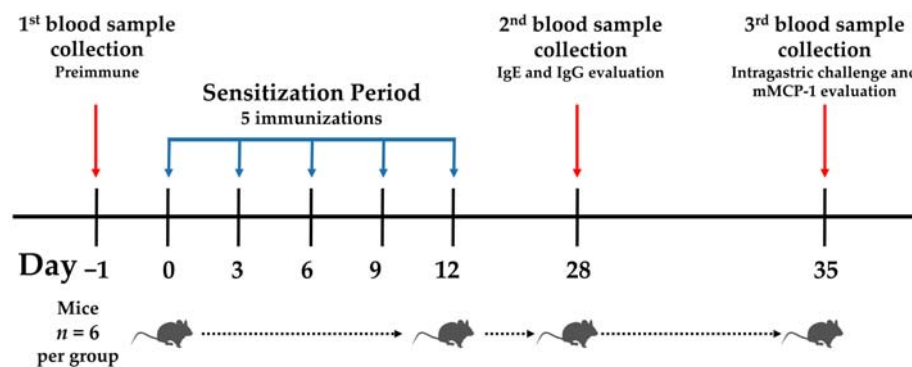
The mice were sensitized as previously described [23]. Briefly, different concentrations of amaranth proteins (0.25, 0.05, or 0.025 mg) were administered intraperitoneally in a final volume of 0.25 mL of PBS, pH 7.4. The treatments were repeated on days 3, 6, 9, and 12 after the first immunization (day 0) (Figure 1). The control groups received PBS only. The mice were bled on days 0, 28, and 35, and serum samples obtained and stored at  $-80$  °C until their use. Taking into account the doses that triggered the highest anti-non-extruded albumin and globulin IgE response (0.05 and 0.25 mg per mouse, respectively), the albumin and globulin fractions from extruded amaranth were administered. OVA and PAP were administered as previously described (0.05 and 0.5 mg per mouse, respectively) [14].

Following sensitization, an intragastric challenge was carried out on day 35. For this purpose, a solution of the relevant protein (0.25 mL at 10 mg/mL) was administered using plastic feeding tubes (Instech Laboratories, Inc., Cat. 20 GA  $\times$  38 mm). After 30 min of challenge, the mice were bled from the tail vein, and serum samples were obtained and stored at  $-80$  °C until their use (Figure 1).

### 2.6. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Specific IgE and IgG antibodies were evaluated using ELISA. Briefly, 96-well microplates (NUNC Maxisorb., Waltham, MA, USA, Cat. 442404) were coated with 100  $\mu\text{L}$  of antigen (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in

coating buffer (BioLegend, Cat. 421701) and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed (three times, 200 µL per well) with PBS/Tween-20 0.05% pH 7.4 and incubated for 2 h at room temperature with 10% fetal calf serum in PBS pH 7.4. After three washes, 100 µL of serum samples diluted 1:10 (IgE) and 1:1000 (IgG) in 10% fetal calf serum were added into the wells and the plates incubated overnight at 4 °C. The plates were washed, as previously described, and 100 µL of biotinylated rat anti-mouse IgEa antibody (BioLegend, Cat. 408804) diluted 1:250 in 10% fetal calf serum (final concentration of 2 µg/mL) was added to each well and incubated for 1 h at room temperature. For the detection of IgG antibodies, a rat anti-mouse IgG antibody was used (BioLegend, Cat. 405303). After washing, 100 µL of streptavidin-horseradish peroxidase diluted 1:1000 in ELISA diluent (BioLegend, Cat. 405210) was added to each well, and the plates were incubated at room temperature for 30 min. Finally, after six washes, 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB, Thermo Scientific, Cat. 34028, Rockford, IL, USA) was added and the plates incubated in the dark to allow color development. The reaction was stopped with 50 µL of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The time for color development was 3 min for IgG and 30 min for IgE. The absorbance was measured at 450 nm in a microplate reader (Thermo Scientific, Cat. 51119000). All sera were analyzed in duplicate.



**Figure 1.** Sensitization protocol and intragastric challenge.

### 2.7. mMCP-1 Serum Evaluation

Mouse mastocyte protease 1 (mMCP-1) was evaluated with a commercially available ELISA kit (BioLegend, Cat. 432702) following the manufacturer's instructions. The reaction was stopped with 50 µL of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The time for color development was 15 min and the absorbance was read at 450 nm. The concentrations of mMCP-1 in the serum samples were calculated using standard curves.

### 2.8. Statistical Analysis

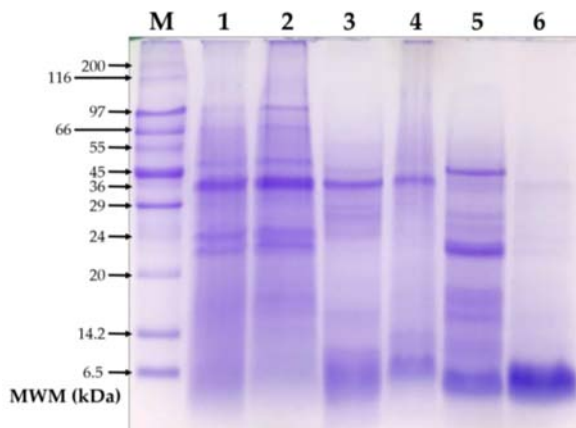
Data were analyzed using GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In order to test the normality of the data, the Kolmogorov–Smirnov test was used. For multiple comparisons, ANOVA and Tukey tests were used. Kruskal–Wallis test and Dunn's test were used to compare the data that failed in normality. Normally distributed data were expressed as mean and standard deviation. Non-normally distributed data were expressed as median and interquartile range. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. SDS-PAGE

Figure 2 shows the electrophoretic pattern of the total protein and protein fractions from non-extruded and extruded amaranth. The electrophoretic pattern of total proteins remained consistent before and after extrusion (Figure 2, lanes 1 and 2). However, the pattern of the albumin and globulin fractions changed after the extrusion process (Figure 2, lanes 3–6). Overall, albumin and globulin

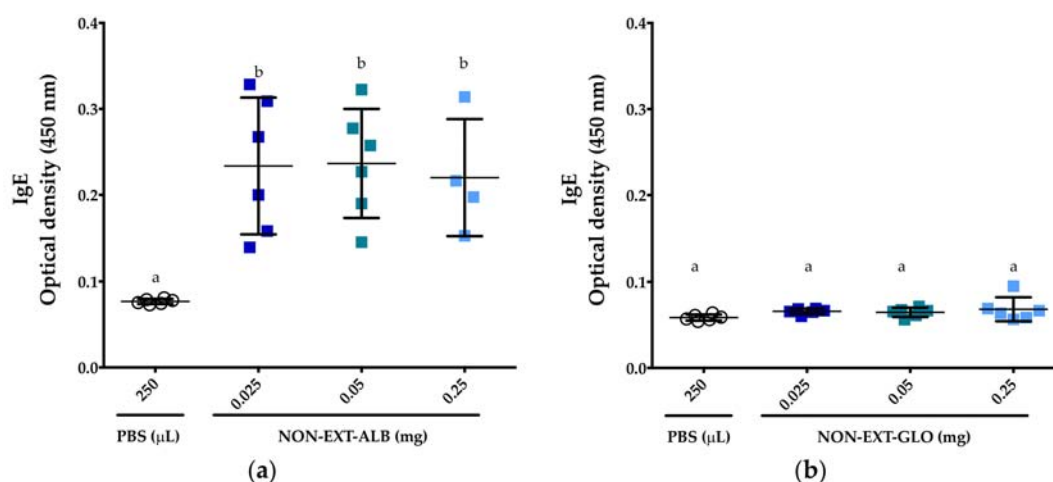
fractions from non-extruded amaranth showed more protein bands than their extruded counterparts. The protein bands between 24 and 29 kDa, which are visible in the albumins from non-extruded amaranth, were not detected after the extrusion process. In the globulin fraction, most protein bands between 14.2 and 45 kDa were not detected in the globulin fraction from extruded amaranth.



**Figure 2.** Electrophoretic pattern of proteins. **M:** Wide Range Molecular Weight Marker; **1:** Total protein of non-extruded amaranth; **2:** Total protein of extruded amaranth; **3:** Albumin fraction of non-extruded amaranth; **4:** Albumin fraction of extruded amaranth; **5:** Globulin fraction of non-extruded amaranth; **6:** Globulin fraction of extruded amaranth.

### 3.2. Albumins, But Not Globulins, Trigger Consistent IgE Responses in BALB/c Mice

IgE responses were detected in all mice that were administered the non-extruded albumin fraction from amaranth, and this was independent of the protein dose administered (Figure 3a). Compared to the control group, the responses were statistically significant for all the protein concentrations evaluated ( $p < 0.05$ ). On the contrary, no IgE responses were detected in the groups of mice that were administered the globulin fraction from amaranth ( $p > 0.05$ ) (Figure 3b). Based on these results, and considering the available proteins, further studies were carried out using the concentrations of 0.05 and 0.25 mg of amaranth proteins.

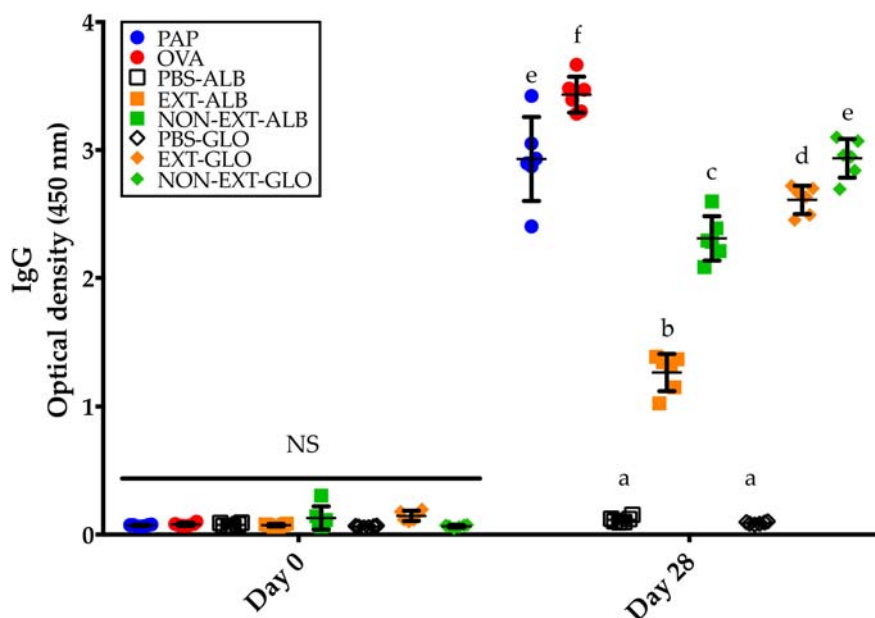


**Figure 3.** IgE responses to albumins and globulins. (a) Responses to the albumin fraction from non-extruded amaranth (NON-EXT-ALB); (b) Responses to the globulin fraction from non-extruded amaranth (NON-EXT-GLO). All serum samples tested were collected after the mice underwent a 28-day protocol of sensitization. PBS: Phosphate-buffered saline. Comparisons in each figure were carried out using ANOVA/Tukey tests. Vertical bars indicate standard deviations. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



### 3.3. Amaranth Protein Fractions, Ovalbumin, and Potato Acid Phosphatase Trigger IgG Responses

In order to verify that all the proteins tested were immunologically relevant, the IgG responses were evaluated. As expected, no IgG responses were detected in pre-immune sera (Figure 4; day 0). Contrary and compared to the control group, significant IgG responses were detected in all the groups of mice immunized with the different proteins tested ( $p < 0.05$ ) (Figure 4; day 28).



**Figure 4.** IgG responses to the different proteins tested. The evaluations were carried out in serum samples collected before and after the mice underwent the 28-day sensitization protocol. PAP: Potato acidic phosphatase (0.5 mg); OVA: Ovalbumin (0.05 mg); PBS-ALB: Phosphate-buffered saline as control for albumins; EXT-ALB: Extruded albumins (0.05 mg); NON-EXT-ALB: Non-extruded albumins (0.05 mg); PBS-GLO: Phosphate-buffered saline as control for globulins; EXT-GLO (0.25 mg): Extruded globulins; NON-EXT-GLO: Non-extruded globulins (0.25 mg). Comparisons at day 0 and 28 were carried out separately using ANOVA/Tukey tests. Vertical bars indicate standard deviations. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

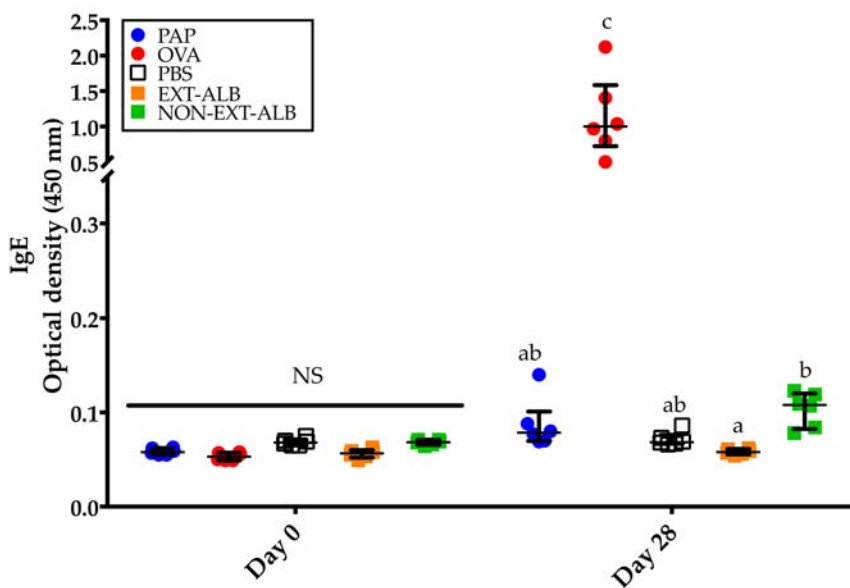
### 3.4. The Extrusion Process Abolishes the IgE Immune Response Triggered by Amaranth Albumins

Consistent with previous experiments carried out in this study, the mice that underwent the 28-day protocol of sensitization, and were administered the non-extruded albumin fraction from amaranth, triggered an IgE immune response ( $p < 0.05$ , compared to the other proteins tested, except OVA) (Figure 5). This response was not detectable in a comparable group of mice that was administered the extruded albumin fraction from amaranth (Figure 5). As expected, OVA triggered the most robust IgE immune responses ( $p < 0.05$ , compared to the other proteins tested) (Figure 5). No IgE immune responses were detected after the administration of the remaining proteins tested (Figure 5).

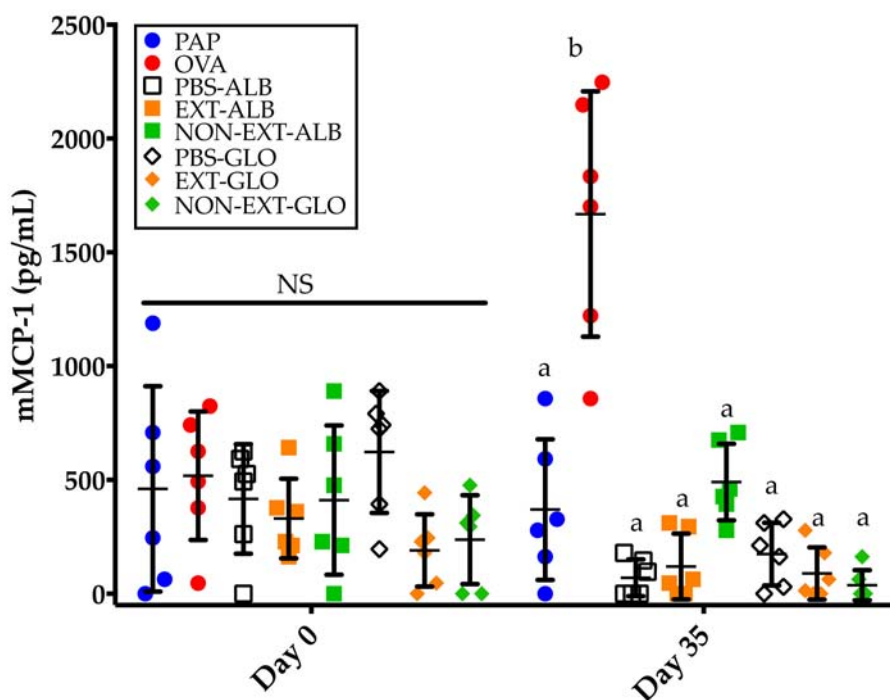
### 3.5. Mice Sensitized to Amaranth Albumins Fail to Trigger mMCP-1 Responses

In order to evaluate the effector phase of food allergy, the mastocyte degranulation marker mMCP-1 was assessed. After an intragastric challenge, only the group of mice sensitized to OVA showed detectable levels of mMCP-1 ( $p < 0.05$ , compared to the other groups) (Figure 6). All the other groups failed to trigger mMCP-1 responses, even the group that was administered the non-extruded albumin fraction from amaranth (Figure 6), a fraction that showed the potential to trigger a weak and consistent IgE immune response readily detectable using ELISA (Figures 3a and 5).





**Figure 5.** IgE responses to different proteins tested. The evaluations were carried out in serum samples collected before and after the mice underwent the 28-day sensitization protocol. PAP: Potato acidic phosphatase (0.5 mg); OVA: Ovalbumin (0.05 mg); PBS: Phosphate-buffered saline; EXT-ALB: Extruded albumins (0.05 mg); NON-EXT-ALB: Non-extruded albumins (0.05 mg). Comparisons at day 0 and 28 were carried out separately using Kruskal–Wallis/Dunn tests. Vertical bars indicate interquartile ranges. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Serum mMCP-1 concentrations before (day 0) and after (day 35) intragastric challenges (2.5 mg). PAP: Potato acidic phosphatase (0.5 mg); OVA: Ovalbumin (0.05 mg); PBS-ALB: Phosphate-buffered saline as control for albumins; EXT-ALB: Extruded albumins (0.05 mg); NON-EXT-ALB: Non-extruded albumins (0.05 mg); PBS-GLO: Phosphate-buffered saline as control for globulins; EXT-GLO: Extruded globulins (0.25 mg); NON-EXT-GLO: Non-extruded globulins (0.25 mg). Comparisons at day 0 and 35 were carried out separately using ANOVA/Tukey tests. Vertical bars indicate standard deviations. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

In this study, the sensitizing and allergenic potential of the albumin and globulin fractions from non-extruded and extruded amaranth were evaluated. The SDS-PAGE analysis of proteins showed that there were no changes in the electrophoretic pattern of the total amaranth proteins extracted either before or after extrusion, but the pattern of the albumin and globulin fractions changed after the extrusion process. These discrepancies in the electrophoretic patterns can be attributed to the methods of protein extraction employed. On the one hand, total amaranth proteins were extracted using a method that involves chaotropic and reducing compounds, which ensure increased solubility of proteins. On the other hand, the albumin and globulin fractions were extracted using either water for albumins, or Tris-HCl (pH = 8) for globulins, without the use of chaotropic and reducing compounds [20]. Overall, the results support the notion that some amaranth proteins could lose their solubility in aqueous solutions after extrusion processing [24].

We and others have shown that the dose of allergen, as well as the number and frequency of immunizations, are key factors to sensitize BALB/c mice to food proteins [14,25,26]. The adjuvant-free 28-day protocol with five immunizations used in the present study was shown to be effective to detect even allergens that hardly trigger IgE immune responses after intraperitoneal administration [14]. The globulin fraction from amaranth was tested at three doses, but no anti-globulin IgE responses were detected either under extruded or non-extruded conditions. By contrast, robust anti-globulin IgG immune responses were triggered, highlighting that the doses of protein tested were immunologically relevant. These results could be limited by the fact that, in ELISA evaluations, low titers of allergen-specific IgE antibodies could be masked by the presence of allergen-specific IgGs [14]. Although the serum samples were not tested after IgG depletion, there was no increase of mMCP-1 in the sera of mice collected after intragastric challenge with the globulins of interest. Thus, it can be hypothesized that amaranth globulins are unlikely to trigger allergic disease after oral exposure due to a lack of, or quite low, sensitizing potential.

The non-extruded globulin fraction from amaranth triggered an IgE immune response. This response was weak compared to the anti-OVA IgE response, but consistent among all the independent experiments carried out. Based on our results, the characteristics of the albumin allergenic epitopes that give rise to sensitization in BALB/c mice remain uncertain. Conformational epitopes are unlikely to trigger allergic disease in food allergy cases since these epitopes are degraded after ingestion by gastric or intestinal enzymes [27]. Linear epitopes are thought to be the main epitopes implicated in food allergy. However, intragastric challenge of mice sensitized to non-extruded albumin failed to increase the serum levels of the mastocyte degranulation marker mMCP-1. Our results show that amaranth albumins have the potential to sensitize and are more likely than globulins to trigger allergic reactions after amaranth ingestion.

Contrary to the non-extruded albumin fraction from amaranth, the extruded fraction failed to trigger an IgE immune response. Furthermore, it failed to increase the serum levels of mMCP-1 after intragastric challenge with the protein of interest. The lack of anti-albumin IgE responses could be attributed to the loss of allergenic epitopes as a consequence of the extrusion process, since some protein bands were missed after extrusion. Previous studies have shown that the extrusion process negatively impacts the sensitizing and allergenic potential of food allergens, either reducing the IgE immune responses triggered or lowering the serum levels of mMCP-1 [16,17]. Taken together, under the basis of the sensitizing and allergenic potential evaluations in a murine model, the results show that amaranth albumins and globulins can be considered as hypoallergenic ingredients in foodstuff formulations, especially when the food processing involves an extrusion process.

Finally, we should acknowledge that our study has some limitations. Firstly, the mouse model used has to be better validated although it was shown to be effective in discriminating between common and rarely allergenic proteins, such as OVA and PAP. Secondly, due to evidence suggesting that cases of food allergy to amaranth exist [9–11], studies on amaranth allergy patients including skin-prick tests and oral challenges are required to make definitive conclusions about the allergenic

potential of the albumin and globulin fractions from amaranth. Besides these limitations, our study contributes to understanding the impact of food processing on the allergenicity of proteins and serves as evidence in the search of a validated animal model to evaluate the inherent sensitizing and allergenic potential of proteins.

## 5. Conclusions

The non-extruded albumin fraction from amaranth has the potential to trigger weak anti-albumin IgE responses. However, this sensitizing potential is not enough to detect, in serum samples, the mastocyte degranulation marker mMCP-1 after intragastric challenges with amaranth albumins. Notably, the extrusion process abolished the sensitizing potential of amaranth albumins. This study suggests that amaranth could be used as a surrogate for other recognized allergenic grains, such as wheat and soy.

**Author Contributions:** Conceptualization, F.C.-C. and N.O.; methodology, F.I.C.-T.; validation, F.C.-C., C.R.-M. and N.O.; formal analysis, F.C.-C. and N.O.; investigation, F.I.C.-T.; resources, F.C.-C.; data curation, F.I.C.-T. and J.G.A.-G.; writing—original draft preparation, F.I.C.-T.; writing—review and editing, C.R.-M., M.d.J.V.-J., E.O.C.-R., J.M.-C., R.G.-D., J.G.A.-G., F.C.-C. and N.O.; supervision, F.C.-C. and N.O.; project administration, F.C.-C.; funding acquisition, F.C.-C.

**Funding:** This research was funded by Mexican Council of Science and Technology (CONACyT), grant number CB-2014-01 240300 given to Francisco Cabrera-Chávez.

**Acknowledgments:** The author thanks to Giovanni Ramirez Torres and Jorge Luis García Sanz for technical assistance. F.I.C.-T. and J.G.A.-G. received fellowships from CONACyT.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

1. Casañal, A.; Zander, U.; Dupeux, F.; Valpuesta, V.; Marquez, J.A. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the strawberry allergens Fra a 1E and Fra a 3 in the presence of catechin. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69*, 510–514. [[CrossRef](#)]
2. Wasserman, S.; Watson, W. Food allergy. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2011**, *7*, S7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. He, S.; Zhang, H.; Zeng, X.; Yang, P. Self-Amplification Mechanisms of Mast Cell Activation: A New Look in Allergy. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1329–1339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wastling, J.M.; Knight, P.; Ure, J.; Wright, S.; Thornton, E.M.; Scudamore, C.L.; Mason, J.; Smith, A.; Miller, H.R.P. Histochemical and ultrastructural modification of mucosal mast cell granules in parasitized mice lacking the  $\beta$ -chymase, mouse mast cell protease-1. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 491–504. [[CrossRef](#)]
5. Sicherer, S.H.; Muñoz-Furlong, A.; Burks, A.W.; Sampson, H.A. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the US determined by a random digit dial telephone survey. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1999**, *103*, 559–562. [[CrossRef](#)]
6. Ontiveros, N.; Flores-Mendoza, L.; Canizalez-Roman, V.; Cabrera-Chavez, F. Food Allergy: Prevalence and Food Technology Approaches for the Control of IgE-mediated Food Allergy. *Austin J. Nutr. Food Sci.* **2014**, *2*, 1029.
7. Food and Agriculture Organization (FAO). *Foods Derived from Modern Biotechnology*; Codex Alimentarius; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2009.
8. Matías-Luis, G.; Hernández-Hernández, B.R.; Peña-Caballero, V.; Torres-López, N.G.; Espinoza-Martínez, V.A.; Ramírez-Pacheco, L. Current and potential uses of Amaranth (*Amaranthus* spp.). *J. Negat. No Posit. Results* **2018**, *3*, 423–436. [[CrossRef](#)]
9. Kasera, R.; Niphadkar, P.V.; Saran, A.; Mathur, C.; Singh, A.B. First case report of anaphylaxis caused by Rajgira seed flour (*Amaranthus paniculatus*) from India: A clinico-immunologic evaluation. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* **2013**, *31*, 79–83.
10. Pföhler, C.; Merkouras, A.; Müller, C.S.; Vogt, T. Fading Due the Unfading: Repeated Anaphylaxis Caused by Amaranth Grains. *J. Allergy Ther.* **2015**, *6*, 5–6. [[CrossRef](#)]
11. Deluze, C.; Beaumont, P. Allergie alimentaire à la graine d'amarante. *Rev. Fr. Allergol.* **2017**, *57*, 337–340. [[CrossRef](#)]

12. Tehrani, M.; Sankian, M.; Assarehzadegan, M.A.; Falak, R.; Noorbakhsh, R.; Moghadam, M.; Jabbari, F.; Varasteh, A. Identification of a new allergen from *Amaranthus retroflexus* pollen, *Amaranthus retroflexus*. *Allergol. Int.* **2011**, *60*, 309–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Villalba, M.; Barderas, R.; Mas, S.; Colás, C.; Batanero, E.; Rodríguez, R. Amaranthaceae pollens: Review of an emerging allergy in the mediterranean area. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* **2014**, *24*, 371–381.
14. Arámburo-Galvez, J.G.; Sotelo-Cruz, N.; Flores-Mendoza, L.K.; Gracia-Valenzuela, M.H.; Chiquete-Elizalde, F.I.R.; Espinoza-Alderete, J.G.; Trejo-Martínez, H.; Canizalez-Román, V.A.; Ontiveros, N.; Cabrera-Chávez, F. Assessment of the Sensitizing Potential of Proteins in BALB/c Mice: Comparison of Three Protocols of Intraperitoneal Sensitization. *Nutrients* **2018**, *10*, 903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Besler, M.; Steinhart, H.; Paschke, A. A Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2001**, *756*, 207–228. [[CrossRef](#)]
16. Chen, L.; Phillips, R.D. Effects of twin-screw extrusion of peanut flour on in vitro digestion of potentially allergenic peanut proteins. *J. Food Prot.* **2005**, *68*, 1712–1719. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ortiz, T.; Para, R.; Gonipeta, B.; Reitmeyer, M.; He, Y.; Srkalovic, I.; Ng, P.K.W.; Gangur, V. Effect of extrusion processing on immune activation properties of hazelnut protein in a mouse model. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *67*, 660–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Álvarez-Álvarez, J.; Guillamón, E.; Crespo, J.F.; Cuadrado, C.; Burbano, C.; Rodríguez, J.; Fernández, C.; Muzquiz, M. Effects of extrusion, boiling, autoclaving, and microwave heating on lupine allergenicity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1294–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Milán-Carrillo, J.; Montoya-Rodríguez, A.; Gutiérrez-Dorado, R.; Perales-Sánchez, X.; Reyes-Moreno, C. Optimization of Extrusion Process for Producing High Antioxidant Instant Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Flour Using Response Surface Methodology. *Appl. Math.* **2012**, *3*, 1516–1525. [[CrossRef](#)]
20. Osborne, T.B. The vegetable proteins. In *Monographs on Biochemistry*; Longmans Green and Co.: London, UK, 1924; Volume 43.
21. Dearman, R.J.; Kimber, I. Determination of protein allergenicity: Studies in mice. *Toxicol. Lett.* **2001**, *120*, 181–186. [[CrossRef](#)]
22. Dearman, R.J.; Caddick, H.; Stone, S.; Basketter, D.A.; Kimber, I. Characterization of antibody responses induced in rodents by exposure to food proteins: Influence of route of exposure. *Toxicology* **2001**, *167*, 217–231. [[CrossRef](#)]
23. Chen, C.; Sun, N.; Li, Y.; Jia, X. A BALB/c mouse model for assessing the potential allergenicity of proteins: Comparison of allergen dose, sensitization frequency, timepoint and sex. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *62*, 41–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cabrera-Chávez, F.; Calderón de la Barca, A.M.; Islas-Rubio, A.R.; Marti, A.; Marengo, M.; Pagani, M.A.; Bonomi, F.; Iametti, S. Molecular rearrangements in extrusion processes for the production of amaranth-enriched, gluten-free rice pasta. *LWT—Food Sci. Technol.* **2012**, *47*, 421–426. [[CrossRef](#)]
25. Morin, S.; Bernard, H.; Przybylski-Nicaise, L.; Corthier, G.; Rabot, S.; Wal, J.M.; Hazebrouck, S. Allergenic and immunogenic potential of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin and caseins evidenced without adjuvant in germ-free mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1700–1707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ladics, G.S.; Knippels, L.M.J.; Penninks, A.H.; Bannon, G.A.; Goodman, R.E.; Herouet-Guicheney, C. Review of animal models designed to predict the potential allergenicity of novel proteins in genetically modified crops. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *56*, 212–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Micinski, J.; Kowalski, I.M.; Zwierzchowski, G.; Szarek, J.; Pieroyński, B.; Zablocka, E. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Ann. Med.* **2013**, *20*, 69–76. [[CrossRef](#)]





CONACYT



Centro de Investigación  
en Alimentación y Desarrollo



El Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo  
y la Universidad Autónoma de Sinaloa, otorgan la presente

## CONSTANCIA

A:

Cárdenas-Torres FI, Cabrera-Chávez F, Reyes-Moreno C, Cuevas-Rodríguez EO, Gutiérrez-Dorado R, Milán-Carrillo J

Por su participación como Ponente en Cartel con el tema "EFECTO DE EXTRUSIÓN DE AMARANTO SOBRE POTENCIAL ALERGÉNICO DE FRACCIONES PROTEICAS EN UN MODELO MURIN" en el

3er Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos.  
Mazatlán, Sinaloa, del 20 al 22 de junio del 2018

Dr. Gustavo A. González Aguilar  
Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo

Dr. Aarón F. González Córdova  
Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo

Dr. Jorge Milán Carrillo  
Universidad Autónoma de Sinaloa



1918-  
2018

En el año  
del centenario  
de la Reforma  
Universitaria



## Seminario de Actualización y Perfeccionamiento

Por cuanto **Felznando Cárdenas Torres**, se ha desempeñado como DISERTANTE del Seminario "Avances en Investigación Científica y Tecnológica en materia de Alergias Alimentarias" en el marco del Proyecto de Investigación "*Prevalencia por Reporte Parental de Reacciones Alérgicas a los Alimentos en Población Infantil Escolar de Santa Fe, Argentina*", dictado en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas el 16 de abril de 2018.

Se le extiende el presente Certificado, en la ciudad de Santa Fe, el 16 de abril de 2018.

  
Msc. Gimena Dezar  
Directora de Extensión Social y Cultural

  
Téc. Adriana Vidacheta  
Secretaria Administrativa

  
Susy Adriana Ortolan  
Decana



# Aula Virtual Bioterio



Formación Profesional para el Uso Responsable de los Animales de Laboratorio

Certifica que

*Feliznando Isidro Cárdenas Torres*

Ha aprobado el Curso Modalidad Virtual

*“Procedimientos Experimentales en ratas, ratones y conejos”*

Realizado del 1 de abril al 29 de abril de 2019.

Carga horaria: 40 horas

Calificación: 90/100

María Emiliana Herrero  
TUTORA

Micaela María Ricca  
TUTORA

Ana Carolina Mourelle  
COORDINADORA GENERAL

[www.labanimalstraing.com](http://www.labanimalstraing.com)



Faculdade de Juazeiro do Norte  
Formando os melhores profissionais.



Juazeiro do Norte 27 de agosto de 2019

Senhor Feliznando Isidro Cárdenas Torres

Prezado colega,

Temos a honra de convidá-lo a participar de nosso “I Congresso Científico de Juazeiro do Norte”, o qual ocorrerá nos dias “26,27,28 e 29 de novembro de 2019”, na Faculdade de Juazeiro do Norte – FJN, com sede na cidade de Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil, em caráter de **PARTICIPANTE MESA REDONDA**.

Sessão: **Mesa Redonda (Debate)**

Tema: **“Pesquisa Científica e seu impacto no desenvolvimento do México”**

Dia: **29 de novembro de 2019**

Local: **auditório da Faculdade de Juazeiro do Norte**

Tempo de apresentação: **40 minutos para explanação do tema e 30 para questionamentos**

Coordenadores: **Profs. Maria Auxiliadora Macedo Callou e Élide Mara Braga Rocha**

Agradecemos a confirmação ou declinação deste convite,

**A Faculdade de Juazeiro do Norte arcará com as despesas de hospedagem durante o período do Evento**

Agradecemos desde já sua atenção e valiosa participação, e permanecemos à disposição para quaisquer outras dúvidas.

Atenciosamente,

Maria Auxiliadora Macedo Callou (Comissão de Palestras)

Élide Mara Braga Rocha (Comissão Científica)