

PROTEÓMICA *SHOTGUN* PARA LA CARACTERIZACIÓN INTEGRAL DE GRANOS DE QUINOA: UNA HERRAMIENTA PROMETEDORA EN EL CAMPO DE LA INMUNONUTRICIÓN

Laura Pont^{1,2}, Rocío Galindo-Luján¹, Victoria Sanz-Nebot¹, Fernando Benavente¹

¹Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica, Instituto de Investigación en Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA-UB), Universidad de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona

²Programa Serra Húnter, Generalitat de Catalunya, 08007 Barcelona

E-mail: laura.pont@ub.edu, www.ub.edu/bioanalisi

1. Introducción

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una planta herbácea nativa del altiplano de los Andes, perteneciente a la subfamilia *Chenopodioideae* de las amarantáceas. Los principales países productores de quinoa son Argentina, Bolivia, Ecuador, Estados Unidos, Chile, Colombia y Perú [1], aunque su cultivo se está extendiendo con gran éxito a diversos países de Europa y Asia [1]. En la última década, la quinoa ha despertado un gran interés como alternativa al cultivo de cereales por su excelente valor nutritivo, llegando a ser ampliamente promocionada también por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), quién declaró el año 2013 como el "Año Internacional de la Quinoa" [2].

Los granos de quinoa son la parte de la planta más comercializada, principalmente debido a su alto contenido en compuestos bioactivos (por ejemplo, saponinas, terpenos y polifenoles), aminoácidos esenciales, almidón, minerales y, en especial, proteínas de alta calidad [3]. En los últimos años, numerosos estudios han avalado los efectos beneficiosos de la ingesta de proteínas de la quinoa sobre la salud humana que, debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antimicrobianas, antiinflamatorias, anticarcinogénicas y antioxidantes, podrían intervenir en la prevención de diferentes enfermedades, como obesidad, infecciones, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, entre otras [4]. Sin embargo, la mayor parte de estos trabajos se centran en evaluar experimentalmente la actividad biológica de proteínas específicas [5-6], mientras que los estudios no dirigidos (*untargeted*) enfocados en proporcionar una lista exhaustiva de proteínas de quinoa potencialmente bioactivas y beneficiosas para la salud son limitados [7].

En las últimas décadas, el incremento de numerosas enfermedades se ha vinculado con un descenso de la inmunidad, lo que está estrechamente relacionado con factores del estilo de vida, como la actividad física, el descanso, el estrés y, en especial, los hábitos alimentarios [8]. Hoy en día, la inmunonutrición se presenta como una estrategia prometedora para regular enfermedades influenciadas por el sistema inmunitario, como el cáncer [9]. Consiste en la incorporación de nutrientes inmunomoduladores y antiinflamatorios en la dieta [10]. Estos nutrientes pueden provenir, por ejemplo, de proteínas bioactivas de origen vegetal y de los péptidos generados tras su hidrólisis [11]. Dependiendo de su grado

de biodisponibilidad, estos péptidos pueden resistir la acción de las enzimas digestivas durante su tránsito por el tracto gastrointestinal y la barrera epitelial intestinal, llegando intactos a los órganos diana para ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud [12]. Dentro del grupo de proteínas y péptidos bioactivos con funciones inmunonutricionales, destacan los péptidos antimicrobianos (AMPs), los péptidos inducidos por el estrés oxidativo (OSIPs) y los inhibidores de proteasas tipo serina (STPIs) [13-15].

Este artículo presenta una estrategia proteómica *shotgun* basada en la utilización de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), en combinación con el entorno de trabajo *Andromeda/MaxQuant*, para caracterizar exhaustivamente los extractos proteicos de cuatro clases de granos de quinoa comerciales: quinoa negra (N), roja (R), blanca de Perú (B) y blanca de Bolivia, también conocida como quinoa real (RE) [16]. Una vez generado el mapa proteico experimental de las distintas clases de quinoa, se describe un sencillo procesamiento de datos (*data mining*) para comparar el grado de similitud entre las secuencias de proteínas de quinoa identificadas y las secuencias de proteínas de otras especies vegetales reconocidas en la base de datos del *Center for Biotechnology Information* (NCBI) por sus propiedades inmunonutricionales, específicamente AMPs, OSIPs y STPIs [17]. La estrategia de caracterización integral aquí descrita ha permitido establecer el mapa más completo hasta la fecha de proteínas provenientes de granos de quinoa con potenciales propiedades inmunonutricionales, sirviendo como punto de partida para futuras evaluaciones de la actividad biológica y la biodisponibilidad de las proteínas y péptidos más prometedores [16-17].

2. Proteómica *shotgun* para la caracterización integral de granos de quinoa [16]

2.1. Análisis por LC-MS/MS

La proteómica *shotgun* implica la digestión enzimática de las proteínas para generar los correspondientes péptidos, los cuales se analizan posteriormente mediante LC-MS/MS. Por consiguiente, una digestión eficiente de las proteínas, generalmente realizada con tripsina como enzima proteolítica selectiva de referencia, es fundamental para una identificación fiable y amplia [18]. La utilización de cromatografía de líquidos de alta resolución y,

especialmente, de espectrómetros de masas de alta resolución, también es crucial. En el estudio descrito en este artículo, se empleó un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion™ Lumos™ para caracterizar el proteoma de las diferentes clases de granos de quinoa (N, R, B y RE) [16]. En comparación con generaciones anteriores de Orbitraps, como el Linear Trap Quadrupole-Orbitrap, este espectrómetro de masas ha mejorado significativamente la sensibilidad y la velocidad en los análisis, lo que permite identificar un mayor número de proteínas [19]. En el estudio presentado, tras llevar a cabo un sencillo tratamiento de muestra para la extracción de las proteínas de los granos de quinoa, se realizaron experimentos de proteómica *shotgun* mediante LC-MS/MS para caracterizar exhaustivamente los diferentes extractos proteicos [16].

2.2. Procesamiento de datos

El procesamiento de datos continúa representando uno de los principales desafíos en la investigación dentro del campo de la proteómica. La alta complejidad de las muestras derivadas de la digestión enzimática de las proteínas ha impulsado la evolución de la proteómica computacional como un área clave para la identificación y cuantificación de proteínas. En este contexto, *Andromeda/MaxQuant* se destaca como un entorno de trabajo en proteómica computacional que permite recopilar y procesar datos cualitativos y cuantitativos de manera más eficiente y rigurosa que otros entornos [20].

En este estudio, se utilizó *MaxQuant/Andromeda* en combinación con un archivo FASTA que contenía secuencias de proteínas de quinoa (63373 entradas) obtenidas de la base de datos no redundante *Reference Sequence* (RefSeq) del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) para llevar a cabo la identificación y cuantificación de proteínas en los extractos proteicos de las diferentes clases de granos de quinoa. Mediante esta estrategia, se logró la identificación y cuantificación de un total de 1211 proteínas [16]. Este resultado representa un aumento significativo en comparación con las 337 proteínas informadas por Burrieza et al. en un trabajo anterior, donde se emplearon un protocolo de extracción, un espectrómetro de masas y un método de procesamiento de datos distintos [21]. El diagrama de Venn de la Figura 1 muestra las relaciones entre las proteínas identificadas en las cuatro clases de granos de quinoa. Tal y como se puede observar, se identificó un número total similar de proteínas en todas las clases (1073, 997, 982 y 964 en quinoa B, N, R y RE, respectivamente). De estas proteínas, 805 (66% del total) se encontraron en quinoa B, N, R y RE, mientras que 406 (34% del total) se hallaron únicamente en algunas de las clases. Además, 88 proteínas se identificaron exclusivamente en quinoa B, 30 en N, 21 en R y 17 en RE, sugiriendo diferencias significativas en los perfiles proteómicos de las cuatro clases de granos de quinoa estudiadas.

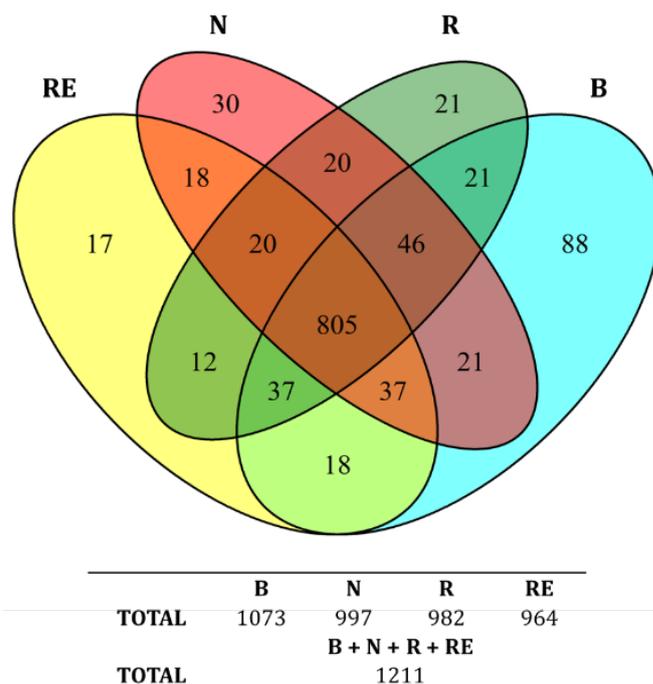


Figura 1. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en las cuatro clases de granos de quinoa: B, N, R y RE.

A pesar de que el diagrama de Venn proporcionó una visión general de la relación entre el número de proteínas identificadas en las distintas clases de granos de quinoa, también fue necesario considerar las diferencias a nivel de concentración para realizar una comparación más exhaustiva. Con este objetivo, se construyó un mapa de calor (*heat map*) (<http://www.heatmapper.ca>) a partir de una matriz de datos que contenía las intensidades normalizadas (*label-free quantification, LFQ*) promedio (n=3) para las 805 proteínas identificadas en las cuatro clases. En los *heat maps*, las filas y las columnas se reorganizan para agrupar aquellas con perfiles similares, mostrando cada puntuación *z-score* de la matriz de datos a través de una representación de color, lo que facilita la visualización gráfica de las relaciones. Además, se emplea un algoritmo de agrupación jerárquica aglomerativa (*agglomerative hierarchical clustering*) para organizar los datos según los perfiles característicos observados. Cuando dos grupos están conectados, se traza una línea a una altura que refleja la similitud entre los grupos [22]. Tal y como se aprecia en la Figura 2, cada clase de grano de quinoa mostró un perfil de concentración de proteínas característico, representando los cuadros verdes, rojos y negros proteínas sobreexpresadas, infraexpresadas y sin alteraciones en su concentración, respectivamente. Además, en la figura se puede observar que las clases R y N se agruparon conjuntamente, seguidas por la RE y, por último, la clase B, que, según los clústeres formados, presentaba un perfil más diferenciado. Las similitudes y diferencias observadas entre las proteínas identificadas en las distintas clases de quinoa podrían atribuirse a las características genéticas individuales de cada grano, junto con las condiciones agroecológicas del cultivo, entre otros factores.

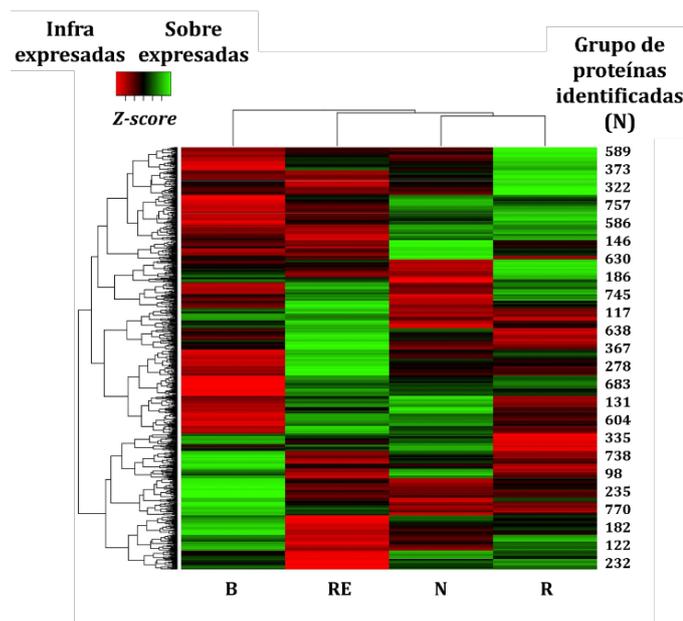


Figura 2. Heat map obtenido a partir de las intensidades LFQ normalizadas para las proteínas identificadas en las cuatro clases de granos de quinoa: B, N, R y RE. El número del grupo de proteínas identificadas (N) se puede consultar en [16].

3. Data mining para la identificación de proteínas de quinoa con propiedades inmunonutricionales [17]

Una vez caracterizados los extractos proteicos de las diferentes clases de granos de quinoa, se examinó detalladamente el mapa proteómico experimental con el objetivo de identificar proteínas que pudieran exhibir potenciales bioactividades inmunonutricionales, incluyendo aquellas relacionadas con el cáncer [17]. El flujo de trabajo del procedimiento de *data mining* se muestra esquematizado en la Figura 3.

Debido a la limitada información disponible sobre la bioactividad inmunonutricional de las proteínas de la quinoa, fue necesario realizar una búsqueda de secuencias de AMPs (673 entradas), OSIPs (52 entradas) y STPIs (165 entradas) en la base de datos del NCBI. Todas estas secuencias procedían de organismos vegetales y eran reconocidas por sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y anticarcinogénicas. Estas secuencias se sometieron a un análisis con BLASTp (*protein-protein Basic Local Alignment Search Tool*) contra la base de datos de quinoa RefSeq del NCBI utilizando los parámetros indicados en la Figura 3. El BLASTp es una herramienta que permite comparar secuencias de aminoácidos con una secuencia proteica de la base de datos del NCBI y determinar su grado de similitud, expresado como porcentaje de identidad (es decir, mismo número de aminoácidos ordenados de la misma manera). Una vez determinado el porcentaje de identidad entre las diferentes secuencias, se procedió a rastrear las entradas correspondientes a proteínas de quinoa con posibles bioactividades inmunonutricionales (1175 AMPs, 538 OSIPs y 108 STPIs) en el mapa proteómico experimental de granos de quinoa previamente caracterizado (1211 proteínas).

proteínas) [16]. Tal y como se muestra en la Figura 3, después de completar el procedimiento de *data mining*, se consiguieron identificar un total de 71 AMPs, 48 OSIPs y 3 STPIs en los granos de quinoa comerciales (considerando las cuatro clases), sugiriendo su gran potencial como fuente de agentes bioactivos en tratamientos inmunonutricionales.

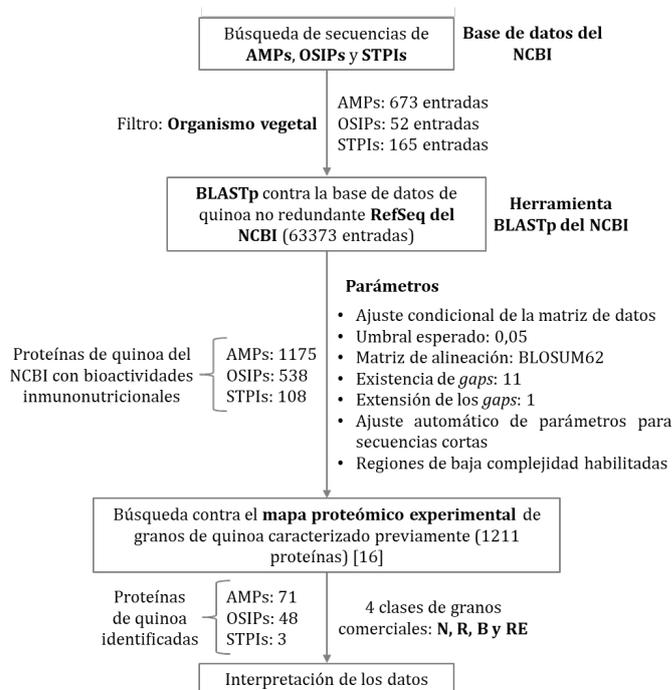


Figura 3. Representación esquemática de la estrategia de *data mining* empleada para la identificación en granos de quinoa de proteínas con potenciales propiedades inmunonutricionales.

En el caso de los AMPs, se identificó un número total similar de proteínas en todas las clases (60, 58, 56 y 57 en quinoa B, N, R y RE, respectivamente). De estas proteínas, 48 (68% del total) se identificaron en todas las clases de quinoa, mientras que 23 (32% del total) se encontraron únicamente en algunas de las clases. Este patrón también se observó en el caso de los OSIPs, donde se identificó un número total similar de proteínas en todas las clases (41, 40, 42 y 36 en quinoa B, N, R y RE, respectivamente). De estas proteínas, 33 (69% del total) se identificaron en todas las clases de quinoa, mientras que 15 (31% del total) se encontraron únicamente en algunas de las clases. En cuanto a los STPIs, del total de 3 identificados, se encontraron 2 en quinoa B, 3 en N, 2 en R y 2 en RE. Dos de los STPIs se identificaron en todas las clases de quinoa (67% del total), mientras que 1 se identificó exclusivamente en quinoa N (33% del total). Todas estas observaciones sugirieron diferencias en los perfiles de AMPs, OSIPs y STPIs entre las cuatro variedades comerciales de quinoa. Estas diferencias podrían ser útiles para seleccionar la clase de grano con el perfil proteico más rico en AMPs, OSIPs y STPIs y, por tanto, con una mayor bioactividad inmunonutricional.

4. Identificación de las proteínas de quinoa con bioactividad inmunonutricional más relevantes [17]

Considerando que las proteínas de quinoa con bioactividad inmunonutricional más relevantes son aquellas con mayor grado de similitud y abundancia, se evaluó la relación entre el porcentaje de identidad de las secuencias de proteínas identificadas como AMPs, OSIPs y STPIs, y sus intensidades LFQ normalizadas [17]. En la Figura 4 se presenta un gráfico en el que el eje x representa el porcentaje de identidad, mientras que el eje y muestra las intensidades LFQ normalizadas promedio de las proteínas identificadas para las cuatro clases de granos de quinoa (la desviación estándar se presenta como barras de error). Cabe destacar que en el gráfico únicamente se representan AMPs y OSIPs, ya que se estableció un umbral de porcentaje de identidad del 65% para aumentar la relevancia de las interpretaciones. Este valor se consideró como el mejor compromiso entre el número de proteínas inmunonutricionales y la fiabilidad de las identificaciones. Al fijar este límite tan elevado, el conjunto completo de AMPs y OSIPs identificados se redujo a 13 (del total de 71 AMPs) y 11 (del total de 48 OSIPs). En general, según se puede apreciar en la Figura 4, las intensidades LFQ normalizadas promedio para los AMPs resultaron ser más elevadas que para los OSIPs (intensidades LFQ/10⁹ para AMPs versus intensidades LFQ/10⁷ para OSIPs, ver ejes y en el gráfico). Esto sugiere que, debido a su mayor abundancia, los AMPs podrían desempeñar un papel más significativo en la actividad inmunonutricional de los granos de quinoa.

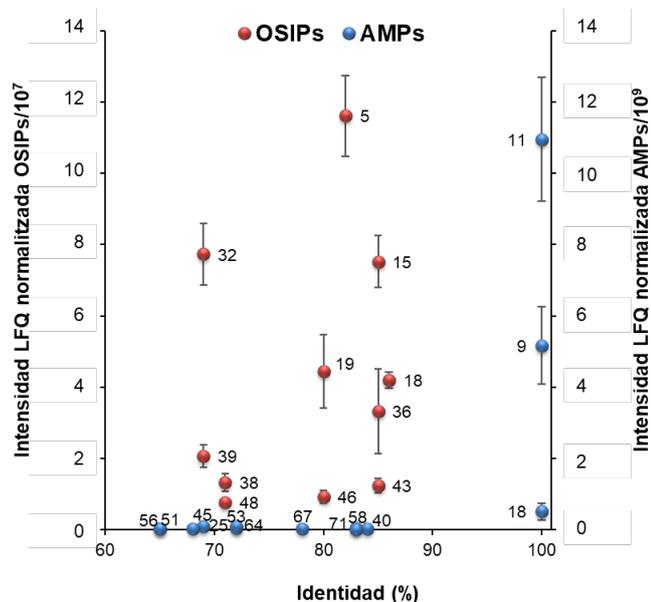


Figura 4. Gráfico que muestra la relación entre el porcentaje de identidad de las secuencias de proteínas identificadas como AMPs y OSIPs (eje x), y sus intensidades LFQ normalizadas promedio en las cuatro clases de granos de quinoa (eje y). El número del grupo de proteínas identificadas se puede consultar en [17].

En la Tabla 1 se detalla el grupo de proteínas de quinoa identificadas como AMPs y OSIPs, incluyendo su nombre y el porcentaje de identidad con las secuencias de proteínas de otras especies vegetales reconocidas en la base de datos del NCBI por sus propiedades inmunonutricionales.

Tabla 1. Grupo de proteínas identificadas (N), nombre y grado de similitud con organismos vegetales para los 13 AMPs y 11 OSIPs identificados con un porcentaje de identidad (%) ≥ 65%. En verde las proteínas con mayor potencial inmunonutricional.

<i>Chenopodium quinoa</i>		Similitud		
^a N	Nombre	Especie vegetal	Nombre	%I
AMPs				
9	Legúmina A (similar)	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i>	Sesquina	100
		<i>Gymnocladus chinensis</i>	Gimnina	
11	Legúmina A (similar)	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i>	Sesquina	100
		<i>Gymnocladus chinensis</i>	Gimnina	
18	Péptido antimicrobiano 2 (similar)	<i>Chenopodium quinoa</i>	Péptido antimicrobiano 2 (similar)	100
25	Proteína disulfuro isomerasa 1-4 (similar)	<i>Oldenlandia affinis</i>	Precursor de la proteína disulfuro isomerasa, parcial	69
40	Cafeína sintasa 1 (similar)	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i>	Sesquina	83
45	Proteína disulfuro isomerasa 1-4 (similar)	<i>Oldenlandia affinis</i>	Precursor de la proteína disulfuro isomerasa, parcial	68
51	Defensina 2, defensina Ec-AMP-D2 (similar)	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>Cerasiforme</i>	Sesquina, parcial	69
53	Peamacleína (similar)	<i>Solanum tuberosum</i>	Snakin-1, parcial	72
56	Peamacleína (similar)	<i>Solanum tuberosum</i>	Snakin-1, parcial	65
58	Fosfatasa de serina/treonina PP2A	<i>Peltophorum dubium</i>	Fosfatasa 2A, parcial	84
64	Peamacleína (similar)	<i>Solanum tuberosum</i>	Snakin-1, parcial	72
67	Anhidrasa carbónica gamma 1	<i>Viola odorata</i>	Cicloviolacina-O2	78
		<i>Viola odorata</i>	Cicloviolacina-O2, cadena A	
		<i>Viola odorata</i>	Cicloviolacina-O2, cadena A	
71	Prefoldina subunidad 4	<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedalis</i>	Sesquina	83
		<i>Gymnocladus chinensis</i>	Gimnina	
OSIPs				
5	Aconitato hidratasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aconitato hidratasa 3	82
15	Fructosa-bisfosfato aldolasa 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa 3	85
18	Aconitato hidratasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Aconitato hidratasa 3	86

19	2-Cys peroxirredoxina BAS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2-Cys peroxirredoxina BAS1	80
32	Fosfolipasa hidroperóxido glutatión peroxidasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fosfolipasa hidroperóxido glutatión peroxidasa 6	69
36	Peroxirredoxina Q	<i>Suaeda salsa</i>	Peroxirredoxina Q	85
38	Fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa: isoforma X1 y X2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glutatión peroxidasa 3	71
39	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Superóxido dismutasa [Cu-Zn] 2	69
43	Fructosa-bisfosfato aldolasa 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa 3	85
46	Péptido metionina sulfóxido reductasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Péptido metionina sulfóxido reductasa B3	80
48	Acilpiruvasa FAHD1: isoforma X1 y X2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acilpiruvasa FAHD1	71

^aEl número del grupo de proteínas identificadas y el de accesión de las proteínas (IDs) se pueden consultar en [16-17].

En relación a los AMPs (representados como esferas azules en la Figura 4), las proteínas con mayor potencial inmunonutricional (mayor porcentaje de identidad y/o abundancia) eran aquellas similares a la legúmina A (N 9 y 11, Tabla 1) y al péptido antimicrobiano 2 (N 18, Tabla 1). Es importante destacar que la proteína de quinoa similar a la legúmina A se presenta en dos grupos de proteínas diferentes (N 9 y 11), ya que en la base de datos del NCBI existen 2 entradas con secuencias que difieren en un único aminoácido. Además del péptido antimicrobiano 2, que pertenece a *Chenopodium quinoa* y, por tanto, presenta un grado de similitud del 100%, la proteína de quinoa similar a la legúmina A mostró un porcentaje de identidad del 100% con la sesquina de *Vigna unguiculata subsp. sesquipedalis* y la gimnina de *Gymnocladus chinensis*. Estos hallazgos son especialmente interesantes, ya que se ha reportado que ambas defensas vegetales poseen potenciales actividades inmunomoduladoras y anticancerígenas [23-24].

En cuanto a los OSIPs (representados como esferas rojas en la Figura 4), las proteínas con mayor potencial inmunonutricional eran aquellas similares a la aconitato hidratasa (N 5 y 18, con entradas diferentes en la base de datos del NCBI, Tabla 1), la fructosa-bisfosfato aldolasa 3 (N 15, Tabla 1), la 2-Cys peroxirredoxina BAS1 (N 19, Tabla 1), la fosfolipasa hidroperóxido glutatión peroxidasa (N 32, Tabla 1) y la peroxirredoxina Q (N 36, Tabla 1). Tal y como se observa en la tabla, las proteínas de quinoa N 5 y 18 (aconitato hidratasa) mostraron porcentajes de identidad del 82% y 86%, respectivamente, con la aconitato hidratasa 3 de *Arabidopsis thaliana*. De manera similar, la fructosa-bisfosfato aldolasa 3 presentó un 85% de identidad con su homóloga de *Arabidopsis thaliana*, la 2-Cys peroxirredoxina BAS1 exhibió un 80% de identidad

con la 2-Cys peroxirredoxina BAS1 de *Arabidopsis thaliana*, la fosfolipasa hidroperóxido glutatión peroxidasa presentó un 69% de similitud con la fosfolipasa hidroperóxido glutatión peroxidasa 6 de *Arabidopsis thaliana* y, finalmente, la peroxirredoxina Q mostró una identidad del 85% con la peroxirredoxina Q de *Suaeda salsa*. Estos descubrimientos también son de especial interés, ya que se ha reportado que todos estos OSIPs de origen vegetal cumplen funciones fundamentales en la regulación de la resistencia al estrés oxidativo [25-29].

La lista presentada en este estudio podría servir como punto de partida para purificar y realizar pruebas de bioactividad de las proteínas y péptidos más prometedores. Además, sería necesario llevar a cabo estudios complementarios de biodisponibilidad para confirmar si estos péptidos pueden resistir la acción de las enzimas digestivas, atravesar la barrera epitelial intestinal y llegar íntegros a los órganos diana, donde podrían ejercer sus efectos beneficiosos para la salud.

5. Conclusiones

En este artículo se presenta una estrategia proteómica *shotgun* para la caracterización integral de los granos de quinoa más comúnmente comercializados (N, R, B y RE). Siguiendo esta estrategia, se han conseguido identificar un total de 1211 proteínas en las cuatro clases de granos, lo que representa una mejora sustancial en la cobertura del proteoma de la quinoa en comparación con estudios anteriores. A partir del mapa proteómico experimental de las distintas clases, se desarrolló una estrategia de *data mining* basada en la comparación de secuencias utilizando la herramienta BLASTp del NCBI. Mediante esta estrategia, se han conseguido identificar un total de 71 AMPs, 48 OSIPs y 3 STPIs en los granos de quinoa, sugiriendo su gran potencial como fuente de agentes inmunomoduladores, antiinflamatorios y anticancerígenos. Debido a su mayor grado de similitud y abundancia, un grupo reducido de 13 AMPs y 11 OSIPs serían los que desempeñarían un papel más significativo en la actividad inmunonutricional de los granos de quinoa, sirviendo como punto de partida para futuras pruebas de bioactividad y biodisponibilidad.

6. Agradecimientos

Esta investigación se ha financiado a través de los proyectos RTI2018-097411-B-I00 y PID2021-1271370-B-100 (Ministerio de Economía y Competitividad, España). Rocío Galindo-Luján agradece al Ministerio de Educación de Perú por la concesión de una beca para cursar el doctorado en la UB. El grupo de Bioanálisis de la UB forma parte de la Unidad de Excelencia María de Maeztu del INSA-UB (CEX2021-001234-M) financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033.

7. Referencias

[1] G. Alandia, J.P. Rodriguez, S.-E. Jacobsen, D. Bazile, B. Condori, Global expansion of quinoa and challenges for the Andean region, *Glob. Food Sec.* 26 (2020) 100429.

- [2] K.B. Ruiz, S. Biondi, R. Oses, I.S. Acuña-Rodríguez, F. Antognoni et al., Quinoa biodiversity and sustainability for food security under climate change. A review, *Agron. Sustain. Dev.* 34 (2014) 349-359.
- [3] I. Aloisi, L. Parrotta, K.B. Ruiz, C. Landi, L. Bini et al., New insight into quinoa seed quality under salinity: changes in proteomic and amino acid profiles, phenolic content, and antioxidant activity of protein extracts, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 1-21.
- [4] S. Navruz-Varli, N. Sanlier, Nutritional and health benefits of quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.), *J. Cereal Sci.* 69 (2016) 371-376.
- [5] J. Capraro, S. De Benedetti, M. Di Dio, E. Bona, A. Abate et al., Characterization of chenopodin isoforms from quinoa seeds and assessment of their potential anti-inflammatory activity in Caco-2 cells, *Biomolecules* 10 (2020) 795.
- [6] M. Srdić, I. Ovčina, B. Fotschki, C.M. Haros, J.M.L. Llopis, *C. Quinoa* and *S. Hispanica* L. seeds provide immunonutritional agonists to selectively polarize macrophages, *Cells* 9 (2020) 593.
- [7] D. Di Silvestre, G. Passignani, R. Rossi, M. Ciuffo, M. Turina et al., Presence of a mitovirus is associated with alteration of the mitochondrial proteome, as revealed by protein-protein interaction (PPI) and co-expression network models in *Chenopodium Quinoa* plants, *Biology* 11 (2022) 95.
- [8] G. Bajpai, M. Nahrendorf, Infectious and lifestyle modifiers of immunity and host resilience, *Immunity* 54 (2021) 1110-1122.
- [9] M.R. Shurin, Cancer as an immune-mediated disease, *ImmunoTargets Ther.* 1 (2012) 1-6.
- [10] P.B. Calder, Immunonutrition, *BMJ* 327 (2003) 117-118.
- [11] H. Fan, H. Liu, Y. Zhang, S. Zhang, T. Liu et al., Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development, *J. Futur. Foods* 2 (2022) 143-159.
- [12] L. Amigo, B. Hernández-Ledesma, Current evidence on the bioavailability of food bioactive peptides, *Molecules* 25 (2020) 4479.
- [13] J.J. Guzmán-Rodríguez, A. Ochoa-Zarzosa, R. López-Gómez, J.E. López-Meza, Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015) 735087.
- [14] B. De Coninck, D. Carron, P. Tavormina, L. Willem, D.J. Craik et al., Mining the genome of *Arabidopsis Thaliana* as a basis for the identification of novel bioactive peptides involved in oxidative stress tolerance, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 5297-5307.
- [15] J.M. Laparra, C.M. Haros, Plant seed protease inhibitors differentially affect innate immunity in a tumor microenvironment to control hepatocarcinoma, *Food Funct.* 10 (2019) 4210-4219.
- [16] R. Galindo-Luján, L. Pont, Z. Minic, M.V. Berezovski, V. Sanz-Nebot et al., Characterization and differentiation of quinoa seed proteomes by label-free mass spectrometry-based shotgun proteomics, *Food Chem.* 363 (2021) 130250.
- [17] R. Galindo-Luján, L. Pont, V. Sanz-Nebot, F. Benavente, A proteomics data mining strategy for the identification of quinoa grain proteins with potential immunonutritional bioactivities, *Foods* 12 (2023) 390.
- [18] E.J. Dupree, M. Jayathirtha, H. Yorkey, M. Mihasan, B.A. Petre et al., A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and the future of this field, *Proteomes* 8 (2020) 1-26.
- [19] Y. Zhu, R. Zhao, P.D. Piehowski, R.J. Moore, S. Lim et al., Subnanogram proteomics: Impact of LC column selection, MS instrumentation and data analysis strategy on proteome coverage for trace samples, *Int. J. Mass Spectrom.* 427 (2018) 4-10.
- [20] J. Cox, N. Neuhauser, A. Michalski, R.A. Scheltema, J.V. Olsen et al., Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 1794-1805.
- [21] H.P. Burrieza, A.J. Rizzo, E. Moura, V. Silveira, S. Maldonado, Shotgun proteomic analysis of quinoa seeds reveals novel lysine-rich seed storage globulins, *Food Chem.* 293 (2019) 299-306.
- [22] B.C.M. Benno Haarman, R.F. Riemersma-Van der Lek, W.A. Nolen, R. Mendes, H.A. Drexhage et al., Feature-expression heat maps - A new visual method to explore complex associations between two variable sets, *J. Biomed. Inform.* 53 (2015) 156-161.
- [23] H.W. Jack, B.N. Tzi, Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase, *Peptides* 26 (2005) 1120-1126.
- [24] J.H. Wong, T.B. Ng, Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (*Gymnocladus chinensis* Baill.), *Peptides* 24 (2003) 963-968.
- [25] L.J. Sweetlove, J.L. Heazlewood, V. Herald, R. Holtzapffel, D.A. Day et al., The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria, *Plant J.* 32 (2002) 891-904.
- [26] M. Broin, S. Cuiné, F. Eymery, P. Rey, The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage, *Plant Cell* 14 (2002) 1417-1432.
- [27] X.L. Guo, Y.R. Cao, Z.Y. Cao, Y.X. Zhao, H. Zhang, Molecular cloning and characterization of a stress-induced peroxiredoxin Q gene in halophyte *Suaeda Salsa*, *Plant Sci.* 167 (2004) 969-975.
- [28] W. Moeder, O. del Pozo, D.A. Navarre, G.B. Martin, D.F. Klessig, Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana Benthamiana*, *Plant Mol. Biol.* 63 (2007) 273-287.
- [29] M. Sugimoto, W. Sakamoto, Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis Thaliana* induced by oxidative stress, *Genes Genet. Syst.* 72 (1997) 311-316.