



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster

EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TECNOLÓGICOS EN LA DESNATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ALERGÉNICA Ara h1 DE CACAHUETE

Autor:

SARA PUY TORRES

Directora:

M^a DOLORES PÉREZ CABREJAS

Facultad de Veterinaria

CURSO 2013-2014

Agradecimientos

Primero de todo, quiero agradecer a mi directora Dolores Pérez Cabrejas, por permitirme participar en este proyecto. Por transmitirme sus conocimientos e inquietudes en la investigación, por su apoyo, tiempo y dedicación durante todos estos meses, que han hecho posible la realización de este trabajo fin de máster.

Agradezco también a los profesores Miguel Calvo y sobre todo a Lourdes Sánchez por su colaboración y su ayuda durante la elaboración de este trabajo.

Por otro lado, darle las gracias a Mercedes Montserrat por su paciencia, colaboración sin límites y tiempo dedicado a este trabajo así como por sus consejos y su amistad.

También a todos los compañeros del departamento, que de una forma u otra me han ayudado y me han hecho más agradable el trabajo de laboratorio, especialmente a Veguita, José Antonio, Dani y Saydou.

A Sergio Ramos y Blanca Jauregui del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria por su colaboración en los tratamientos de las muestras por altas presiones.

Índice

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción	5
2.1. Alergia alimentaria	5
2.2. Alérgenos alimentarios: legislación y etiquetado	7
2.3. Alergias al cacahuete	10
2.4. Efectos de los tratamientos tecnológicos en las proteínas alergénicas del cacahuete	13
3. Objetivos.....	17
4. Materiales y Métodos	18
4.1. Materiales	18
4.2. Métodos.....	18
4.2.1. Aislamiento de la proteína Ara h1	18
4.2.2. Determinación de la concentración de proteína	20
4.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	21
4.2.4. Técnicas inmunoquímicas	22
4.2.5. Tratamiento de altas presiones	26
5. Resultados y discusión.....	27
5.1. Aislamiento de la proteína Ara h1.....	27
5.2. Obtención y caracterización de antisueros anti-Ara h1.....	30
5.3. Aislamiento y conjugación de anticuerpos con peroxidasa	32
5.4. Desarrollo de técnicas de ELISA para la determinación de la proteína Ara h1 ..	33
5.5. Efecto del tratamiento con altas presiones en la proteína Ara h1	34
5.5.1. Determinación de la proteína inmunorreactiva	34
5.5.2. Determinación del perfil electroforético	36
5.5.3. Efecto de los reactivos NEM y KIO ₃ en la desnaturalización de la proteína Ara h1	38
6. Conclusiones	41
7. Bibliografía	43

1. Resumen/Abstract

Resumen

El cacahuete (*Arachis hipogaea*) es uno de los principales alimentos que causa alergia alimentaria, ya que representa un 13,1% y un 16,2% del total de alergias alimentarias en niños y en adultos respectivamente. La alergia al cacahuete se caracteriza porque persiste de por vida, a pequeñas dosis desencadena manifestaciones clínicas y con relativa frecuencia da lugar a un shock anafiláctico. Se han descrito hasta 13 proteínas con capacidad alergénica en el cacahuete, siendo las proteínas Ara h1 y Ara h2 las que presentan una mayor tasa de sensibilización entre la población alérgica a ese alimento.

Los alimentos son sometidos a tratamientos tecnológicos para su higienización, así como para alargar su conservación y mejorar sus propiedades sensoriales. Por ello, el efecto que dichos tratamientos tienen en la estructura de las proteínas alergénicas de cacahuete es de gran relevancia ya que pueden inducir su desnaturalización, y afectar en consecuencia su capacidad alergénica y su detección. Se han llevado a cabo numerosos estudios para conocer el efecto de los tratamientos térmicos en las proteínas alergénicas del cacahuete. Sin embargo, existe muy poca información del efecto que tienen en ellas las nuevas tecnologías de conservación.

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar el efecto que tienen los tratamientos con altas presiones en la proteína Ara h1 de cacahuete. Para ello, la proteína se ha asilado a partir de cacahuete crudo mediante técnicas de precipitación salina y técnicas cromatográficas, se han obtenido antiseros frente a ella mediante inoculación en conejos y los anticuerpos específicos se han purificado por inmunoadsorción y se han conjugado con el enzima peroxidasa. Utilizando estos reactivos, se han desarrollado diferentes formatos de la técnica de ELISA para la determinación de la proteína Ara h1 resultando el formato de tipo competitivo directo el más adecuado para su cuantificación.

El efecto de las altas presiones en la proteína Ara h1 se ha determinado midiendo la pérdida de inmunorreactividad tras someterla a diferentes presiones y tiempos. Las muestras tratadas con altas presiones se han analizado también utilizando técnicas electroforéticas en condiciones nativas y desnaturalizantes. Además, se ha determinado el efecto que tiene la adición de reactivos que modifican los grupos sulfidrilo en la desnaturalización de la proteína Ara h1.

La desnaturalización de la proteína Ara h1 por efecto de las altas presiones ha sido muy baja a 200 y 300 MPa. A presiones superiores a 400 MPa, se produce una marcada desnaturalización que tiene lugar en los primeros minutos del tratamiento, obteniéndose una disminución del 47%, 53% y del 70% a los 20 minutos de tratamiento a 400, 500 y 600 MPa, respectivamente. El grado de desnaturalización ha sido similar al tratar la proteína purificada en tampón y en un extracto de cacahuete.

Mediante técnicas eletroforéticas, se ha observado que la desnaturalización de la proteína Ara h1 por efecto de la presión da lugar a la formación de agregados mediante enlaces covalentes y no covalentes.

La adición del reactivo N-etilmaleimida antes del tratamiento con altas presiones muestra un efecto protector en la desnaturalización de la proteína Ara h1, que parece deberse al bloqueo del grupo sulfidrilo libre de la proteína. Por el contrario, la adición de iodato potásico aumenta su desnaturalización debido probablemente a la oxidación de ese grupo sulfidrilo. La presencia de ambos reactivos previene la agregación de la proteína Ara h1 mediante enlaces covalentes, pero no la que se establece mediante interacciones no covalentes.

Abstract

Peanut (*Arachis hypogaea*) is one of the main foods that causes food allergies, as it represents 13,1 % and 16,2 % of total of total food allergies in children and adults respectively. Peanut allergy is characterized by persisting throughout life, in small doses it triggers clinical manifestations and quite often causes an anaphylactic shock. Thirteen allergenic proteins have been identified in peanuts; being Ara h1 and Ara h2 recognized by more than 90% of peanut allergic individuals.

Foods are subjected to technological treatments to make them safe, to extend shelf-life and to improve organoleptic properties. Therefore, the effect that such treatments have on the structure of peanut allergenic proteins is of great importance since it can induce denaturation and consequently affect allergenic capacity and detection. Many studies have been carried out in order to know the effect of the thermal treatments in peanut allergenic proteins. However, there is very little information about the effect of new processing technologies on them.

The main objective of this study was to study the effect of high pressures treatments on denaturation of protein Ara h1. To perform this work, Ara h1 was isolated from raw peanut by salting-out and chromatographic techniques, antisera were obtained in rabbits, and specific antibodies purified by immunoabsorption and conjugated with peroxidase. Different formats of ELISA technique were developed using these reagents in order to determine Ara h1 protein, being the direct competitive the most suitable format.

The effect of high pressure on Ara h1 protein was determined by measuring the loss of immunoreactivity at different pressures and times. Samples treated by high pressures were analyzed using electrophoresis under native and denaturing conditions. Moreover, the effect of the addition of reagents which modify sulfhydryl groups in the Ara h1 denaturation was also determined.

Denaturation of Ara h1 protein was very low at 200 and 300 MPa. At pressures above 400 MPa, a severe denaturation took place within the first few minutes of treatment, obtaining a decrease of 47 %, 53 % and 70 % after 20 minutes at 400, 500 and 600 MPa, respectively. The denaturation degree was similar for the purified protein in buffer and in peanut extract.

Using electrophoretic techniques, it was observed that pressure-induced denaturation of Ara h1, leads to aggregation by covalent and non-covalent bonds.

The addition of N-ethylmaleimide before treatment with high pressures showed a protective effect in Ara h1 denaturation, which seems to be due to the blocking of the free sulfhydryl group of the protein. By contrast, the addition of potassium iodate increased its denaturation probably due to the oxidation of that sulfhydryl group. The presence of both reagents prevented aggregation of Ara h1 protein by covalent bonds, but not by non-covalent interactions.

2. Introducción

2.1. Alergia alimentaria

La alergia alimentaria es un término genérico que incluye aquellas reacciones adversas a alimentos debidas a su ingestión, contacto o inhalación, que tienen una patogenia inmunológica comprobada. Estas reacciones dependen de la susceptibilidad de cada individuo y no dependen de la dosis ingerida. Las reacciones alérgicas a alimentos han de distinguirse de las reacciones tóxicas por alimentos y de las intolerancias alimentarias. Las reacciones de intolerancia están relacionadas con defectos de enzimas implicadas en el metabolismo del alimento y las reacciones tóxicas con la presencia de agentes químicos o biológicos presentes en el alimento. Ambas son dependientes de la dosis ingerida y no implican una respuesta inmune del individuo (AESAN, 2007; Sampson, 2004).

El desarrollo de una alergia alimentaria depende fundamentalmente de la susceptibilidad del individuo; sin embargo, existen diversos factores que pueden predisponer la aparición de una alergia a los alimentos, como por ejemplo los hábitos alimentarios, la edad de introducción de alimentos en la dieta infantil, la capacidad alérgica propia del alimento, etc (Cianferoni y Spergel, 2009).

La alergia alimentaria incluye tanto las reacciones de patogenia inmunológica que están mediadas por IgE (hipersensibilidad o alergia de tipo inmediato) como las que están producidas por otro mecanismo inmunitario conocido (no mediadas por IgE). La presencia de niveles altos de anticuerpos específicos de la clase IgE es característica de las primeras, mientras que en las segundas, tiene lugar un aumento de otras clases de inmunoglobulinas, complejos inmunes o una respuesta inmune mediada por células (AESAN, 2007).

En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de las alergias alimentarias (Schierer *et al.*, 2003) estimándose que entre un 4 y un 6% de los adultos y entre un 5 y 8% de los niños presentan estas reacciones adversas a alimentos (Zugasti, 2009).

En el desarrollo de una alergia alimentaria tienen lugar las siguientes etapas. Tras tener un primer contacto con el alérgeno, se produce su captación por unas células llamadas *células presentadoras de antígeno*, que lo procesan y lo presentan a los linfocitos T, que a su vez interactúan con los linfocitos B, los cuales producen IgE específicas frente a ese alérgeno concreto. Estas IgE se unen posteriormente a receptores presentes en la superficie de los mastocitos. Hasta ese momento, el individuo no manifiesta ninguna sintomatología. En una exposición posterior, el alérgeno reacciona con las IgE de la superficie de los mastocitos, produciendo su degranulación y por tanto, la liberación de histamina y otras sustancias con potente actividad inflamatoria, que serán responsables de la aparición de los síntomas de la alergia (Wen *et al.*, 2007).

La alergia alimentaria mediada por IgE se caracteriza porque la aparición de síntomas suele ser rápida, antes de dos horas tras la ingestión del alimento. Los órganos involucrados principalmente son la piel y el tracto gastrointestinal, aunque también puede verse afectado el tracto respiratorio y otros aparatos y sistemas (Stroble y Hourihane, 2001). Las manifestaciones clínicas más frecuentes son de tipo cutáneo como urticaria, eritema y angioedema; y de tipo digestivo como vómitos, náuseas, dolor abdominal y diarrea. De manera excepcional (1-2% de las alergias) se dan situaciones graves en las que aparece una reacción anafiláctica que puede conducir a la muerte si no se interviene rápidamente. Esta reacción se da en sujetos muy sensibles y suelen verse afectados numerosos sistemas (digestivo, respiratorio, cardiovascular) y la piel, dando lugar a una sintomatología variada y grave (Boussoio, 1999).

El diagnóstico de la alergia alimentaria se lleva a cabo mediante la realización de un diagnóstico clínico y un diagnóstico patogénico. El diagnóstico clínico se basa en la historia clínica del paciente y pruebas de eliminación-provocación; mientras que el diagnóstico patogénico se realiza mediante pruebas cutáneas (prick-test) o serológicas, para demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos de la clase IgE frente al alimento sospechoso (Cianferoni y Spergel, 2009).

2.2. Alérgenos alimentarios: legislación y etiquetado

La mayoría de los alérgenos alimentarios son glicoproteínas cuyo tamaño varía entre 10 y 70 kDa y tienen un punto isoeléctrico ácido. Se caracterizan por ser estables durante el procesado habitual al que se someten los alimentos, incluyendo tratamientos térmicos, medios ácidos o fermentaciones entre otros (Taylor y Hefle, 2001). En los alimentos pueden encontrarse uno o varios alérgenos, los cuales pueden ser considerados alérgenos mayores si más del 50% de los pacientes alérgicos presentan IgE frente a ellos o alérgenos menores si ese porcentaje es menor al 50% (Wen *et al.*, 2007).

Se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir alergias, sin embargo son 8 los que producen más del 95% de las reacciones alérgicas. En orden descendiente de frecuencia estos son: huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo (FAO, 2001).

El único tratamiento que ha demostrado ser eficaz para evitar las alergias alimentarias es llevar a cabo una dieta de eliminación estricta en la cual se elimina el alimento sensibilizante (Sampson *et al.*, 2003). Por esta razón es imprescindible que las personas alérgicas puedan conocer si el alimento que van a consumir contiene o no el ingrediente que les causa la alergia, y de esta manera evitar su consumo. Para ello, un etiquetado correcto de los alimentos que recoja todos los ingredientes empleados en su elaboración, es muy importante para que sea posible un consumo seguro.

Debido a ello, y en base a la gravedad y severidad de las alergias o intolerancias producidas por determinados alimentos, se publicó en el año 2003 una lista que contenía 12 alimentos susceptibles de producir alergias alimentarias. Tanto los alimentos como los derivados de estos deben estar recogidos correctamente en las etiquetas de todos aquellos alimentos que los contengan (Directiva 2003/89/EC, Real Decreto 2220/2004). A partir de esta lista inicial, se han ido incorporando modificaciones en las que se han añadido o eliminado alimentos y/o ingredientes según los avances científicos realizados (Directiva 2005/26/CE, Real Decreto 1164/2005; Directiva 2006/142/CE, Real Decreto 36/2008; Directiva 2007/68/CE, Real Decreto 1245/2008).

En el último Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011, se ha actualizado la normativa referida a la información que debe ser facilitada al consumidor, en la que se incluye la referente a las sustancias o

productos que causan alergias e intolerancias, que deberá ser aplicada a partir del 13 de diciembre de 2014. El Anexo II de este Reglamento recoge la lista de ingredientes o adyuvantes tecnológicos y sus derivados de mención obligatoria que deben ser declarados tanto en alimentos envasados como en los no envasados e incluye:

1. Cereales que contengan gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y sus derivados, excepto:
 - a. Jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;
 - b. Maltodextrinas a base de trigo;
 - c. Jarabes de glucosa a base de cebada;
 - d. Cereales utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevos.
4. Pescado y productos a base de pescado, excepto:
 - a. Gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados carotenoides;
 - b. Gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja, excepto:
 - a. Aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;
 - b. Tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa-tocoferol natural, acetato de d-alfa-tocoferol natural y succinato de d-alfa-tocoferol natural derivados de la soja;
 - c. Fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
 - d. Ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), excepto:
 - a. Lactosuero utilizado para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola;
 - b. Lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir: almendras (*Amygdalus communis L.*), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], nueces de Brasil (*Bertholletia*

excelsa), alfóncigos (*Pistacai vera*), nueces macadamia o nueces Australia (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados, salvo los frutos de cáscaras utilizados para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola.

9. Apio y productos derivados.
10. Mostaza y productos derivados.
11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
12. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10mg/kg o 10 mg/L en términos SO₂ total, para los productos listos para el consumo o reconstituidos conforme a las instrucciones del fabricante.
13. Altramuces y productos a base de altramuces.
14. Moluscos y productos a base de moluscos.

En el caso de los alimentos envasados, la información se proporcionará en el envase o en una etiqueta adherida y en el caso de los no envasados, cada estado adoptará las formas de expresión y presentación necesarias para informar al consumidor.

Cuando los ingredientes o coadyuvantes sean utilizados de manera intencionada en la preparación y fabricación de alimentos y se mantengan en el producto final, aunque se encuentren modificados, hay que destacar que su inclusión en el etiquetado es obligatorio. La sustancia o producto que causa alergia o intolerancia se destacará mediante una tipografía que lo haga diferente del resto de ingredientes; si no existe lista de ingredientes, se indicará mediante la palabra “contiene seguida del nombre de la sustancia(s)/producto(s)”. Por otro lado la Comisión Europea establecerá las medidas necesarias para la aplicación voluntaria de la alegación “puede contener”. Toda la información sobre alérgenos queda recogida principalmente en los siguientes artículos:

- Artículo 9.1 (c): lista de menciones obligatorias.
- Artículo 21: etiquetado de determinadas sustancias o productos que causan alergias o intolerancias.
- Artículo 36.3 (a): etiquetado voluntario adicional sobre alérgenos (“puede contener”)
- Artículo 44.1 (a) y 44.2: etiquetado de alérgenos en alimentos no envasados.
- Anexo II: lista de sustancias o productos que causan alergias o intolerancias.

Pese a las exigencias de la legislación actual en cuanto al etiquetado de alérgenos, ha de tenerse en cuenta la posible presencia de los denominados “alérgenos ocultos” en los alimentos. Se consideran “alérgenos ocultos” aquellos que se encuentran presentes en el producto debidos a errores en la formulación, a limpiezas ineficientes de las líneas de producción o a la contaminación cruzada durante el procesado. Para estas situaciones, el artículo 36.3 (a) del Reglamento (UE) N° 1169/2011 contempla la posibilidad de incluir en la etiqueta “puede contener”, por lo que el sector alimentario se ha decantado hacía esto como prevención. Sin embargo, el utilizar este etiquetado preventivo hace que los individuos alérgicos tengan todavía más restringidos los posibles alimentos que pueden consumir de manera segura (Nordlee y Taylor, 1995).

Por todo ello, es necesario disponer de técnicas analíticas sensibles y específicas para detectar la presencia de alérgenos en los alimentos. Estas técnicas podrían ser utilizadas tanto en la industria alimentaria para controlar los ingredientes y productos elaborados, como por la administración para comprobar que se cumple la normativa vigente, con la finalidad última de proteger a los consumidores alérgicos.

2.3. Alergias al cacahuete

El cacahuete (*Arachis hipogaea*) pertenece a la familia de las leguminosas en la que también se encuentran los guisantes, la soja o las lentejas entre otros; sin embargo, la mayoría de los consumidores lo incluye en el grupo de alimentos conocido como frutos secos junto con las almendras, pistachos, nueces, etc. En su composición nutricional predomina el contenido en grasa (49%), seguido de proteína (27%) e hidratos de carbono (19%) (Mataix, 2002). El cacahuete puede ser consumido de diversas formas, entero tostado o frito, tras ser procesado en forma de mantequilla o de aceite o como ingrediente de muchos alimentos, entre los cuales destacan las galletas, turrone, bizcochos, pralinés, grageados, etc.

El cacahuete es uno de los principales alimentos causantes de alergias alimentarias, puesto que en la actualidad se estima que aproximadamente un 0,8% de los niños y un 0,6% de los adultos son alérgicos al cacahuete, lo que supone un 13,1% y un 16,2% del total de alergias alimentarias en niños y adultos respectivamente (Sampson, 2004). Datos publicados recientemente, indican que los casos de alergia al cacahuete se han duplicado en niños en la última década en USA y Reino Unido, y se estima que globalmente uno de

cada 150-200 individuos es alérgico a este alimento en los países occidentales (Sicherer *et al.*, 2003).

La alergia al cacahuete se caracteriza porque suele persistir de por vida, porque a pequeñas dosis da lugar a manifestaciones clínicas y por ser el alérgeno que produce con mayor frecuencia una reacción anafiláctica (Wen *et al.*, 2007)

Hasta el momento, se han descrito en el cacahuete hasta 13 proteínas con capacidad alergénica denominadas desde la proteína Ara h1 a la Ara h13 (Tabla 1). De ellas, las proteínas Ara h1 y Ara h2 son consideradas alérgenos mayores ya que presentan elevadas tasas de sensibilización (Wen *et al.*, 2005; Kopplelman y Hefle, 2006). El resto de las proteínas alergénicas son consideradas alérgenos menores dado que presentan tasas de sensibilización mucho más bajas. Además, las proteínas Ara h1 y Ara h2 son cuantitativamente importantes en el cacahuete, ya que representan aproximadamente el 12-16% y el 5,9-9,3% del total de las proteínas presentes en el mismo. Además, estas proteínas se caracterizan por presentar una alta resistencia frente a la desnaturalización por los tratamientos térmicos y frente a la proteólisis por enzimas digestivas (Koppelman *et al.*, 2001).

La proteína Ara h1 es una glicoproteína de 63,5 kDa y punto isoelectrico (pI) de 4,55. Pertenece a la familia de las vicilinas, que son proteínas de almacenamiento de la semilla, las cuales a su vez pertenecen a la superfamilia de las cupinas (Mills *et al.*, 2002). La proteína Ara h1 se encuentra en el cacahuete en forma trímera, que es estable en presencia de 1,8 M de NaCl, lo que indica que sus monómeros se encuentran unidos principalmente por interacciones hidrofóbicas. Además, presenta 7 cisteínas de las que 6 se encuentran formando puentes disulfuro (Maleki *et al.*, 2000b).

Se estima que entre un 65 y 100% de las personas alérgicas al cacahuete presentan IgE específicas frente a la proteína Ara h1. Contiene un total de 23 epítomos lineales, siendo 4 de ellos los inmunodominantes. La mayoría de los epítomos se encuentran localizados en la zona de interacción entre los monómeros.

Tabla 1. Alérgenos del cacahuete (Sáiz *et al.*, 2013; IUIS).

Alérgeno	Peso molecular (kDa)	pI	Función	Familia	Sensibilización (%)
Ara h1	63.5	4,55	Proteína de almacenamiento de semilla	Vicilinas	>90
Ara h2	17	5,2	Proteína de almacenamiento de semilla	Conglutinas	>90
Ara h3	57	5,5	Proteína de almacenamiento de semilla	Glicininas	44-53
Ara h4	35,9	5,5	Proteína de almacenamiento de semilla	Glicininas	44-53
Ara h5	14	4,6	Proteína de unión de actina	Profilinas	13
Ara h6	14,5	5,2	Proteína de almacenamiento de semilla	Conglutinas	38
Ara h7	15,8	5,6	Proteína de almacenamiento de semilla	Conglutinas	43
Ara h8	16,9	5,03	N.D	Proteínas relacionadas con patogénesis	N.D
Ara h9	9,8	5,0	N.D	Proteínas de lípidos	N.D
Ara h10	16	9,6-9,8	N.D	Oleosinas	N.D
Ara h11	14	9,6-9,8	N.D	Oleosinas	N.D
Ara h12	8-12	N.D	N.D	Defensinas	N.D
Ara h13	8-11	N.D	N.D	Defensinas	N.D

N.D: no disponible.

La proteína Ara h2 es una glicoproteína que tiene un peso molecular de 17 kDa y pI de 5,2 (Burks *et al.*, 1992). Pertenece a la familia de las congulutinas que también son proteínas de almacenamiento de la semilla, cuya estructura está relacionada con la superfamilia de las albúminas 2S. Contiene 8 cisteínas, las cuales están unidas por puentes disulfuro confiriéndole una elevada estabilidad frente a la actividad de enzimas (Flinterman *et al.*, 2007; Maleki *et al.*, 2003). La frecuencia de sensibilización de la proteína Ara h2 es del 91% (Sáiz *et al.*, 2013) y se han caracterizado hasta 10 epítomos lineales, siendo 3 de ellos los inmunodominantes (Wen *et al.*, 2005).

2.4.Efectos de los tratamientos tecnológicos en las proteínas alergénicas del cacahuete

Los alimentos son sometidos a tratamientos tecnológicos para su higienización, así como para alargar su conservación y mejorar sus propiedades sensoriales. El efecto que dichos tratamientos tienen en la estructura de las proteínas alergénicas de cacahuete es de gran relevancia, puesto que pueden inducir su desnaturalización, agregación y/o interacción con otros componentes, etc., y dichos cambios pueden afectar su capacidad alergénica. La mayoría de los trabajos publicados han estado dirigidos al estudio del efecto que tienen los tratamientos térmicos en su alergenicidad (Beyer *et al.*, 2001; Maleki *et al.*, 2000). Sin embargo, existe muy poca información del efecto que tienen sobre la proteína Ara h1 las nuevas tecnologías de conservación, como por ejemplo, las altas presiones, los pulsos eléctricos de alto voltaje, la irradiación, etc. Aunque no se espera que estas técnicas reemplacen a los métodos térmicos tradicionales, resultan interesantes para la industria alimentaria, por lo que actualmente ya existen en el mercado productos elaborados con estas tecnologías, y se espera que lo hagan en mayor grado en un futuro próximo y a un coste competitivo.

Los estudios sobre el tratamiento térmico se han llevado a cabo principalmente tratando el cacahuete entero o sus extractos y determinando su inmunorreactividad mediante técnicas de Western-blotting, en las que se utilizan sueros de individuos alérgicos al cacahuete (Beyer *et al.*, 2001; Maleki *et al.*, 2000). Se ha observado que los procesos de fritura (120°C, 10 minutos) o hervido (100°C, 20 minutos) dan lugar a una disminución de la reactividad de las IgE con la proteína Ara h1, mientras que el proceso de tostado (170°C, 20 min) aumenta su inmunorreactividad (Beyer *et al.*, 2001; Maleki *et al.*, 2000a y b; Pomés *et al.*, 2006). Este aumento de la inmunorreactividad se ha relacionado con la formación de nuevos epítomos generados por la reacción de Maillard, o con la exposición de epítomos localizados en el interior de la proteína en su estado nativo. Este hecho podría explicar la diversa prevalencia de las alergias al cacahuete observada en países con un alto consumo, como China o USA. Así, en China donde el cacahuete se consume fundamentalmente frito o hervido, la prevalencia de las alergias al cacahuete es mucho menor que en USA, donde se consume fundamentalmente tostado (Maleki *et al.*, 2000).

Por otra parte, algunos de los estudios del efecto del tratamiento térmico en la alergenicidad de la proteína Ara h1 se han llevado a cabo calentando la proteína purificada y determinado su reactividad con el suero de pacientes alérgicos a cacahuete, utilizando una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto. En estos estudios, se ha indicado que la proteína Ara h1 no disminuye su inmunorreactividad, incluso tras tratamientos a 140°C durante 15 minutos o a 100°C durante una hora (Burks *et al.*, 1992; Beyer *et al.*, 2001; Koppelman *et al.*, 1999). Estos hechos indican que los epítomos reconocidos por las IgE no se ven alterados por la aplicación de dichos tratamientos.

Sin embargo, a pesar de que la alergenicidad de la proteína Ara h1 parece no verse afectada por los tratamientos térmicos, los estudios realizados a nivel molecular indican que dichos tratamientos inducen cambios en su estructura. Utilizando la técnica de calorimetría diferencial de barrido se ha indicado que la Ara h1 tiene una temperatura máxima y una entalpía de desnaturalización de 90,2°C y 1574 kJ/mol, respectivamente. Además, el tratamiento térmico de la proteína Ara h1 produce un aumento en la estructura de hoja plegada beta y de la hidrofobicidad de la proteína, y da lugar a la formación de agregados mediante interacciones covalentes (Koppelman *et al.*, 1999, Montserrat *et al.*, 2013). Recientemente, utilizando una técnica de ELISA de tipo sandwich, se han determinado los parámetros cinéticos y termodinámicos de la desnaturalización por el calor de la proteína Ara h1 en un rango de temperaturas de 82 a 90°C, los cuales indican que la desnaturalización de dicha proteína sigue un orden de reacción de $n = 1,5$ (Montserrat *et al.*, 2013).

La irradiación es un tratamiento que consiste en exponer los alimentos a radiaciones ionizantes de naturaleza corpuscular o magnética. Esta tecnología puede producir la desnaturalización de las proteínas debido a la acción de los radicales libres generados por efecto de la radiolisis, y su posterior fragmentación o agregación a través de interacciones electrostáticas y/o covalentes por puentes disulfuro. Se ha observado que la irradiación de extractos de cacahuete puede llegar a reducir unas 7 veces la reactividad de las muestras con IgE del suero de individuos alérgicos (Chung *et al.*, 2008).

El tratamiento por altas presiones consiste en someter los alimentos a presiones en el rango de 100 a 900 MPa durante periodos de tiempo que generalmente oscilan entre 1 y 30 minutos (Mañas y Pagán, 2005; Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Smelt, 1998). En general, las células vegetativas de las bacterias, los mohos y las levaduras resultan eficazmente

inactivadas por esta tecnología, mientras que los esporos bacterianos son muy resistentes a la presión (Smelt, 1998). Las altas presiones son capaces de modificar la estructura de las proteínas, al inducir cambios en las interacciones intra e intermoleculares de los grupos funcionales de los aminoácidos. En general, la aplicación de presiones superiores a 200-300 MPa a temperatura ambiente provoca la disociación de las macroestructuras en subunidades, así como la desnaturalización de las estructuras monoméricas, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas y a la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares. Sin embargo, salvo que las presiones sean muy elevadas, los enlaces por puentes de hidrógeno y los enlaces covalentes no parecen verse afectados por estos tratamientos (Hendrickx *et al.*, 1998).

Existen muy pocos estudios sobre el efecto que tiene el tratamiento con altas presiones en las proteínas alergénicas del cacahuete. Johnson *et al* (2010), He *et al.*, (2014) y Huang *et al.*, (2014) aplicaron tratamientos entre 150 y 800 MPa y no observaron cambios en la estructura secundaria de las proteínas Ara h2 y Ara h6. En el estudio realizado por Hu *et al* (2011) se ha indicado que tratamientos de microfluidización entre 60 y 180 MPa dan lugar a cambios en la estructura secundaria de la proteína Ara h2 e incrementan su intensidad de absorción en el ultravioleta y su hidrofobicidad. Además, estos cambios estructurales disminuyen la inmunorreactividad de la proteína, determinada mediante una técnica de ELISA en placa, al destruir o enmascarar epítomos que reaccionan con las IgG. Si las modificaciones que sufre la proteína Ara h2 afectan también a su capacidad alergénica es un hecho que está todavía por estudiar.

Por otra parte, el efecto del procesado constituye probablemente el principal problema al utilizar técnicas inmunoquímicas para determinar proteínas alergénicas alimentarias. En estudios realizados para detectar la presencia de cacahuete en alimentos tratados térmicamente, en los que se utilizan técnicas de inmunoensayo basadas en la determinación de la proteína Ara h1, se ha observado que el procesado disminuye la solubilidad de dicha proteína dificultando su extracción (Chassaigne *et al.*, 2007). Además, dichos tratamientos desnaturalizan la proteína, destruyendo epítomos que son reconocidos por los anticuerpos, y/o inducen la agregación con otros componentes, enmascarando así sus determinantes antigénicos (Poms *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2010). Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios que permitan conocer el efecto que los tratamientos tecnológicos tienen en las proteínas diana utilizadas para la detección de

cacahuete en alimentos procesados, cuando esos ensayos se van a usar en los programas de control de alérgenos de alimentos o en la evaluación de riesgos de alérgenos.

3. Objetivos

El objetivo general del Trabajo Fin de Master que se presenta ha sido estudiar el efecto que tienen los tratamientos con altas presiones en la proteína Ara h1 de cacahuete. Para realizar este trabajo se ha contado con la participación del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria situado en San Adrián (Navarra) que dispone de un equipo de altas presiones para la realización de los tratamientos.

Para llevar a cabo este objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- Desarrollar una técnica de ELISA para determinar la proteína Ara h1.
- Determinar el efecto que tienen los tratamientos con altas presiones en la estructura de la proteína Ara h1, tratando la proteína en tampón y en extracto de cacahuete a diferentes presiones y tiempos.
- Estudiar el efecto de la adición de diferentes reactivos al medio de tratamiento en la desnaturalización por altas presiones de la proteína Ara h1 con el objeto de obtener información del mecanismo de acción de dicha desnaturalización.

4. Materiales y Métodos

4.1.Materiales

Los cacahuets crudos, con cáscara y envasados en atmósfera modificada fueron adquiridos en una tienda local. El conjugado comercial de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa, la agarosa, los adyuvantes de Freund completo e incompleto, la N-etilmaleimida (NEM), los geles Sephacryl S-200, la Concanavalina A Sheparose y el Azul de Cibacrón Sepharose fueron suministrados por Sigma (Poole, Reino Unido). El gel de Sepharose 4B BrCN-activada, los geles de poliacrilamida, los tampones para las electroforesis y los marcadores de peso molecular, procedieron de Pharmacia Biotech (Upsala, Suecia). El test del ácido bicinconínico (BCA) y el estabilizador del conjugado de la peroxidasa, eran de Pierce (Rockford, IL, EEUU). El 4-cloro-1-naftol fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania) y la N-N-dimetilformamida (DMF) procedía de Carlo Erba (Milán, Italia). El sustrato de la peroxidasa que contenía tetrametilbencidina (TMB) procedía de ZEULAB (Zaragoza, España). Las placas de ELISA F96 Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca) y las hojas de nitrocelulosa Trans Blot Transfer Medium de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Las membranas de diálisis se obtuvieron de Medicell (Londres, Reino Unido) y los discos de ultrafiltración de Amicon (Beverly, MA, EEUU). El kit para la conjugación de los anticuerpos se obtuvo de Innova Biociences (Cambridge, UK).

El resto de productos utilizados no señalados específicamente fueron reactivos de tipo analítico obtenidos de diversas fuentes.

4.2.Métodos

4.2.1. Aislamiento de la proteína Ara h1

La proteína Ara h1 fue aislada a partir de cacahuets crudos mediante técnicas de precipitación salina y cromatográficas. Las fracciones proteicas obtenidas se analizaron mediante SDS-electroforesis.

4.2.1.1. Preparación del extracto de cacahuete

Tras haber estado inmersos en agua destilada durante una hora, los cacahuetses crudos se pelaron, se dejaron secar y se trituraron con una picadora hasta obtener una pasta fina y homogénea. Después, el cacahuete se procesó inmediatamente para prevenir la degradación causada por proteasas y lipasas endógenas. La extracción de las proteínas del cacahuete se realizó con tampón Tris 50 mM, pH 8,2 o con tampón borato sódico 10 mM pH 9 usando una relación 20 g de cacahuete por cada 100 mL tampón. La mezcla se mantuvo en agitación durante dos horas y las muestras se filtraron por lana de vidrio.

4.2.1.2. Precipitación con sulfato amónico

La precipitación salina se realizó añadiendo sulfato amónico al extracto obtenido hasta alcanzar una saturación del 40%. La mezcla se mantuvo agitando durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 23.000 g durante 45 minutos a 4°C. Al sobrenadante obtenido tras la centrifugación se le añadió sulfato amónico hasta alcanzar una saturación del 80%, se mantuvo en agitación durante una hora a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar. Se desechó el sobrenadante obtenido en esta fase y el precipitado se disolvió en 5 mL del tampón de extracción en un baño de ultrasonidos con hielo. Posteriormente, el extracto se pasó por un filtro de 0,45 µc. El mismo procedimiento de precipitación salina se realizó para saturaciones de 40-60% y 60-80% de sulfato amónico.

4.2.1.3. Filtración en gel Sephacryl S-200

Un volumen de 2 mL del extracto de cacahuete procedente de la etapa anterior se aplicó en una columna Sephacryl S-200 (90 x 2 cm) que previamente se equilibró con el tampón de extracción correspondiente. Se mantuvo un flujo de 30 mL/hora mediante una bomba peristáltica y se recogió el eluido en fracciones de 2 mL.

4.2.1.4. Cromatografía de intercambio iónico en Sepharose Q

Las fracciones enriquecidas en proteína Ara h1 procedentes de la filtración en gel fueron dializadas frente a tampón Tris 50 mM, pH 8,2 y se aplicaron en una columna de

Sephacryl S-200 (25 x 3 cm) equilibrada con el mismo tampón. Seguidamente la columna se lavó con el mismo tampón hasta que la absorbancia del eluido a 280 nm fue inferior a 0,02. Para eluir las proteínas retenidas se aplicó un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0,5 M. El flujo se mantuvo a 18 mL/h y las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2.1.5. Cromatografía en Concanavalina A

Las fracciones enriquecidas en proteína Ara h1 procedentes de la cromatografía en Sephacryl S-200 se aplicaron en una columna de Concanavalina A (10 x 2 cm), equilibrada con tampón Tris 50 mM pH, 8,2. A continuación se lavó la columna con el mismo tampón para eliminar las proteínas no retenidas hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0,02. La elución de las proteínas retenidas se llevó a cabo mediante un gradiente lineal entre 0 y 1 M de α -manopiranosas. El flujo se mantuvo a 24 mL/h y las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2.1.6. Cromatografía en Azul de Cibacrón

Las fracciones enriquecidas en proteína Ara h1 procedentes de la cromatografía en Sephacryl S-200 se aplicaron en una columna Azul de Cibacrón (10 x 2cm), equilibrada con tampón Tris 50 mM pH 8,2. A continuación se lavó la columna con el mismo tampón para eliminar las proteínas no retenidas hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0,02. La elución de las proteínas se llevó a cabo aplicando un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0,5 M. El flujo se mantuvo a 24 mL/hora y las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2.2. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en las muestras de cacahuete se determinó usando el test del ácido bicinonínico. Para ello, se prepararon previamente estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro de sodio 0,14 M, pH 7,4 (PBS) en un rango de concentraciones entre 125 μ g/mL a 2 mg/mL y varias diluciones de las muestras a analizar. Después, se añadieron en los pocillos de una microplaca, 25 μ L de los estándares o las muestras por triplicado, y 200 μ L del reactivo BCA diluido 1/50. La mezcla se incubó a 37°C durante

30 minutos y se leyó la absorbancia de los pocillos a 570 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). Se preparó una curva patrón representando la absorbancia de los estándares frente a su concentración, y la concentración de proteína en las muestras problema se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia en dicha curva.

4.2.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La preparación de las muestras se realizó en diferentes condiciones según el tipo de electroforesis. Para la electroforesis en condiciones nativas, las muestras se diluyeron en tampón Tris 50 mM pH 8,2 que contenía 1 mM EDTA y azul de bromoferol hasta una concentración de 1-2 mg/mL. Para las electroforesis en condiciones desnaturalizantes, a 90 µL de la mezcla anterior se le añadieron 10 µL de SDS al 25% (p/v, en agua destilada) y para las electroforesis en condiciones reductoras se añadieron además 10 µL de β-mercaptoetanol. En estos dos últimos casos, las muestras se incubaron en un baño a 100°C durante 5 minutos. A continuación, las muestras se aplicaron en geles comerciales que contenían una concentración de acrilamida de 8-25% o del 4-20%. Mediante un equipo Phast System (Pharmacia, Upsala, Suecia) o Miniprotean Biorad (bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) se llevaron a cabo las electroforesis siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante para cada tipo de gel y condiciones del análisis.

Cuando la electroforesis finalizó, las proteínas se tiñeron con el colorante Phast Gel blue R. Esta solución colorante contenía 0.65 g de Azul de Coomassie R, 300 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua destilada. Los geles se mantuvieron inmersos en colorante y tras una hora en agitación, se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante compuesta por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Los geles permanecieron en esta mezcla hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína.

4.2.4. Técnicas inmunoquímicas

4.2.4.1. Obtención de antisueros

Se obtuvieron antisueros de conejos frente a la proteína Ara h1 según el siguiente protocolo. A cada conejo se le inyectó por vía subcutánea 1 mg de proteína disuelta en 0,5 mL de tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (SSF) filtrado, y emulsionados con un volumen igual de adyuvante completo de Freund. Tras un mes, se repitió la misma inoculación pero utilizando adyuvante incompleto de Freund. A los 15 días se realizó una sangría de prueba y se determinó la presencia de anticuerpos por Western-blotting e inmunodotting, como se describe a continuación. Si la sangría resultaba positiva, los animales se sangraban por incisión en la vena auricular externa, utilizando xileno como vasodilatador, y si era negativa se repetía la inoculación de la proteína con adyuvante incompleto. Para las sangrías sucesivas se dejó recuperar a los animales durante 30 días, repitiendo las inoculaciones con adyuvante incompleto a los 15 días después de cada sangría. La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugó a 500 g durante 15 minutos, y posteriormente se congeló en alícuotas a -20°C hasta su utilización.

4.2.4.2. Inmunodotting

Las muestras (1 µL) se aplicaron sobre una hoja de nitrocelulosa y se dejaron secar. Posteriormente, la hoja de nitrocelulosa se incubó con una solución de ovoalbúmina al 5% (p/v) en SSF a temperatura ambiente durante una hora en agitación, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas de la nitrocelulosa. A continuación, la hoja de nitrocelulosa se incubó con una dilución apropiada del antisuero correspondiente en ovoalbúmina al 3% (p/v) en SSF, a temperatura ambiente durante una hora en agitación suave. La hoja se lavó 5 veces con SSF y se incubó a temperatura ambiente durante dos horas con IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado, diluido 1/1000 en ovoalbúmina al 3% (p/v), en SSF. La hoja se lavó como en la etapa anterior, y para el revelado se incubó con 6 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 2 mL de metanol, 8 mL de SSF y 10 µL de H₂O₂ al 30%.

4.2.4.3. Western-blotting

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un equipo de transferencia MilliBlot-SDE Transfer System (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Para ello, se recortaron seis láminas de papel de filtro Whatmann 3 MM y una membrana de nitrocelulosa de similares dimensiones al gel de electroforesis. Cada uno de los papeles de filtro permaneció sumergido en uno de los siguientes tampones: un papel en tampón Tris 0,3 M, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo I), dos papeles en tampón Tris 25 mM, 10% metanol, pH 10,4 (ánodo II) y tres papeles en tampón Tris 25 mM, glicina 4 mM, 20% metanol, pH 9,4 (cátodo). La membrana de nitrocelulosa se humedeció en agua Milli Q.

En el sistema de transfer se colocaron encima de la unidad del ánodo y en este orden el papel de filtro del ánodo I, los del ánodo II, la membrana de nitrocelulosa, el gel de electroforesis y los papeles de filtro del cátodo. Después, se colocó la unidad del cátodo y la transferencia se realizó utilizando una intensidad de 2 mA/cm² durante 45 minutos. Una vez transferidas las proteínas a la membrana, la nitrocelulosa se incubó como se ha indicado en el caso del inmunodotting.

4.2.4.4. Aislamientos de anticuerpos específicos

Para aislar los anticuerpos específicos frente a la proteína Ara h1, un volumen de 10 mL del antisuero se aplicó a una columna que contenía la proteína Ara h1 insolubilizada en Sepharose 4B, haciéndolo pasar a un flujo de aproximadamente 0,2 mL/minuto. La columna se lavó con PBS que contenía 0,5 M NaCl hasta que la absorbancia a 280 nm del excluido fue menor a 0,02. Después, los anticuerpos se eluyeron con tampón glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 2,8. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas inmediatamente con volúmenes previamente calculados de tampón Tris 0,5 M, pH 8,0, que se depositaron en los tubos antes de recoger el eluido. Por último, los anticuerpos eluidos se dializaron frente a PBS y se concentraron por ultrafiltración utilizando membranas de punto de corte de 10 kDa. Los anticuerpos concentrados se congelaron a -20°C hasta su uso. La concentración de los anticuerpos purificados se determinó por espectrofotometría usando el coeficiente de extinción a 280 nm $\epsilon_{1\text{mg/mL}} = 1,5$.

4.2.4.5. Conjugación de anticuerpos con peroxidasa

Para la conjugación de los anticuerpos con peroxidasa se utilizó el Kit de conjugación Lightning-Link™ HRP. A 100 µL de anticuerpos aislados (10 mg/mL) se le añadieron 10 µL de reactivo LL-Modifier y se agitó. Posteriormente se añadió a un vial Lightning-Link™, se resuspendió la mezcla y se mantuvo durante 3 horas a temperatura ambiente (10-25°C). Tras la incubación se añadieron 10 µL del reactivo LL-Quencher.

4.2.4.6. Técnica de ELISA de tipo no competitivo directo

Las placas se tapizaron con 120 µL/pocillo de una solución de proteína Ara h1 (5 µg/mL) en tampón carbonato sódico 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 µL/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 µL/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v), en PBS a temperatura ambiente durante dos horas, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas. Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con PBS que contenía 0,5% de Tween 20 (PBST) y después, se incubaron con 100 µL/pocillo de diferentes diluciones del antisuero a 37°C durante una hora. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 µL/pocillo de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa, diluidas 1/4000 en tampón PBS y se incubó a 37°C durante una hora. Se lavaron de nuevo 5 veces con PBST y se añadieron 100 µL/pocillo de una solución de TMB, tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µL/pocillo de ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA.

4.2.4.7. Técnica de ELISA de tipo competitivo directo

Las placas se prepararon del mismo modo que en el apartado anterior y se incubaron a 37°C durante una hora con 50 µL/pocillo de las diferentes soluciones estándar de la proteína Ara h1 o de las muestras problema, y con 50 µL/pocillo de los anticuerpos conjugados con peroxidasa diluidos 1/90.000 en PBS. A continuación, tras 5 lavados con PBST, se adicionó la solución del sustrato, y la lectura de la absorbancia tras parar la reacción con ácido sulfúrico se realizó como se ha descrito en el apartado 4.2.4.6.

4.2.4.8. Técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto

Las placas se prepararon del mismo modo que se ha descrito anteriormente y se incubaron a 37°C durante una hora con 50 µL/pocillo de las diferentes soluciones estándar o de las muestras problema, y con 50 µL/pocillo del antisuero anti-Ara h1. Tras la incubación, la placa se lavó 5 veces con PBST y se añadieron 100 µL/pocillo de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa, diluidas 1/4000 en tampón PBS y se incubó a 37°C durante una hora. Las siguientes etapas se realizaron como se ha descrito en el apartado 4.2.4.6.

4.2.4.9. Técnica de ELISA de tipo sándwich

Las placas se tapizaron con 120 µL/pocillo de una solución de anticuerpos específicos (5 µg/mL) frente a la proteína Ara h1 en tampón carbonato sódico, 0,05 M, pH 9,6. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las placas se lavaron 5 veces con 300 µL/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 µL/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v) en PBS a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con 300 µL/pocillo de PBST y después, las placas se incubaron con 100 µL/pocillo de las diferentes soluciones estándar o de las muestras problema, a 37°C durante 30 minutos. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 µL/pocillo de una dilución 1/50.000 del conjugado anti Ara h1 en PBS que se mantuvo a 37°C durante 30 minutos, tiempo tras el cual las placas se lavaron 5 veces con PBST. Por último, se añadió el sustrato y se midió la absorbancia de los pocillos como se ha indicado en el apartado 4.2.4.6.

4.2.4.10. Preparación de estándares de Ara h1

Los estándares de proteína Ara h1 para usar en las técnicas de ELISA se prepararon determinando su concentración por espectrofotometría, siendo su coeficiente de extinción a 280 nm $\epsilon_{1\text{mg/mL}} = 0,59$. Las muestras se diluyeron en BSA al 0,5% en PBS que contenía 0,05% de timerosal a una concentración 50 veces mayor a la usada en los ensayos, y se guardaron en alícuotas que se mantuvieron congeladas a -20°C hasta su uso. En el momento del análisis, las muestras estándar se descongelaron y se diluyeron en PBS.

4.2.5. Tratamiento de altas presiones

La proteína Ara h1 disuelta en PBS (200 µg/mL y 1 mg/mL) conteniendo azida sódica fue tratada a varias presiones (entre 200 y 600 MPa) durante diferentes tiempos (entre 1 y 30 minutos). Las muestras de Ara h1 se trataron también en presencia de los reactivos NEM disuelto en DMF y KIO₃ disuelto en agua destilada. Las concentraciones finales de estos reactivos fueron de 0,44 mM de NEM y 0,1 mM de KIO₃. Además, se ensayó la adición de DMF (10 µL/mL) como control, ya que este reactivo es utilizado para solubilizar el NEM.

5. Resultados y discusión

5.1. Aislamiento de la proteína Ara h1

La proteína Ara h1 se aisló a partir de cacahuete crudo. Para la extracción de las proteínas se ensayaron dos tampones, Tris 50 mM, pH 8,2 y borato sódico 10 mM, pH 9,0. Aunque el perfil de bandas que se observa mediante SDS-electroforesis (Figura 1) fue similar en ambos casos, la concentración de proteína de los extractos, determinada mediante la técnica del BCA, fue ligeramente mayor con el tampón Tris que con el tampón borato (23,6 mg/mL y 19,7 mg/mL respectivamente), por lo que se seleccionó el primero de ellos como tampón de extracción.

El extracto obtenido con el tampón Tris se sometió a una precipitación salina con distintas concentraciones de sulfato amónico (saturaciones del 40-60%, 40-80% y 60-80%) obteniéndose un mayor enriquecimiento en la proteína Ara h1 con respecto a las otras proteínas con una saturación del 60-80% (Figura 1).

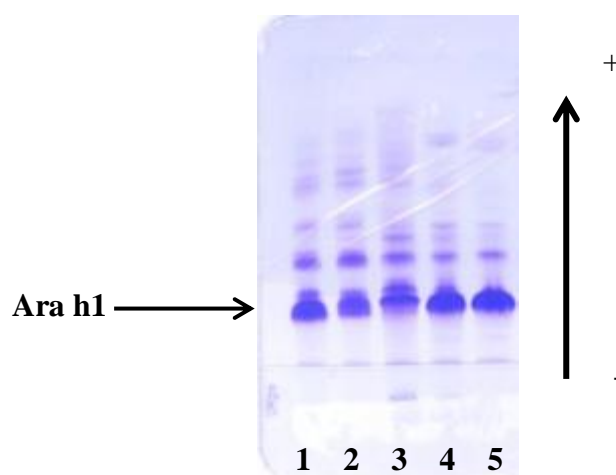


Figura 1. SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% de los extractos de cacahuete. (1) Extracto obtenido con tampón Tris y (2) tampón borato; Extracto en tampón Tris tras la precipitación con sulfato amónico con saturaciones del (3) 40-60% (4) 40-80%, (5) 60- 80%.

El extracto obtenido tras la precipitación salina se aplicó a una columna de Sephacryl S-200. El cromatograma muestra la presencia de tres picos (Figura 2) cuyas fracciones se analizaron por SDS-electroforesis (Figura 3). En el primer pico eluye mayoritariamente la proteína Ara h1 al encontrarse en el cacahuete en forma trímera, en el segundo pico, eluyen las proteínas Ara h2 y Ara h6 entre otras, y en el tercer pico eluyen los componentes de bajo peso molecular, principalmente pigmentos que absorben fuertemente a 280 nm.

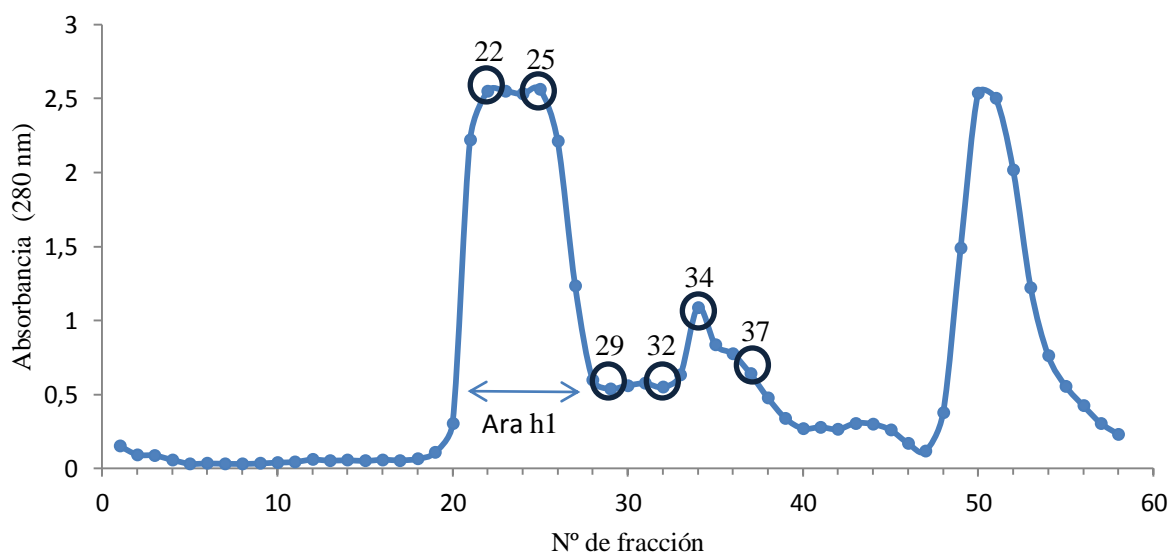


Figura 2. Perfil de la cromatografía en Sephacryl S-200 del extracto de cacahuete obtenido tras precipitación con sulfato amónico (60-80%). Las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

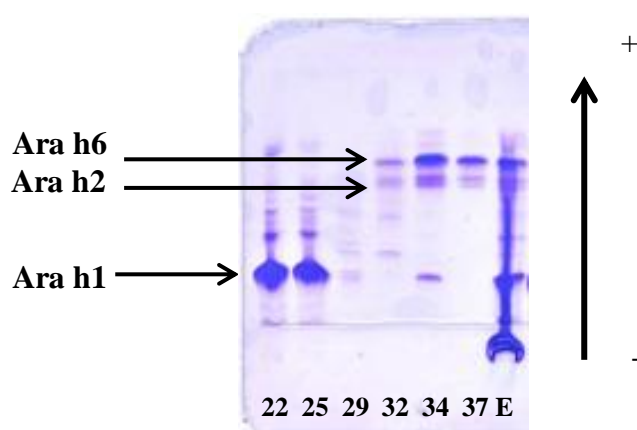


Figura 3. SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% de las fracciones de la cromatografía en Sephacryl S-200. Los números corresponden a las fracciones de la cromatografía. E: extracto de cacahuete obtenido tras la precipitación con sulfato amónico (60-80%).

Las fracciones enriquecidas en la proteína Ara h1 (21 a 26) se recogieron conjuntamente y se aplicaron en una columna de intercambio aniónico de Sepharose Q, cuyo perfil cromatográfico y electroforesis de algunas de las fracciones obtenidas se muestran en las Figuras 4 y 5 respectivamente.

Todas las proteínas quedaron retenidas en el gel y eluyeron con un gradiente lineal de NaCl. La proteína Ara h1 eluyó a una concentración salina de aproximadamente 0,35 M. Otras proteínas contaminantes eluyeron a una concentración salina menor o mayor a la indicada para la proteína Ara h1 como se observa en la electroforesis de las fracciones 35 a 38 y 62 a 67 (previamente concentradas por ultrafiltración). Las fracciones 45 a 58, que contenían Ara h1 mayoritariamente, se recogieron conjuntamente.

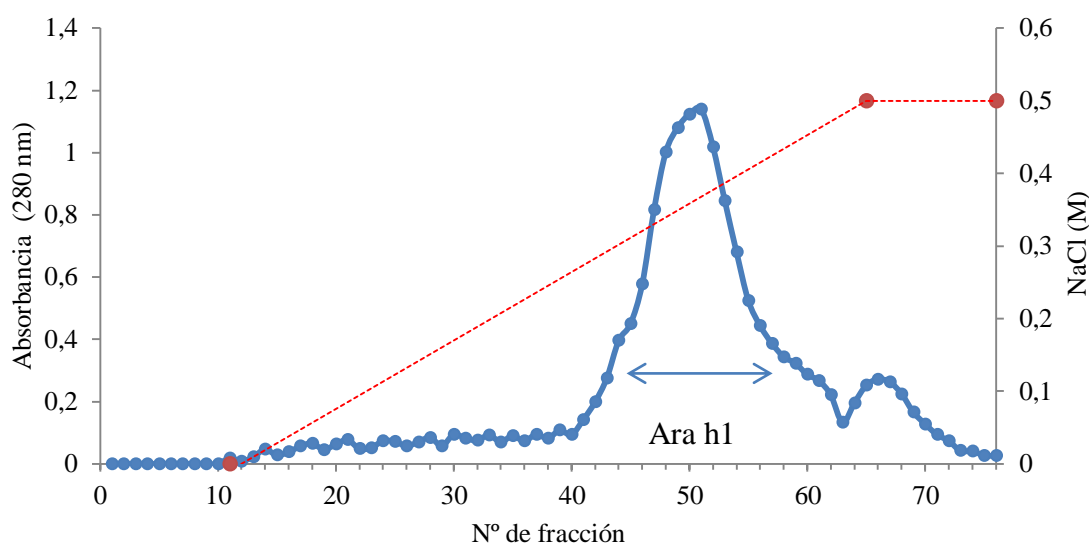


Figura 4. Perfil de la cromatografía en Sepharose Q de la fracción enriquecida en Ara h1 obtenida en la filtración en Sephacryl S-200. Las fracciones recogidas fueron de 2mL.

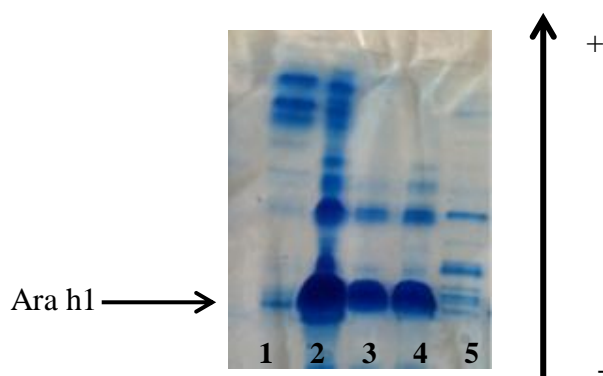


Figura 5. SDS- electroforesis en gel de poliacrilamida 4-20% de las fracciones de la cromatografía en Sepharose Q.

1: Fracciones 35 a 38

2: Muestra enriquecida en proteína Ara h1 del Sephacryl S- 200)

3: Fracción 48

4: Fracción 50

5: Fracciones 62 a 67

El aislamiento de la proteína Ara h1 se ha llevado a cabo utilizando diferentes tipos de cromatografía, entre las que destacan, la cromatografía de exclusión molecular (Boldt *et al.*, 2005; Van Boxtel *et al.*, 2006), de intercambio aniónico (Van Boxtel *et al.*, 2006; Burks *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 2005), hidrofóbica (Van Boxtel *et al.*, 2006) y de afinidad en Concanavalina A (Marsh *et al.*, 2008; Mondoulet *et al.*, 2005; Wichers *et al.*, 2004).

En este trabajo, a pesar de que la fracción enriquecida en proteína Ara h1, procedente de la cromatografía en Sepharose Q, se ha sometido a cromatografías en concanavalina A y en Azul de Cibacrón, no se ha obtenido en ningún caso un mayor grado de pureza, por lo que estas etapas no se han incluido en el protocolo de aislamiento de dicha proteína (resultados no mostrados).

Cuando la proteína Ara h1 se aisló para inmunizar conejos y obtener antisueros frente a ella, se seleccionó un menor número de fracciones de las cromatografías con el objeto de obtener una mayor pureza. En estos casos, el grado de pureza, determinado mediante densitometría, fue superior al 98%. Cuando la proteína Ara h1 se aisló para llevar a cabo los tratamientos con altas presiones, dado que se necesitaba disponer de una cantidad elevada de proteína, el número de fracciones tomadas de las cromatografías fue mayor, obteniéndose en estos aislamientos un grado de pureza de aproximadamente el 85%.

5.2. Obtención y caracterización de antisueros anti-Ara h1

Los antisueros frente a la proteína Ara h1 se obtuvieron mediante inoculación en conejos (grado de pureza del 98%, Figura 6a). La inmunorreactividad y la especificidad de los antisueros se comprobaron mediante las técnicas Western-blotting e inmunodotting (Figuras 6c y d). En la figura 6c, se muestran los resultados de la caracterización de los antisueros obtenidos mediante la técnica del Western-blotting en los que aparece una única banda coloreada en la muestra del extracto, que tiene la misma movilidad que la banda correspondiente a la Ara h1 (Figura 6b). Del mismo modo, en el inmunodotting (Figura 6d) aparecieron dos manchas coloreadas donde se aplicaron el extracto de cacahuete y la proteína Ara h1 y no hubo reacción en las otras proteínas aplicadas. Todo ello indica que el antisuero reconoce específicamente a la proteína Ara h1.

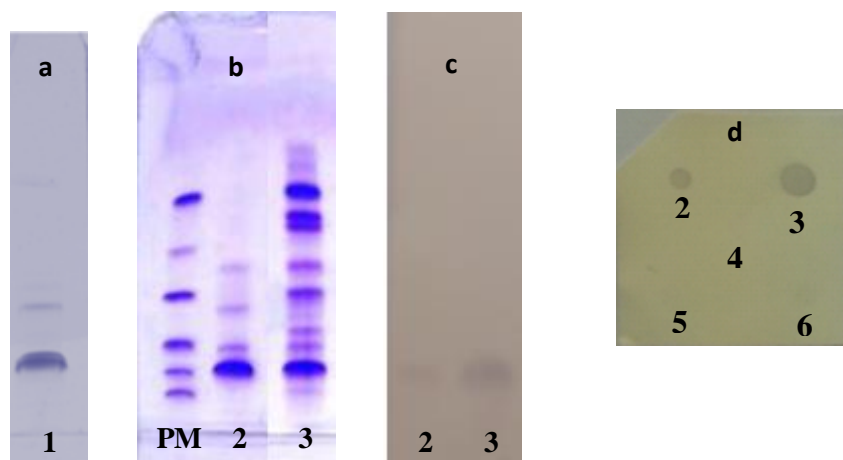


Figura 6. (a) y (b) SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25%, (c) Inmunodotting y (d) Western-blotting obtenidos utilizando un antisuero anti-Ara h1.

PM: patrón de pesos moleculares

1: Proteína Ara h1 grado de pureza del 98% (2mg/mL)

2: Proteína Ara h1 grado de pureza del 85% (2mg/mL)

3: Extracto de cacahuete (8mg/mL)

4: Lactoferrina (2mg/mL)

5: α -lactalbúmina (2mg/mL)

6: Proteína Ara h2 (2mg/mL)

El patrón está constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 kDa).

Para determinar el título de los anticuerpos se realizó una técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto. El título de un antisuero se define como el inverso de la dilución correspondiente al 50% de la máxima absorbancia obtenida. Un ejemplo de una curva de titulación se muestra en la Figura 7, cuyo título fue de 1/7.000 aproximadamente.

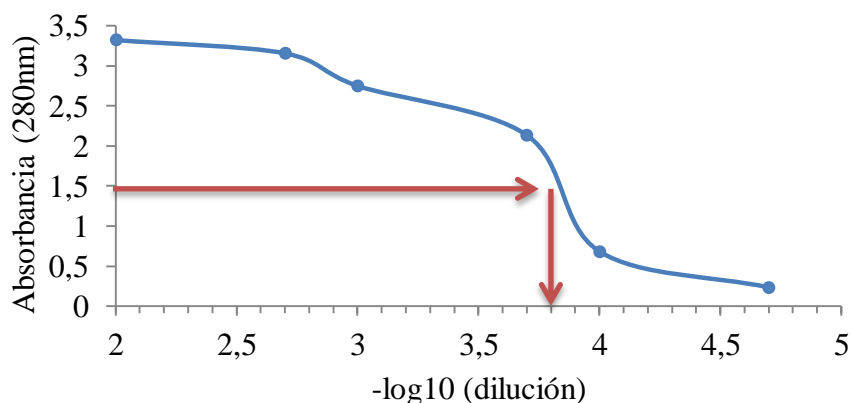


Figura 7. Curva de titulación de un antisuero frente a la proteína Ara h1 de cacahuete.

5.3. Aislamiento y conjugación de anticuerpos con peroxidasa

Los anticuerpos anti-Ara h1 presentes en los antisueros se aislaron mediante una cromatografía de afinidad, utilizando una columna que contenía Ara h1 insolubilizada en Sepharose 4B. En la Figura 8 se muestra el perfil de esta cromatografía.

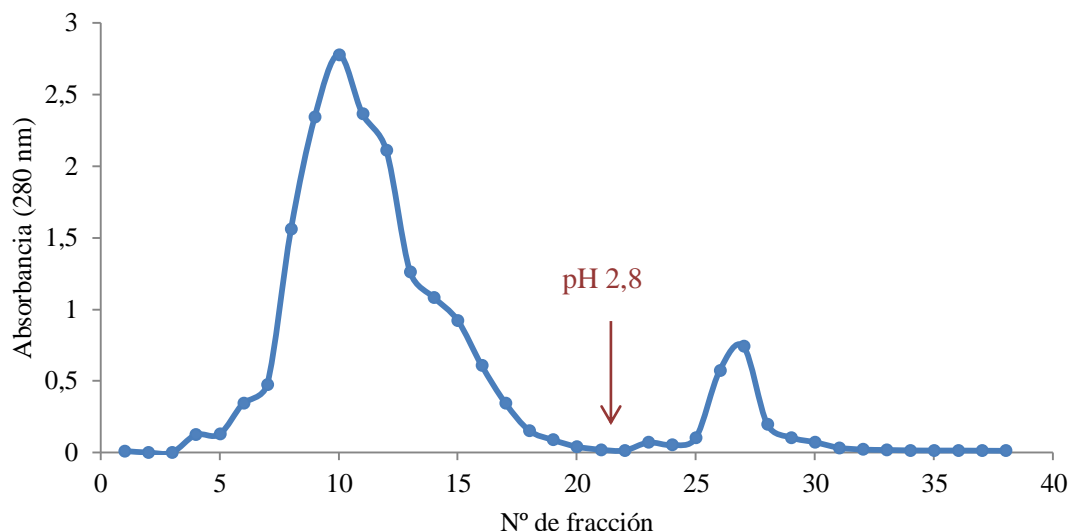


Figura 8. Cromatografía de un antisuero anti-Ara h1 utilizando una columna que contenía la proteína Ara h1 insolubilizada en Sepharose 4B. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. La flecha indica el momento de aplicación del tampón de elución.

En el perfil de la cromatografía se observan dos picos, en el primero, eluido con PBS que contenía 0,5 M NaCl, eluyen los componentes del antisuero que no interaccionan con el inmunoabsorbente. El segundo pico, eluido a pH 2,8, contiene los anticuerpos que han interaccionado con la proteína Ara h1. El análisis de las fracciones mediante una técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto, mostró la ausencia de anticuerpos específicos en el primer pico. Las fracciones 26 a 29 se recogieron, se concentraron por ultrafiltración y se congelaron a -20°C hasta uso. El rendimiento del proceso de aislamiento de los anticuerpos anti-Ara h1 a partir de los antisueros de conejo fue muy bajo por lo que se realizaron varios aislamientos. Posteriormente se llevó a cabo la conjugación de los anticuerpos con peroxidasa mediante el procedimiento descrito en el apartado de métodos.

5.4. Desarrollo de técnicas de ELISA para la determinación de la proteína Ara h1

En este trabajo se han desarrollado tres formatos de ELISA para la determinación de la proteína Ara h1 (sándwich y competitivo directo e indirecto, Figura 9a y b respectivamente). Para optimizar los ensayos, se realizaron diversas pruebas utilizando varias concentraciones y tampones de dilución para la fijación de la proteína y de los anticuerpos en la placa, distintos bloqueantes y tampones de lavado, así como varias diluciones y condiciones de dilución del antisuero y del conjugado.

Con el formato de tipo sándwich el ruido de fondo obtenido con el estándar cero (sin proteína) en PBS fue muy alto y se redujo al aumentar el pH. A pH 9,2 el ruido de fondo se consideró aceptable pero también se veía reducida considerablemente la absorbancia de los estándares de proteína (Figura 9a). En el caso de los formatos directo e indirecto, se obtuvo una recta estándar con mayor pendiente para el formato directo, hecho que se debe probablemente a que durante el aislamiento de los anticuerpos se han seleccionado los que tienen una mayor afinidad por la proteína Ara h1. Además, en este formato se evita una etapa de incubación, acortándose así la duración total del ensayo. Por todo ello, para los posteriores análisis se utilizó el formato directo para determinar la proteína Ara h1.

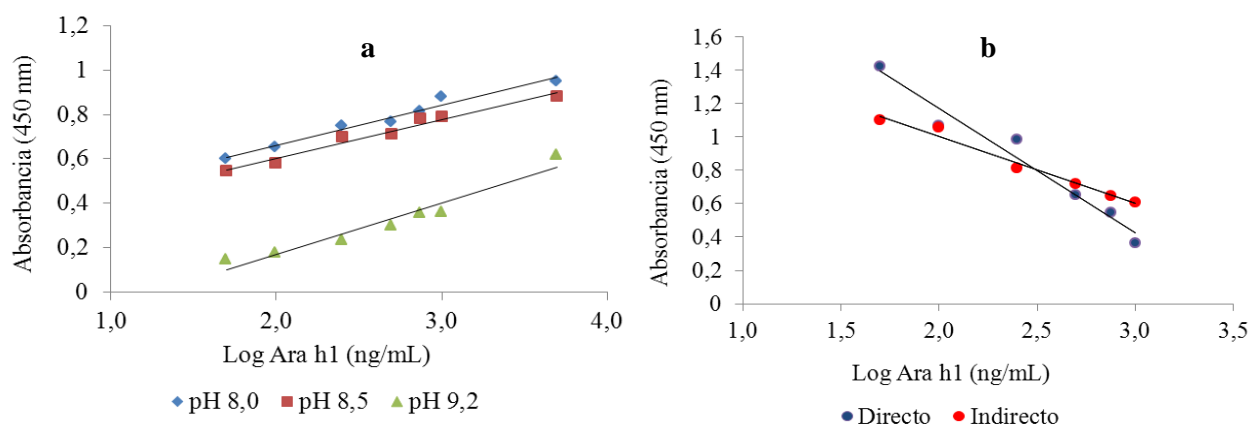


Figura 9. Curvas de calibración obtenidas mediante las técnicas de ELISA de tipo (a) sándwich y (b) directo e indirecto para la determinación de la proteína Ara h1.

En la Figura 10, se muestra la curva de calibración obtenida para determinar la proteína Ara h1 utilizando la técnica ELISA competitivo directo que fue lineal en un rango de concentraciones entre 50 ng/ mL y 5 µg/mL ($R^2 > 0,98$), con un límite de detección de 10,2 ng/mL y un límite de cuantificación de 20,6 ng/mL.

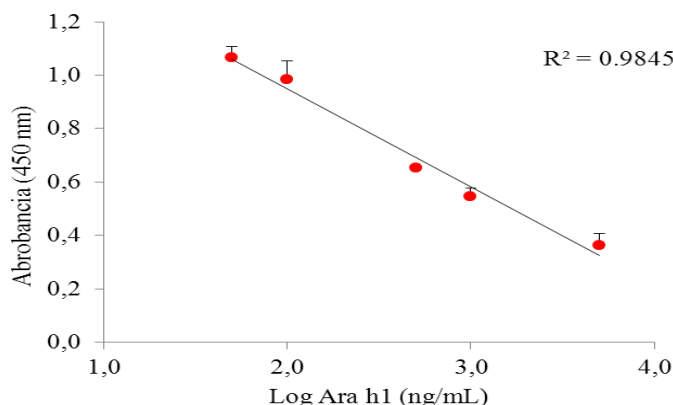


Figura 10. Curva de calibración de la técnica ELISA de tipo competitivo directo para la determinación de la proteína Ara h1.

5.5.Efecto del tratamiento con altas presiones en la proteína Ara h1

En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tiene el tratamiento con altas presiones en la desnaturalización de la proteína Ara h1. Para ello, un extracto de cacahuete y la proteína purificada se sometieron a diferentes presiones y tiempos de tratamiento. El grado de desnaturalización se determinó midiendo la pérdida de la inmunorreactividad de la proteína Ara h1 mediante una técnica de ELISA de tipo competitivo directo. Además, algunas de las muestras tratadas de la proteína purificada se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas y en condiciones desnaturalizantes, en presencia de SDS con y sin β -mercaptoetanol.

5.5.1.Determinación de la proteína inmunorreactiva

En la Figura 11 se muestra la relación entre la concentración de proteína inmunorreactiva a cada presión y tiempo de tratamiento, y la concentración inicial de la proteína Ara h1 obtenida tras el tratamiento de la proteína purificada (a) y del extracto de cacahuete (b).

Como puede observarse en la Figura 11a, la proteína Ara h1 mantiene su inmunorreactividad tras el tratamiento a 200 MPa a todos los tiempos estudiados y a 300 MPa, la disminución de la concentración de la proteína inmunorreactiva es muy baja, menor a un 15% tras 30 minutos. A 400 MPa, se observa una disminución gradual hasta un 50% del valor inicial en los primeros 10 minutos, y después la concentración se mantiene prácticamente constante a tiempos mayores. A 500 y 600 MPa, la concentración de proteína inmunorreactiva disminuye de forma muy marcada en el primer minuto, y después lentamente, obteniéndose una disminución del 53% y el 70% a los 20 minutos de tratamiento.

En el tratamiento del extracto de cacahuete (Figura 11b), el comportamiento de la proteína Ara h1 a 200 y 300 MPa fue similar al observado con la proteína purificada. A presiones mayores, la disminución de la proteína Ara h1 inmunorreactiva fue muy marcada en el primer minuto de tratamiento, obteniéndose una disminución del 53%, 57% y 78 % tras 20 minutos a 400, 500 y 600 MPa, respectivamente.

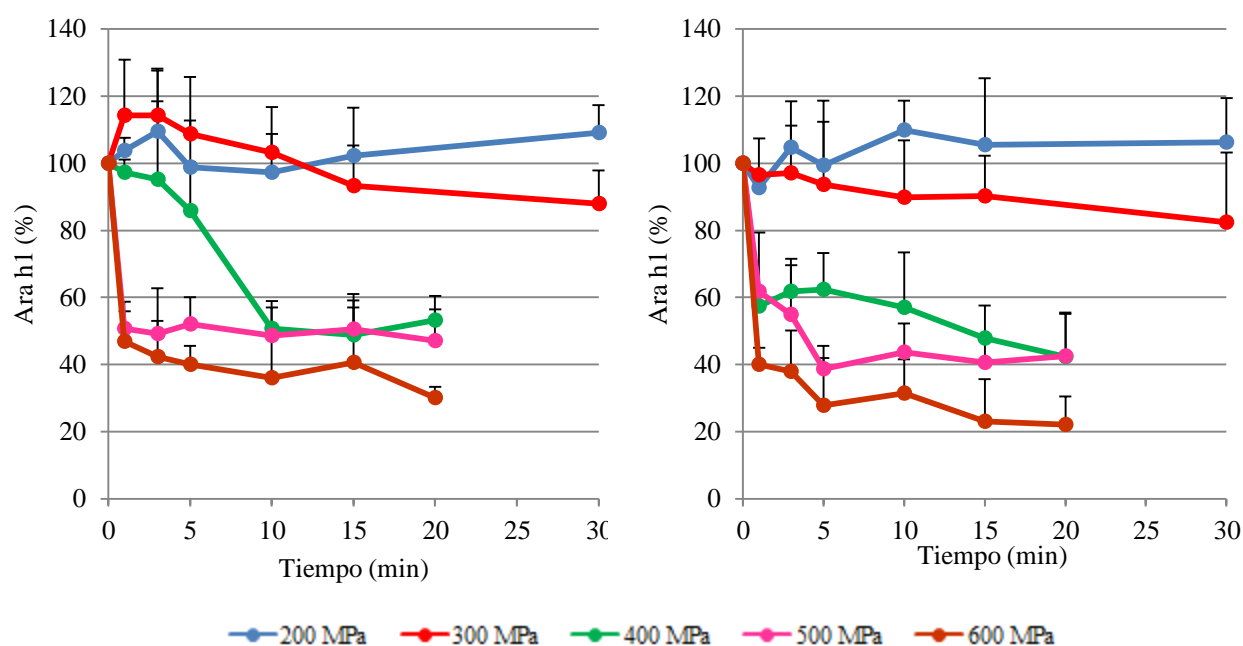


Figura 11. Efecto de las altas presiones sobre la desnaturación de la proteína Ara h1 del cacahuete (a) purificada y (b) en extracto, a diferentes presiones y tiempos de tratamiento.

Existen muy pocos estudios sobre el efecto de las altas presiones en las proteínas alergénicas del cacahuete. Huang *et al.* (2014) determinaron el efecto del tratamiento entre 200 y 800 MPa en las proteínas del cacahuete utilizando un test comercial de ELISA de tipo sándwich con anticuerpos frente a un extracto de proteína de cacahuete. Estos autores observaron que el tratamiento de un extracto de cacahuete a 200 MPa no disminuía la concentración de proteínas inmunorreactivas y obtuvieron una disminución del 50% a 400 MPa y del 70% a 600 y 800 MPa tras tratarlo 10 minutos a esas presiones, valores que son similares a los obtenidos en este trabajo.

Hu *et al.* (2011) trataron un extracto de cacahuete con presiones entre 50 y 200 MPa durante 5 minutos y observaron mediante SDS-electroforesis una disminución en la intensidad de la fracción de conaraquina II, en la que se encuentra mayoritariamente la proteína Ara h1, mientras que la presión no tenía efecto en el perfil de bandas de las fracciones de araquina y conaraquina de tipo I.

Johnson *et al.* (2010) también indicaron que el tratamiento con altas presiones a 600 y 700 MPa a 20°C y a 80°C no tenía efecto en la estructura de la proteína Ara h2, determinada por la técnica de dicroísmo circular.

5.5.2. Determinación del perfil electroforético

Las muestras de proteína Ara h1 sometidas a altas presiones se analizaron utilizando distintos tipos de electroforesis. En la electroforesis en condiciones nativas (Figura 12a), la proteína Ara h1 se muestra como una banda difusa cuya intensidad y extensión es mayor en la muestra sin tratar que en la tratada a 600 MPa durante 20 minutos. Además, en la muestra tratada se observa un incremento en la intensidad del color en el punto de aplicación de la muestra, lo que indica la presencia de agregados de alto peso molecular, que no pueden penetrar en el gel. Al analizar el sobrenadante y el precipitado obtenidos tras centrifugar la muestra tratada a 16.060 g durante 15 minutos, se observa que en la carrera del sobrenadante la banda difusa de la proteína es muy tenue, pero no aparecen agregados en el punto de aplicación de la muestra, que sí se visualizan en el precipitado.

En la figura 12b se muestra la SDS-electroforesis de la proteína Ara h1 tratada a diferentes presiones. La muestra sin tratar presenta una banda de aproximadamente 63

kDa que corresponde a la forma monómera de la proteína. En las muestras tratadas, la intensidad de la banda de 63 kDa es menor para todas las presiones aplicadas. Además, aparecen otras bandas bastante difusas de mayor peso molecular a 400 MPa y a presiones superiores, indicando la presencia de agregados. En estas muestras no se observa color en el punto de aplicación de las muestras, lo que indica que los agregados observados en condiciones nativas se han disgregado en parte, debido al efecto del detergente. Estos resultados indican que algunos de los agregados formados por efecto de la presión, son debidos a interacciones de tipo no covalente.

Al analizar las mismas muestras en condiciones reductoras no se observaron diferencias entre la muestra sin tratar y las tratadas, lo cual indica que los agregados observados en la SDS-electroforesis de las muestras tratadas son debidos a interacciones covalentes mediante puentes disulfuro.

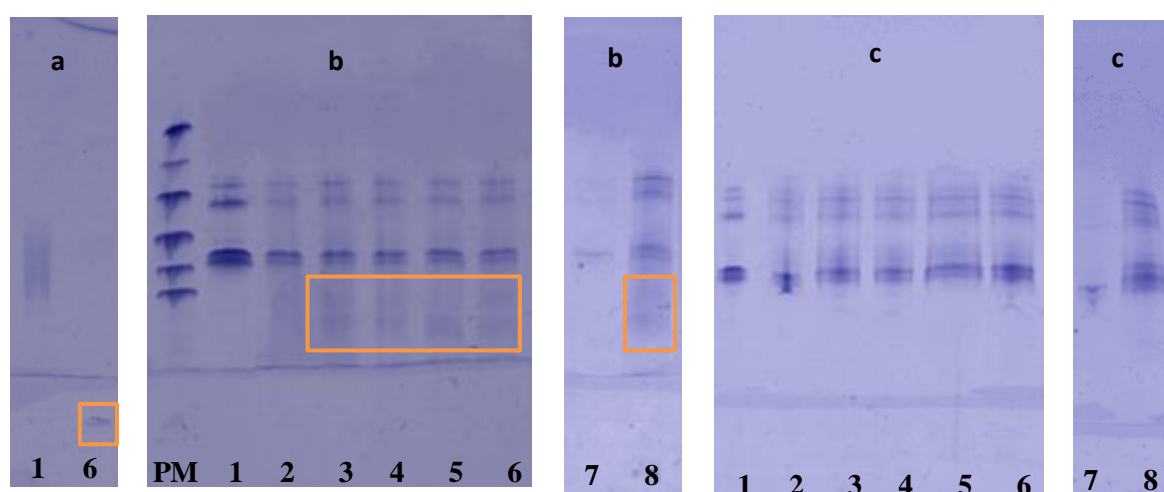


Figura 12. (a) Electroforesis nativa, (b) SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% sin β -mercaptoetanol y (c) con β -mercaptoetanol.

PM: patrón de pesos moleculares

1: Ara h1 sin tratar

2: Ara h1 300 MPa 30 min

3: Ara h1 400 MPa 20 min

4: Ara h1 500 MPa 20 min

5: Ara h1 600 MPa 5 min

6: Ara h1 600 MPa 20 min

7: Ara h1 600 MPa 20 min (sobrenadante)

8: Ara h1 600 MPa 20 min (precipitado)

El patrón está constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 kDa).

5.5.3. Efecto de los reactivos NEM y KIO_3 en la desnaturalización de la proteína Ara h1

Se ha estudiado también el efecto que tiene en la desnaturalización de la proteína Ara h1 la adición al medio de tratamiento del reactivo NEM, que es un compuesto que bloquea los grupos sulfidrilo, y de KIO_3 que induce la oxidación de los grupos sulfidrilo.

5.5.3.1. Determinación de la proteína inmunorreactiva

Los resultados obtenidos en el tratamiento de la proteína Ara h1 en presencia de dichos reactivos a 400 y 600 MPa durante 20 minutos se muestran en la Figura 13. Como puede observarse, la adición de NEM no afecta a la proteína sin tratar y el grado de desnaturalización de la proteína tratada es menor que en ausencia del reactivo. Por el contrario, la adición de KIO_3 induce la desnaturalización de la proteína Ara h1 y aumenta su sensibilidad frente a las altas presiones.

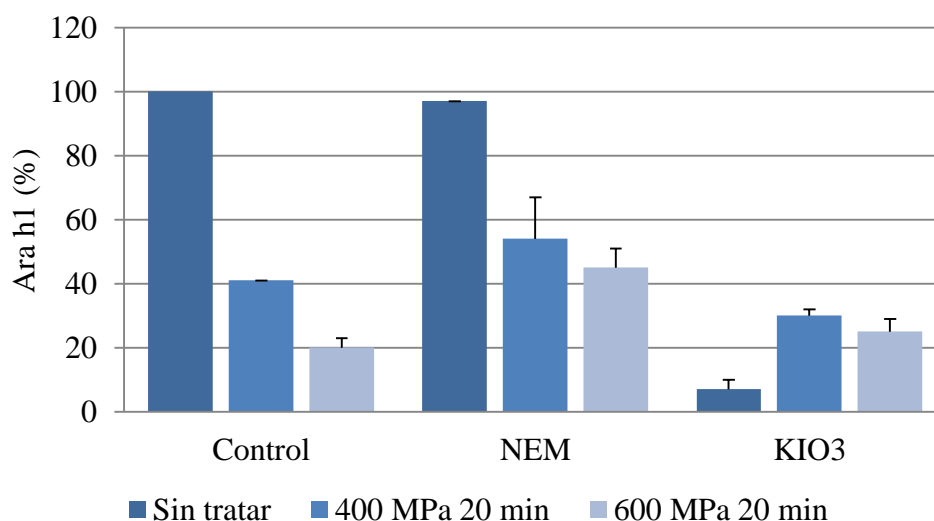


Figura 13. Efecto de la adición de los reactivos NEM y KIO_3 sobre la desnaturalización de la proteína Ara h1 del cacahuete purificada tratada a 400 y 600 MPa durante 20 minutos.

5.5.3.2. Determinación del perfil electroforético

En la electroforesis en condiciones nativas, la banda de la proteína Ara h1 en las muestras tratadas es más tenue que en la muestra sin tratar, tanto en presencia como en ausencia de los reactivos añadidos. En todas las muestras se observa la presencia de agregados de alto peso molecular que no entran en el gel. A pesar de que la electroforesis es una técnica cualitativa, se observa en la Figura 14a como la intensidad de la banda difusa de la Ara h1 es mayor en las muestras tratadas con NEM a pesar de que todas las muestras tenían la misma concentración de proteína. Este hecho sugiere que la presencia de NEM previene en parte la agregación de la proteína. La adición a la muestra de DMF, utilizada para disolver del NEM, no afectó el perfil de la proteína ya que es similar al de la muestra tratada en ausencia del reactivo.

El análisis de las mismas muestras mediante SDS-electroforesis (Figura 14b) muestra que el perfil es similar para la proteína tratada en ausencia y en presencia de DMF, observándose la formación de agregados, mientras que estos agregados no se observan en las muestras tratadas en presencia de NEM y KIO₃. La intensidad de la banda de la Ara h1 en estas muestras es similar a la no tratada. La electroforesis en condiciones reductoras muestra un perfil similar en todas las muestras, lo que indica que los agregados observados en la SDS-electroforesis están formados por enlaces covalentes.

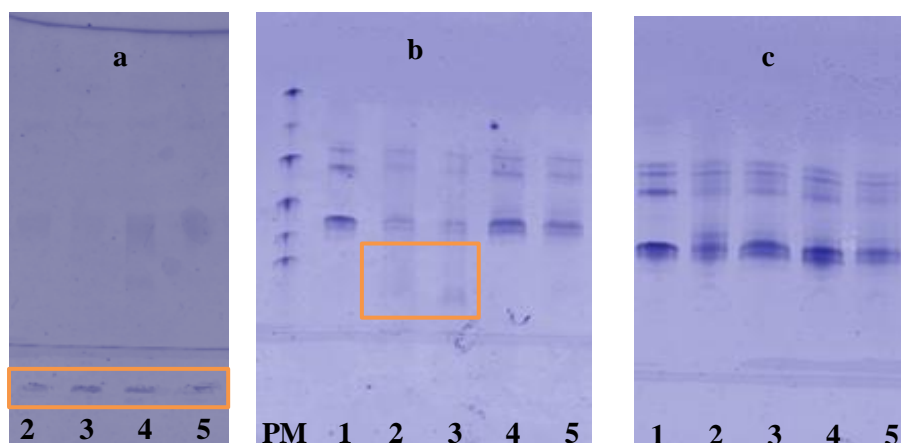


Figura 14. (a) Electroforesis nativa, (b) SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% sin y (c) con β -mercaptoetanol.

PM: patrón de pesos moleculares

1: Ara h1 sin tratar

2: Ara h1 600 MPa 20 min

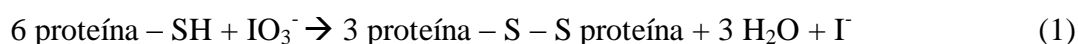
3: Ara h1 600 MPa 20 min DMF

4: Ara h1 600 MPa 20 min NEM

5: Ara h1 600 MPa 20 KIO₃

El patrón está constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97 kDa), albúmina sérica bovina (67 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y α -lactalbúmina bovina (14,4 kDa).

El efecto protector del NEM en la desnaturalización de la proteína Ara h1 por efecto de las altas presiones ha sido observado también en otras proteínas como la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina (Huppertz *et al.*, 2003; Mazri *et al.*, 2014 ; Yang *et al.*, 2002). Este efecto se ha atribuido al bloqueo del grupo sulfidrilo libre de la proteína que previene las reacciones de oxidación de los grupos sulfidrilo y/o las reacciones de intercambio sulfidrilo-disulfuro que inducen la agregación de las proteínas por interacciones covalentes (Yang *et al.*, 2002). Por el contrario, la menor baroestabilidad de la proteína Ara h1 cuando es tratada en presencia de KIO_3 coincide con los resultados obtenidos en el tratamiento de la β -lactoglobulina con altas presiones (Mazri *et al.*, 2014). Se conoce que el KIO_3 puede oxidar las proteínas como se indica a continuación (Huppertz *et al.*, 2003):



En nuestro estudio, la reacción (2) parece ser la que ocurre de forma preferente ya que no se observan agregados en la SDS-electroforesis de estas muestras. Además, la inmunorreactividad de la proteína nativa sin tratar disminuye de forma muy marcada al añadirle este reactivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las altas presiones inducen un cambio conformacional en la proteína Ara h1 que da lugar a la exposición del grupo sulfidrilo libre de la proteína, el cual, a través de reacciones de oxidación y de intercambio de sulfidrilo-disulfuro produce la agregación de la proteína por interacciones covalentes. Además, el cambio conformacional por efecto de la presión induce la formación de agregados de la proteína por interacciones no covalentes.

6. Conclusiones

1. La aplicación de técnicas de precipitación salina y de técnicas cromatográficas permite obtener la proteína alergénica Ara h1 del cacahuete con un alto grado de pureza.
2. La inoculación de la proteína Ara h1 purificada en conejos da lugar a la obtención de antisueros con un alto título, que reaccionan con la proteína de forma específica por las técnicas de inmunodotting y Western-blotting.
3. El formato de la técnica de ELISA de tipo competitivo directo resulta más adecuado que el de tipo competitivo indirecto y el de tipo sándwich para la determinación de la proteína Ara h1.
4. La desnaturalización de la proteína Ara h1 por efecto de las altas presiones, determinada como la pérdida de la reactividad de la proteína con sus anticuerpos específicos, es muy baja a 200 y 300 MPa. A presiones de 400 MPa y superiores, se produce una marcada desnaturalización que tiene lugar en los primeros minutos del tratamiento. El grado de desnaturalización es similar al tratar la proteína purificada en tampón y en un extracto de cacahuete.
5. El reactivo N-etilmaleimida muestra un efecto protector en la desnaturalización de la proteína Ara h1 inducida por la presión, que parece deberse al bloqueo del grupo sulfidrilo libre de la proteína, lo que previene su agregación mediante enlaces covalentes. La presencia de este reactivo no previene la agregación de la proteína mediante interacciones no covalentes.
6. El tratamiento con altas presiones de la proteína Ara h1 en presencia de iodato potásico aumenta su desnaturalización e inhibe su agregación por enlaces covalentes debido probablemente a la oxidación del grupo sulfidrilo libre de la proteína. La presencia de este reactivo no previene la agregación de la proteína mediante interacciones no covalentes.

7. El mecanismo de la desnaturalización de la proteína Ara h1 por las altas presiones parece deberse a un cambio conformacional de la proteína, que produce por una parte la exposición de su grupo sulfidrilo libre y la posterior agregación mediante puentes disulfuro y/o reacciones de intercambio sulfidrilo-disulfuro y por otra parte la agregación mediante enlaces no covalentes.

7. Bibliografía

- AESAN, Miembros del Comité Científico. 2007. Informe del Comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias. Revista del Comité Científico; 5, 5.
- Beyer, K., Morrow, E., Xiu-Min Li, M., Bardina, L., Bannon, G.A., Wesley, B., y Sampson H.A. 2001. Effects of cooking methods on peanut allergenicity. The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 107: 1077-1081.
- Boldt, A., Fortunato, D., Conti, A., Petersen, A., Ballmer-Weber, B., Lepp, U., Reese, G. y Becker, W. M. 2005. Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. Proteomics, 5: 675-686.
- Bousoiio, C. 1999. Mesa redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Principales formas clínicas de presentación. Boletín Pediátrico, 39: 148-151.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G. y Obrien, T, 1991. Identification of a major peanut allergen, Ara h1, in patients with atopic-dermatitis and positive peanut challenges. Journal of Allergy Clinical Immunology, 88: 172-179.
- Burks, A.W., Williams, L.W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T.J., y Helm, R.M. 1992. Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara hII, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 90 (6): 962–969.
- Chassaigne, H., Brohée, M., Nørgaard, J.V., y Van Hengel, A.J. 2007. Investigation on sequential extraction of peanut allergens for subsequent analysis by ELISA and 2D gel electrophoresis. Food Chemistry, 105: 1671-1681.
- Chung, S.Y., Yang, W., y Krishnamurthy, K. 2008. Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. Journal of Food Science, 73 (5): C400–C404.
- Cianferoni, A., y Spergel, J.M. 2009. Food Allergy: Review, classification and diagnosis. Allergology International, 58: 457-466.
- Directiva 2003/89/CE, de 10 de noviembre de 2003, por la que se modifica la Directiva 2001/13/EC, en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los

productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 308, 25 de noviembre de 2003, 15-18. Real Decreto 2220/2004.

Directiva 2005/26/CE, de 21 de marzo de 2005, por la que se establece una lista de sustancias o ingredientes alimentarios excluidos provisionalmente del anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, L 75, 22 de marzo de 2005, 33-34. Real Decreto 1164/2005.

Directiva 2006/142/CE, de 22 de diciembre de 2006, por la que se modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, en el que figura la lista de ingredientes que, en cualquier circunstancia, deben indicarse en el etiquetado de los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 368, 23 de diciembre de 2006, 110-111. Real Decreto 36/2008.

Directiva 2007/68/CE, de 27 de noviembre de 2007, que modifica el anexo III bis de la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a determinados ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 310, 28 de noviembre de 2007, 11-14. Real Decreto 1245/2008.

FAO/WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of food derived from biotechnology, Rome, Italy, January, 22-25.

Flinterman, A., Van Hoffen, E., den Hartog Jager, C., Koppelman, S., Pasmans, S., Hoekstra, M., Bruijnzeel-Koomen, C., Knulst, A., y Knol, E. 2007. Children with peanut allergy recognize predominantly Ara h2 and Ara h6, which remains stable over time. *Clinical and Experimental Allergy*, 37 (8): 1221-1228.

He X. H., Liu H. Z., Liu L., Zhao G. L., Wang Q., y Chen Q.L. 2014. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 36: 123-129.

Hefle, S. L., Nordlee, J. A., y Taylor, y S. L. 1996. Allergenic foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36: 69-89.

Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van de Broeck, I., y Weemaes, C. 1998. Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 197-203.

- Hu, C.Q., Chen, H.B., Gao, J.Y., Luo, C.P., Ma, X.J., y Tong, P. 2011. High-pressure microfluidisation-induced changes in the antigenicity and conformation of allergen Ara h 2 purified from Chinese peanut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 1304-1309.
- Huang, H. W., Yang B. B., y Wang C.Y. 2014. Effects of high pressure processing on immunoreactivity and microbiological safety of crushed peanuts. *Food Control*, 42: 290-295.
- Huppertz T., Fox P. F., y Kelly L. A. 2004. High pressure-induced denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*, 71: 489-495.
- IUIS. International Union of Immunological Societies. Allergen Nomenclature Subcommittee. Accesible en: <http://www.allergen.org/>. [Acceso el 28/4/2014].
- Johnson, P.E., Van der Plancken, I., Balasa, A., Husband, F.A., Grauwet, T., Hendrickx, M., Knorr, D., Mills, E.N.C., y Mackie, A.R. 2010. High pressure, thermal and pulsed electric-field-induced structural changes in selected food allergens. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54: 1701-1710.
- Koppelman, S.J., Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M., Hessing, M. y de Jongh H.H.J. 1999. Heat-induced conformational changes of Ara h1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 4770-4777.
- Koppelman, S.J., Vlooswijk, R.A., Knippels, L.M., Knol, E.F., van Reijssen, F.C., y Bruijnzeel-Koomen, C.A. 2001. Quantification of major peanut allergens Ara h1 and Ara h2 in the peanut varieties Runner, Spanish, Virginia, and Valencia, bred in different parts of the world. *Allergy*, 56: 132-137.
- Koppelman, S.J., y Hefle, S.L. 2006. Detecting allergens in food. Woodhead publishing in Food Science and Technology. ISBN 978-1-85573-728-0.
- Maleki, S. J., Kopper, R. A., Shin, D. S., y Park, C-W. 2000 b. Structure of the Major Peanut Allergen Ara h1 May Protect IgE-Binding Epitopes from Degradation. *The American Association of Immunologists*, 164: 5844-5849.
- Maleki, S. J., Viquez, O., Jacks, T., Dodo, H., Champagne, E., Chung, S-Y., y Landry, S. 2003. The major peanut allergen, ara h2, functions as a trypsin inhibitor and

- roasting enhances this function. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 112 (1): 190-195.
- Maleki, S.J., Chung, S.Y., Champagne, E.T., y Raufman, J.P. 2000a. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 106: 763-768.
- Mañas, P., y Pagán, R. 2005. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 1387–1399.
- Marsh, J., Rigby, N., Wellner, K., Reese, G., Knulst, A., Akkerdaas, J., van Ree, R., Radauer, C., Lovegrove, A., Sancho, A., Mills, C., Vieths, S., Hoffman-Sommergruber, K., y Sherwry, P.R. 2008. Purification and characterisation of a panel of peanut allergens suitable for use in allergy diagnosis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52: S272-S285.
- Mataix, J. 2002. *Tabla de composición de los alimentos*. Granada. Ed. Universidad de Granada. ISBN: 50-3-338-3050-3.
- Mazri, C., Sánchez, L., y Pérez M. D. 2014. Effect of high-pressure and heat treatments on denaturation and aggregation of bovine whey proteins: influence of sulphhydryl modifying agents and glycerol. *IDF Bulletin*. En prensa.
- Mills, E.N.C., Jenkins, J., Marigheto, N., Belton, P.S., Gunning, A.P., y Morris, V.J. 2002. Allergens of the cupins superfamily. *Biochemical Society Transactions*, 30: 925-929.
- Mondoulet, L., Paty, E., Drumare, M. F., Ah-Leung, S., Scheinmann, P., Willemot, R. M., Wal, J. M. y Bernard, H. 2005. Influence of thermal processing on the allergenicity of peanut proteins. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 53: 4547-4553.
- Montserrat, M., Mayayo, C., Sánchez, L., Calvo, M., y Pérez, M.D. 2013. Study of the thermoresistance of the allergenic Ara h1 protein from peanut (*Arachis hypogaea*) effect of high pressure treatment on bovine whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (13): 3335–3340.
- Nordlee, J.A. y Taylor, S.L. 1995. Immunological analysis of food allergens and other food proteins. *Food Technology*, 2: 129-132.

- Palmer, G. W., Dibbern, D. A., Burks, A. W., Bannon, G. A., Bock, S. A., Porterfield, H. S., McDermott, R. A. y Dreskin, S. C. 2005. Comparative potency of Ara h 1 and Ara h 2 in immunochemical and functional assays of allergenicity. *Clinical Immunology*, 115: 302-312.
- Pomés, A., Butts, C.L., y Chapman, M.D. 2006. Quantification of Ara h1 in peanuts: why roasting makes a difference. *Clinical and Experimental Allergy*, 36: 824-830.
- Poms, R.E., Klein, C.L., y Anklam, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21: 1-31.
- Raso, J., y Barbosa-Cánovas, G. V. 2003. Non thermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3):265-285.
- Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. *Diario Oficial de la unión Europea*, L 304/18, 22 de noviembre de 2011.
- Sáiz, J., Montealegre, C., Marina, M. L., y García-Ruiz, C. 2013. Peanut Allergens: An Overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (7): 722-737.
- Sampson, H.A. 2004. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: 805-819.
- Sampson, H.A., Srivastava, K., Li, X.M., y Burks, A.W. 2003. New perspectives for the treatments of food allergy (peanut). *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut*, 94: 236-244.
- Sicherer, S.H., Muñoz-Furlong, A., y Sampson, H.A. 2003. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112(6):1203-1207.
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 152-158.
- Strobel, S., y Hourihane, J. 2001. Gastrointestinal allergy: clinical symptoms and immunological mechanisms. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12(14): 43-46.
- Taylor, S. L. y Hefle, S. L. 2001. Will genetically modified foods be allergenic? *Current Reviews of Allergy and Clinical Immunology*, 107: 765-771.

- Van Boxtel, E. L., Van Beers, M. M. C., Koppelman, S. J., Van den Broek, L. A. M. y Gruppen, H. 2006. Allergen Ara h 1 occurs in peanuts as a large oligomer rather than as a trimer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7180-7186.
- Wen, H.W., Borejjsza-Wysocki, W., DeCory, T.R., y Durst, R.A. 2007. Peanut allergy, peanut allergens, and methods for the detection of peanut contamination in food products. *Institute of Food Technologists*, 6: 47-58.
- Wen, H.W., Borejjsza-Wysocki, W., DeCory, T.R., y Durst, R.A. 2005. Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, 382: 1217-1226.
- Wichers, H. J., De Beijer, T., Savelkoul, H. F. J. y van Amerongen, A. 2004. The major peanut allergen Ara h 1 and its cleaved-off N-terminal peptide: Possible implications for peanut allergen detection. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 52: 4903-4907.
- Yang J., Powers J. R., Clark S., Dunker A. K., y Swanson B. G. 2002. Hydrophobic Probe Binding of β -Lactoglobulin in the Native and Molten Globule State Induced by High Pressure as Affected by pH, KIO_3 and N-ethylmaleimide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5207-5214.
- Zugasti, A. 2009. Intolerancia alimentaria. *Endocrinología y Nutrición*, 56: 241-250.