



Trabajo Fin de Grado

Desarrollo de técnicas inmunoquímicas para la determinación de proteínas alergénicas de melocotón

Autor:

Ana Pilar Tobajas de la Fuente

Directores:

María Dolores Pérez Cabrejas
Santiago Condón Usón

Facultad de Veterinaria

Curso 2014/2015

Índice

1. Resumen.....	1
1.1. Abstract.....	1
2. Introducción.....	2
2.1. Alergia alimentaria.....	2
2.2. Alérgenos alimentarios y etiquetado.....	5
2.3. Alergia al melocotón.....	6
2.3.1. Introducción.....	6
2.3.2. Proteínas alergénicas del melocotón.....	7
2.3.3. Familia LT y proteína Pru p3.....	8
3. Justificación y objetivos.....	11
4. Materiales y métodos.....	12
4.1. Materiales.....	12
4.2. Métodos.....	12
4.2.1. Extracción de proteínas de alimentos.....	12
4.2.2. Aislamiento y caracterización de la proteína Pru p3.....	13
4.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose.....	13
4.2.2.2. Cromatografía de filtración en gel.....	13
4.2.3. Determinación de la concentración de proteína.....	13
4.2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	14
4.2.5. Caracterización de las proteínas por espectrometría de masas.....	15
4.2.6. Métodos inmunoquímicos.....	15
4.2.6.1. Obtención de antisueros.....	15
4.2.6.2. Inmunodifusión doble.....	16
4.2.6.3. Inmunodotting.....	16
4.2.6.4. Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto.....	17
4.2.6.5. Técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto.....	17
5. Resultados y discusión.....	18
5.1. Aislamiento de la proteína Pru p3.....	18
5.2. Caracterización de la proteína Pru p3 por espectrometría de masas.....	22
5.3. Obtención y caracterización de los antisueros anti-Pru p3.....	23
5.4. Optimización del ensayo ELISA.....	27

5.5. Efecto de los tratamiento tecnológicos en la desnaturalización de la proteína Pru p3.....	31
6. Conclusiones.....	34
6.1. Conclusions.....	34
7. Aportaciones en materia de aprendizaje.....	35
8. Bibliografía.....	36

1. Resumen

En España se estima que un 33% de los individuos alérgicos a alimentos son alérgicos a las frutas. De ellos, el 70% de los casos está asociado al consumo de frutas de la familia de las rosáceas, siendo el melocotón la fruta que con más frecuencia produce alergias. La Pru p3 es la proteína más alergénica del melocotón en los países del sur de Europa, y en nuestro país más del 40% de los individuos alérgicos a esta fruta tienen IgE frente a dicha proteína. La Pru p3 es una proteína básica de 9 KDa que presenta una elevada resistencia al calor y a la proteólisis digestiva, lo que le confiere la capacidad de producir reacciones alérgicas de considerable gravedad. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos (térmicos y de altas presiones) en la desnaturaleza de la Pru p3. Para llevar a cabo este estudio, la proteína se ha aislado a partir de melocotón crudo mediante técnicas cromatográficas y se ha caracterizado mediante electroforesis y espectrometría de masas. La proteína purificada se ha inoculado en conejos para obtener antisueros y con ellos, se ha diseñado una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto para su determinación, que tiene un límite de detección de 1,6 µg/ml. El grado de desnaturaleza por efecto de los tratamientos tecnológicos se ha determinado midiendo su inmunorreactividad mediante la técnica desarrollada. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento térmico (100 °C, 10 min) produce un grado de desnaturaleza de la Pru p3 mayor al 80%, mientras que los tratamientos de altas presiones (400, 500 y 600 MPa, 15 min) no afectan su estructura. Cuando las muestras tratadas se ensayaron en un ELISA de tipo competitivo indirecto utilizando el suero de individuos alérgicos al melocotón, no se observaron diferencias en la inmunorreactividad de la Pru p3 con las IgE.

Abstract

In Spain, it has been estimated that about 33% of food allergic individuals are allergic to fruits. Of them, about 70% of the cases are associated with the consumption of fruits from the Rosaceae family, being peach the fruit which most often cause allergies. Pru p3 is the most allergenic protein of peach in south European countries. In Spain, more than 40% of allergic individuals to this fruit have IgE to this protein. Pru p3 is a basic 9-kDa protein that is highly resistant to heat and digestive proteolysis, giving it the capacity to produce allergic reactions of considerable severity. The aim of this study was to study the effect of technological treatments (thermal and high pressure) on

denaturation of Pru p3 protein. To carry out this study, the protein was isolated from crude peach by chromatographic techniques and characterized by electrophoresis and mass spectrometry. The purified protein was inoculated into rabbits to obtain antiserum which was used to develop an indirect competitive ELISA to determine Pru p3 concentration. This ELISA technique has a detection limit of 1.6 µg / ml. The degree of denaturation induced by technological treatments was determined by measuring their immunoreactivity by the technique developed. Results obtained indicate that heat treatment (100 ° C, 10 min) produced a denaturation of Pru p3 greater than 80%, while high pressure treatments (400, 500 and 600 MPa, 15 min) did not affect their structure. When processed samples were analysed using an indirect competitive ELISA using the sera of peach allergic individuals, no differences in immunoreactivity of Pru p3 with IgE were observed.

2. Introducción

2.1 Alergia alimentaria

La alergia alimentaria incluye aquellas reacciones adversas a alimentos debidas a su ingestión, contacto o inhalación, que tienen una patogenia inmunológica comprobada. Estas reacciones no dependen de la dosis ingerida sino de la susceptibilidad de cada individuo. Las reacciones alérgicas a alimentos deben diferenciarse de las reacciones tóxicas y de las intolerancias alimentarias. Las reacciones de intolerancia se producen generalmente porque existe un déficit de enzimas implicadas en el metabolismo del alimento y las reacciones tóxicas por la ingestión de agentes químicos o biológicos presentes en el alimento. Ambas son dependientes de la dosis ingerida y no implican una respuesta inmune del individuo (Sampson, 2004; AESAN, 2007; Zugasti, 2009).

En la alergia alimentaria se incluyen tanto las reacciones mediadas por IgE (hipersensibilidad o alergia de tipo inmediato), como las producidas por cualquier otro mecanismo inmunitario conocido (reacciones no mediadas por IgE). En las primeras se dan unos títulos altos de anticuerpos de la clase IgE frente al alimento, mientras que en las segundas puede encontrarse un aumento de anticuerpos específicos de otras clases de inmunoglobulinas, complejos inmunes o una respuesta mediada por células. También pueden darse reacciones mixtas mediadas por IgE y por células (Taylor, 2000).

Las reacciones mediadas por IgE tienen una aparición rápida, generalmente en las dos primeras horas tras la ingestión o exposición al alimento (AESAN, 2007; López-Expósito et

al., 2013). Las reacciones alérgicas mediadas por células, también conocidas como reacciones de hipersensibilidad retardada, tienen un tiempo de inicio de 6-24 horas tras la ingestión del alimento responsable y se desarrollan lentamente, alcanzando un pico en aproximadamente 48 horas y remitiendo lentamente tras 72-96 horas (Taylor y Hefle., 2001).

La prevalencia de la alergia alimentaria, según datos de la EFSA, es del 1-2% en adultos y del 4 al 6% en niños. Los casos de reacciones alérgicas a alimentos se han incrementado en los últimos años, hecho que puede deberse a cambios en los hábitos alimenticios y a la complejidad de los ingredientes y procesos usados en la industria alimentaria (López-Expósito et al., 2013), pero también a la mayor concienciación de este tipo de reacciones en el sector médico y en los consumidores y al desarrollo de mejores métodos de diagnóstico (AESAN, 2007; EFSA, 2014). Por todo ello, las alergias alimentarias están consideradas en la sociedad actual como un grave problema de salud pública.

Los órganos involucrados en los casos de alergia alimentaria son principalmente la piel y el tracto gastrointestinal, aunque también puede verse afectado el tracto respiratorio y otros aparatos y sistemas. 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 (Tabla 1). 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 (Bousoño, 1999).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas atribuidas a alergia alimentaria (Molinas et al., 2004).

Digestivas	Respiratorias	Cutáneo-mucosas	Otras
Dolor abdominal	Rinitis	Urticaria	Anafilaxia
Nauseas y vómitos	Asma	Angioedema	Conjuntivitis
Diarrea	Tos crónica	Prurito	Artritis
Constipación	Otopatía serosa	Dermatitis atópica	Sme. tensión-fatiga
Malabsorción	Edema de glotis	Dermatit. perianal	Enuresis, cistitis
Enteropatía	Neumonía recurrente	Dermatit. herpetiforme	Cefaleas
Colitis ulcerativa	Hemosiderosis pulmonar	Síndrome oral, aftas	Muerte súbita
Cólicos		Rash de contacto	

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 interaccionan 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 (Aalberse, 2000).

El diagnóstico de la alergia alimentaria se puede realizar mediante la realización de un diagnóstico clínico y/o de un diagnóstico patogénico. El diagnóstico clínico se basa en la historia clínica del paciente y pruebas de eliminación-provocación, siendo la prueba de provocación oral a doble ciego controlada con placebo la más aceptada para confirmar una alergia alimentaria. Para el diagnóstico patogénico se pueden realizar pruebas cutáneas (prick-test) o serológicas, para demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos de la clase IgE frente al alimento sospechoso (Molinas et al., 2004).

El único tratamiento eficaz comprobado de la alergia alimentaria es evitar el contacto y la ingestión del alimento sensibilizante, mediante una dieta de eliminación estricta. Se ha comprobado que las dietas de eliminación conducen a la pérdida de reactividad a muchos alimentos (desarrollo de tolerancia clínica), después de uno o dos años, en alrededor de un tercio de los niños y adultos con alergia alimentaria mediada por IgE. En los últimos años, se están realizando con éxito terapias de desensibilización oral que consisten en la administración del alimento problema o de proteínas alergénicas recombinantes en pautas más o menos rápidas, con dosis progresivamente crecientes, con las que se puede alcanzar la tolerancia, al mismo tiempo que disminuye la tasa de IgE específica (Meglio et al., 2004; Martorell, 2007). La administración de anticuerpos anti-IgE monoclonales humanizados, capaces de unirse a las IgE circulantes que bloquean su unión con los receptores específicos de las células efectoras (mastocitos y basófilos), inhibiendo así la liberación de las sustancias activas que desarrollan el cuadro alérgico es otra alternativa en estudio (Leung et al., 2003).

2.2. Alérgenos alimentarios y etiquetado

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glicoproteínas hidrosolubles con un tamaño comprendido entre 10 y 70 kDa. La mayoría son estables al calor, a los ácidos y a las proteasas. Un alimento puede contener varias proteínas alergénicas. Estas proteínas pueden ser alérgenos mayores o menores, considerados así según sean, respectivamente, alérgenos a los cuales responda inmunitariamente más del 50% de los pacientes sensibilizados al alimento en cuestión o alérgenos a los que sólo responden menos del 50% de los pacientes. Algunos alérgenos son característicos del alimento particular, otros pueden ser compartidos con especies de la misma o próxima familia (p.e., pescados, leguminosas) y otros también pueden estar presentes incluso en familias alejadas filogénicamente. Estos últimos suelen corresponder a proteínas con una función similar (profilinas, tropomiosinas, seroalbúminas, etc.). Algunos se encuentran muy difundidos, conociéndose como "panalérgenos". Estos panalérgenos pueden estar implicados en las polisensibilizaciones que se detectan en muchos pacientes, tanto a alimentos solamente, como a alimentos y a neumoalérgenos. (Breitender, 2006).

Se han identificado más de 160 alimentos capaces de producir alergias, pero tan sólo 8 de ellos producen más del 95% de las reacciones alérgicas. En orden descendiente de frecuencia, éstos son: huevo, cacahuete, leche, frutos secos, soja, pescados, mariscos y trigo (FAO, 1995; Taylor y Lehrer, 1996).

En algunas ocasiones se producen fenómenos de reactividad cruzada entre proteínas que no tienen una relación taxonómica directa, pero que son reconocidas por un mismo tipo de IgE (Aalberse *et al.*, 2001), como es el caso de los denominados síndromes polen-frutas, látex-frutas o ácaros-marisco (Vieths *et al.*, 2002; Blanco, 2003).

Los alérgenos alimentarios se designan de acuerdo a un sistema de nomenclatura taxonómico que consta de cuatro letras y un número. Las tres primeras letras, que van juntas, corresponden al género, la cuarta a la especie, y el número al orden de identificación del alérgeno dentro de cada especie (Hoffman *et al.*, 1994; King *et al.*, 1994). Como ejemplo, el melocotón (*Prunus persica*) se designa como Pru p.

En el nuevo Reglamento (UE) nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011, con fecha de aplicación el pasado 13 de diciembre de 2014, se actualizó la normativa referida a la información facilitada al consumidor, incluyendo lo referente a sustancias o productos que causan alergias e intolerancias.

En el Anexo II del Reglamento citado, se recoge la lista de ingredientes o adyuvantes tecnológicos y sus derivados de mención obligatoria, que deben ser declarados tanto en alimentos envasados como en aquellos que no contengan envase. Esta lista se incluye en el Anexo I de esta memoria. 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.

2.3. Alergia al melocotón

2.3.1. Introducción

Se estima que en España un 33% de los individuos alérgicos a alimentos son alérgicos a las frutas. De ellos, el 70% de los casos está asociado al consumo de frutas de la familia de las rosáceas, siendo el melocotón la fruta que con más frecuencia produce alergias.

La sintomatología de la alergia al melocotón produce en la mayoría de los casos irritación en la boca y la garganta, e hinchazón de los labios. Estos síntomas aparecen tras 5-15 minutos y remiten antes de 60 minutos. Esta sintomatología se conoce como "síndrome de alergia oral". Algunos pacientes presentan reacciones más graves después de la ingesta de melocotón, precedidos o no por los síntomas anteriores, y con una afectación variable de la piel, el sistema digestivo y el respiratorio, y en algunos casos puede llegar a producir anafilaxia. En la piel se desarrollan habones (urticaria), con o sin hinchazón (angioedema) y pueden afectar a los labios y párpados o a toda la cara. Los síntomas digestivos pueden incluir ardor de estómago, vómitos y diarrea. La nariz y los pulmones están involucrados con menos frecuencia, originando picazón de nariz, estornudos y secreción acuosa, tos, opresión en el pecho, sibilancias y asma. Algunos pacientes alérgicos al melocotón pueden desarrollar reacciones generalizadas con afectación de la piel junto con otros órganos. Estas reacciones alérgicas generalizadas son conocidas como anafilaxis, y son de emergencia médica. Afortunadamente, sólo una minoría de los pacientes con anafilaxia presentan una disminución de la presión arterial. Esta es la reacción alérgica más grave y potencialmente mortal conocida como shock anafiláctico. Otras reacciones que amenazan la vida tales como ataque de asma severa o edema glótis se observan sólo de forma excepcional.

Las manifestaciones clínicas de la alergia al melocotón muestran marcadas diferencias según la zona geográfica. En el norte y centro de Europa, donde esta alergia está asociada a una alergia previa al polen de abedul, las proteínas causantes de la alergia al cacahuete son fácilmente degradadas por la cocción y el proceso de digestión (alérgenos lábiles), y por lo

tanto sólo pueden inducir reacciones de contacto locales en la boca y la garganta en la que todavía están intactos. Estas reacciones sólo son inducidas por el melocotón fresco por lo que los productos tratados térmicamente (zumos, mermeladas, etc) son bien tolerados.

Sin embargo, en el sur de Europa, en áreas sin abedules, la alergia al melocotón suele presentarse asociada a alergia a otras frutas o frutos de la misma familia como la manzana, la pera, la cereza, el albaricoque, la ciruela, la nectarina, la fresa y la almendra. La sintomatología de esta alergia puede ser grave. La mayoría de los pacientes tienen síntomas bucales, pero las reacciones generalizadas tales como urticaria (urticaria) y anafilaxia aparecen en más de un tercio de los pacientes. Estas reacciones se producen en muchos casos tras la ingesta tanto de melocotón crudo como procesado dada la naturaleza termoestable de las proteínas alérgicas implicadas en el proceso (Pastorello et al., 1999; Brenna et al., 2000; Taylor, 2000; Sampson, 2004).

2.3.2. Proteínas alergénicas del melocotón

Se ha descrito la presencia de varias proteínas alergénicas presentes en el melocotón que se encuadran en diferentes familias. La familia de las profilinas son proteínas asociadas al citoesqueleto de numerosas plantas y participan en la forma y movimiento de las células del mundo vegetal. Estas proteínas se consideran verdaderos panalérgenos responsables de la reactividad cruzada entre frutas, verduras y pólenes. La familia del grupo PR-10 (pathogenesis related proteins), cuyas proteínas son conocidas como homólogos de la proteína Bet v1 del abedul. Las proteínas de estas dos familias son sensibles al calor y a los enzimas digestivos por lo que dan lugar al síndrome de alergia oral. El grupo de la familia 14, o proteínas de transferencia de lípidos (llamadas LTP), se caracterizan por su elevada resistencia al calor y a la proteólisis digestiva, lo que les confiere la capacidad de poder afectar a varios sistemas del organismo. En la Tabla 2 se incluye los patrones de sensibilización de alérgenos alimentarios vegetales pertenecientes a estas familias en pacientes con alergia a los frutos de la familia Rosaceae de diferentes áreas geográficas europeas y en la Tabla 3 la relación de proteínas alergénicas del melocotón reconocidas por la Sociedad Internacional de Inmunología (IUIS).

Tabla 2. Patrones de sensibilización de alérgenos alimentarios vegetales (Salcedo, G., et al, 2007)

Fruta	Nº de pacientes	País	Sensibilización (%) a:		
			LTPs	PR-10	Profilinas
Melocotón	76	España	62	7	34
Cereza	121	Suiza y Alemania	11	96	18
	22	España	91	5	9
Manzana	99	Países Bajos	1	70	13
	94	Austria	2	84	11
	99	España	47	16	41

Tabla 3. Proteínas alergénicas del melocotón (IUIS; Pasini et al, 2010; Tuppo et al., 2014)

Proteína	Peso molecular	Tipo
Pru p1	17 KDa	PR-10
Pru p2	25-28 KDa	Taumatinia
Pru p3	9 KDa	LTP
Pru p4	14-17 kDa	Profilina
Pru p7	7 kDa	Giberelina

2.3.3. Familia LTP y proteína Pru p3

La denominación de esta familia de proteínas deriva de su potencial en estudios realizados in vitro para unir y transferir lípidos entre membranas. Sin embargo, su principal función no está relacionada con esta propiedad, sino con la de participar en mecanismos de defensa en las plantas frente a la acción de bacterias y hongos patógenos.

La familia de proteínas de transferencia de lípidos incluye un grupo de proteínas básicas de 9 kDa (90-95 residuos de aminoácidos), que tienen 8 cisteínas que forman 4 puentes disulfuro, que son cruciales para explicar la alta estabilidad y potencia alergénica de estas proteínas. Las proteínas de la familia LTP son muy ubicuas ya que están presentes en numerosas plantas. En la mayoría de los casos son proteínas extracelulares que forman parte del tejido epidérmico asociado a las paredes celulares, lo que explica la mayor potencia alergénica que tiene la piel en comparación con la pulpa de las frutas de la familia de las rosáceas (Borges et al., 2006).

Las proteínas alergénicas de esta familia se encuentran en numerosos vegetales incluyendo frutas, verduras, frutos secos, cereales y también el latex y algunos pólenes. Estas proteínas presentan con la proteína Pru p3 del melocotón una homología de secuencia entre el 45 y el 92%. Esta alta homología explica la alta reacción cruzada que existe entre las proteínas de diversos vegetales pertenecientes a esta familia así como con el polen de árboles de los géneros *Artemisia* y *Platanus*. En la Figura 1 se muestra la reacción cruzada entre diversas proteínas de la familia LTP tomando como referencia la Pru p3 del melocotón (Aalberse et al., 2000; Pasquato et al., 2006; González-Mancebo et al., 2011; Larocca, 2013; EFSA, 2014).

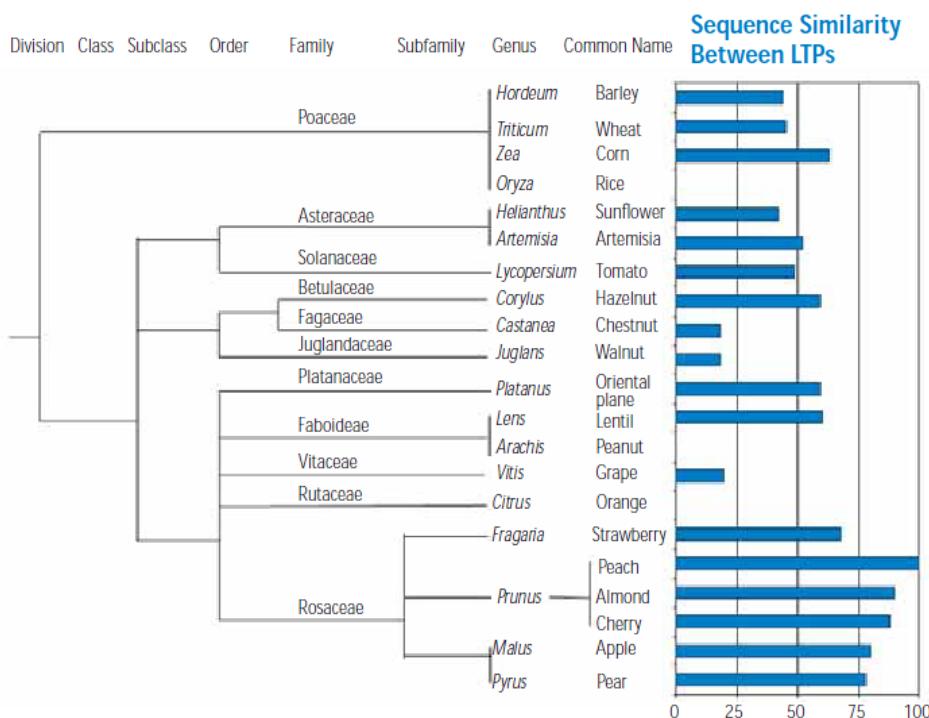


Figura 1. Similitud de secuencia entre proteínas de la familia LTP de varias fuentes con respecto a la Pru p3 del melocotón (García y Lizaso, 2011)

Las proteínas de la familia LTP son consideradas como verdaderos alérgenos dada su alta resistencia a la proteólisis así como su capacidad para inducir sensibilización por vía oral y producir una sintomatología grave y sistémica. Además de su resistencia frente a las proteasas, las proteínas LTP muestran una elevada resistencia frente a los tratamientos térmicos ya que mantienen su alergenicidad (capacidad de unirse a las IgE del suero de pacientes alérgicos) tras tratamientos a temperaturas de hasta 100-120 °C. Estas características hacen que las proteínas LTP mantengan su capacidad alergénica en alimentos vegetales procesados (Brenna et al., 2000). Respecto a la distribución geográfica, estas proteínas presentan tasas de sensibilización mayores al 50% en individuos alérgicos a

muchos vegetales, entre ellos el melocotón, en el sur de Europa, pero menores a un 15% en el centro y norte de Europa (Yeast y Rose, 2007; Salcedo et al., 2008).

La proteína Pru p3 es la proteína más alergénica del melocotón en los países del sur de Europa. En España, más del 40% de los individuos alérgicos al melocotón tienen IgE frente a dicha proteína. Su alta prevalencia ha hecho que haya sido objeto de numerosos estudios en los ámbitos de la bioquímica y la inmunología y a nivel de estudios clínicos, por lo que es probablemente la proteína de la familia LTP vegetales mejor caracterizada (Fernández-Rivas et al., 2003; Salcedo et al., 2007; Salcedo et al., 2008; Van Ree, et al, 2015). Desde su aislamiento en el año 1999 por Pastorello et al. (1999), se ha demostrado su relevancia clínica, se ha codificado su DNA y se ha expresado en *Pichia pastoris* (Díaz-Perales et al., 2002). Además, se han desarrollado métodos inmunoquímicos para su cuantificación en diferentes cultivares de melocotón y nectarina, en los que se han detectado concentraciones entre 5,5 y 41,1 µg/g del peso fresco de la fruta entera, siendo la concentración en la piel del orden de unas 250 veces mayor que en la pulpa de la fruta (Duffort et al., 2002, Ahrazem et al., 2007).

La estructura de la proteína está compuesta por un dominio compacto de estructura hélice alfa con cuatro hélices que incluyen 57 de los 90 aminoácidos de la proteína. Su estructura se halla además estabilizada por 4 puentes disulfuro que se encuentran conectando las cuatro hélices. La proteína contiene un bolsillo hidrofóbico que muestra una alta afinidad para unir ligandos lipídicos. En la Figura 2 se muestra la estructura de la Pru p3 (Salcedo et al., 2008).

Utilizando diferentes técnicas analíticas, se han identificado los determinantes antigenicos o epítopos de la Pru p3 que interaccionan con las IgE del suero de los individuos alérgicos. Esta interacción parece estar determinada por interacciones iónicas entre las IgE y residuos básicos localizados en las posiciones 11-25, 31-45, y 71-80 de la proteína. (De Oliveira et al., 2007).

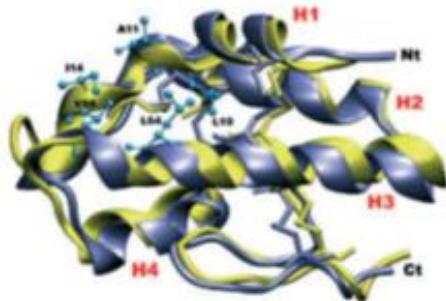


Figura 2. Modelo estructural de la proteína Pru p3. Las cuatro hélices características de la LTP se indican como H1-H4, Nt y Ct son los extremos N y C terminales y los enlaces representan los cuatro puentes disulfuro. En color azul se representan los residuos del bolsillo hidrofóbico de la proteína (Salcedo, G. et al, 2008)

3. Justificación y objetivos

El melocotón es una de las frutas que con mayor frecuencia da lugar a alergias en los países del sur de Europa. Las manifestaciones clínicas de esta alergia suelen ser graves y en un tercio de los casos pueden llegar a producir un choque anafiláctico. La Pru p3 es la proteína más alergénica del melocotón y se caracteriza por presentar una elevada resistencia al calor y a la proteólisis digestiva, propiedades que se han relacionado con su alto potencial alergénico.

El objetivo principal de este trabajo Fin de Grado ha sido estudiar el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos en la desnaturalización de la Pru p3 ya que los cambios en su estructura podrían inducir una disminución de su capacidad alergénica. Los tratamientos seleccionados han sido tanto los térmicos, por ser los que se usan habitualmente en la industria alimentaria, como las nuevas tecnologías de conservación, concretamente las altas presiones, por su potencial aplicación en los productos derivados del melocotón.

Para poder llevar a cabo este estudio, era preciso disponer primero de una técnica que permitiera estimar el grado de desnaturalización de la Pru p3 inducida por dichos tratamientos. Las técnicas inmunoquímicas constituyen una herramienta analítica que puede ser utilizada para este fin, ya que permiten determinar cambios en la estructura de las proteínas midiendo su pérdida de inmunorreactividad, lo que permite a su vez calcular los parámetros cinéticos de su desnaturalización. Por ello, la mayor parte de este trabajo ha estado dedicada a desarrollar una técnica de ELISA en placa para cuantificar la Pru p3 inmunorreactiva. La parte final de esta memoria, dedicada al estudio del efecto de los tratamientos tecnológicos en la desnaturalización de dicha proteína puede considerarse como un estudio preliminar que habrá que continuar al tener ya disponible una técnica analítica para su determinación.

Así, para llevar a cabo el objetivo principal de este trabajo, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Aislamiento de la proteína Pru p3 a partir de extractos de melocotón crudo.
- Obtención de antisueros anti-Pru p3 mediante inoculación en conejos
- Desarrollo de una técnica ELISA de tipo competitivo indirecto para cuantificar la proteína Pru p3.

- Estudiar el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos (térmicos y de altas presiones) en la desnaturalización de la proteína Pru p3.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

El melocotón de la variedad Calanda fue proporcionado por el grupo de Tecnología Postcosecha. Los conjugados comerciales de IgG de cabra anti-IgG de conejo y anti-IgE humanas marcados con peroxidasa, la agarosa, los adyuvantes de Freund completo e incompleto, los geles SP-Sepharose y Sepadex G-50 fueron suministrados por Sigma (Poole, Reino Unido). 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 bicinconílico (BCA) y el estabilizador del conjugado de la peroxidasa, eran de Pierce (Rockford, IL, EEUU). El 4-cloro-1-naftol fue suministrado por Merck (Darmstand, Alemania). 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 resto de productos utilizados no señalados específicamente fueron reactivos de tipo analítico obtenidos de diversas fuentes.

4.2. Métodos

4.2.1. Extracción de proteínas de alimentos

La piel de diversos alimentos crudos (melocotón, albaricoque, manzana, cereza, ciruela, uva y zanahoria) se homogeneizó en un ultraturrax. Para ello, se pesaron 10 g de las correspondientes pieles y se añadieron 10 ml de tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6.0 que contenía la sal sódica del ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA), 2 mM, sodio dietilditiocarbamato trihidrato (DIECA) y/o polivinilpolipirrolidona (PVPP) 10 mM y azida sódica 3 mM. La mezcla se mantuvo en agitación durante 2 h a 4 °C y después se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 30 min. Los sobrenadantes obtenidos se dializaron

frente a tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0 y se conservaron en congelación a -18°C hasta su uso.

4.2.2. Aislamiento y caracterización de la proteína Pru p3

Se preparó un extracto de piel de melocotón como se ha indicado en el apartado anterior a partir de 300 g de piel a los que se añadieron 60 mL.

4.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico en SP-Sepharose

El extracto dializado se aplicó en una columna de SP-Sepharose Q (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 el mismo tampón que contenía NaCl 1M. El flujo se mantuvo a 0.3 ml/min y las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2.2.2. Cromatografía de filtración en gel

Las fracciones eluidas de la cromatografía anterior con NaCl 1M se mezclaron, se dializaron frente a tampón fosfato pH 7.0 y se liofilizaron. A la muestra liofilizada se le añadió 1 ml del mismo tampón y se aplicó en una columna de Sephadex G-50 (77 x 1 cm) equilibrada con el mismo tampón. El flujo se mantuvo a 0.5 ml/min y las fracciones recogidas fueron de 2 mL.

4.2.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína de los extractos se determinó usando el test del ácido bicinconílico. Para ello, se prepararon previamente estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato sódico pH 7.0 en un rango de concentraciones entre 125 µg/mL y 2 mg/mL y varias diluciones de las muestras a analizar. Despues, se añadieron en los pocillos de una microplaca, 25 µL de los estándares o las muestras por duplicado y 200 µL del reactivo BCA. 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 recta 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 recta.

4.2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se tomaron 50 μ L de muestra y se mezclaron con 40 μ L del tampón TRIS 10 mM pH 8,0 que contenía 0,01 % de azul de bromofenol para poder visualizar el frente electroforético y EDTA 1mM. Posteriormente se añadieron 10 μ L de SDS al 25% (p/v, en agua destilada) y 5 μ L de β -mercaptoetanol. La mezcla se mantuvo en ebullición en un baño a 100 °C durante 5 min. Las electroforesis se realizó utilizando geles comerciales de 8-25% de acrilamida, en un equipo Phast System (Pharmacia, Upsala, Suecia) siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante para este tipo de gel y condiciones del análisis.

Una vez finalizada la electroforesis, las bandas de proteínas se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie 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 cubrieron totalmente con el colorante y se mantuvieron en agitación durante una hora. Después se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante para aclarar los geles. El decolorante se preparó con 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Los geles permanecieron en la mezcla de decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había bandas de proteína.

Tras esta tinción, se realizó una tinción con plata de los geles. Para ello, el gel se incubó durante 30 minutos en una solución que contenía 35 mL de etanol, 7 mL de ácido acético y 28 mL de agua Milli-Q. A continuación, el gel se incubó durante 15 minutos en una solución que contenía 7 mL de la solución anterior y 53 mL de agua Milli-Q y después se lavó con agua Milli-Q durante 5 minutos 3 veces. Seguidamente, el gel se incubó durante un minuto en una solución compuesta por 12 mg de tiosulfato de sodio y 60 mL de agua Milli-Q. Tras lavar el gel con agua Milli-Q durante 30 segundos 3 veces, se incubó durante 20 minutos con una solución que contenía 0,12 g de nitrato de plata, 60 mL de agua Milli-Q y 45 μ L de formaldehido al 37 %. Se realizaron tres lavados de nuevo con agua Milli-Q durante 20 segundos dos veces y después el gel se incubó durante 2-3 minutos con la solución de revelado que contenía 3,6 g de carbonato de sodio, 30 μ L de formaldehido al 37%, 58,8 mL de agua Milli-Q y 1,2 mL de la solución de tiosulfato de sodio. Seguidamente, el gel se incubó durante 10 minutos con una solución compuesta de 3 mL de ácido acético y 57 mL de agua Milli-

Q y finalmente se incubó durante 10 minutos con 7 mL de glicerina y 53 mL de agua Milli-Q.

4.2.5. Caracterización de las proteínas por espectrometría de masas

Para identificar la proteína purificada se sometió a una electroforesis y la banda obtenida se recortó del gel y se envió a la unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, para realizar un análisis de identificación de proteínas mediante huella peptídica por la técnica de espectrometría de masas. La proteína de la banda seleccionada fue reducida, alquilada y digerida en el gel con tripsina como indican Sechi y Chait (1998). El análisis para la identificación de la proteína se llevó a cabo en un espectrómetro de masas 4800 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canadá). El aparato operó en modo reflector positivo, con un voltaje de aceleración de 20.000 v. En el espectro MS se seleccionaron de 1 a 4 péptidos péptidos precursores con buena intensidad y separados de otros péptidos como mínimo en +/- 4 Da (ventana de Masa) para ser aislados, cada uno de ellos en un análisis independiente, en una cámara y fragmentados por colisión con gas atmosférico (Collision Induced Disociation, CID), los fragmentos producidos son detectados con el método de operación 1Kv ion reflector en modo positivo.

Las masas de los péptidos obtenidos se compararon con las masas de los péptidos teóricas indicadas en la base de datos NCBI. Esta comparación se realizó con el motor de búsqueda MASCOT 2.3 a través del software Global Protein Server (GPS) v. 3.6 (ABSCIEX), en la base de datos NCBI usando los siguientes parámetros: carbamidometilcisteinas como modificación fija y oxidación de metioninas como modificación variable; tolerancia de masa del péptido, 50 ppm; 1 punto de corte perdido para la tripsina; tolerancia de masa de los fragmentos MS-MS de 50 ppm.

4.2.6. Métodos inmunoquímicos

4.2.6.1. Obtención de antisueros

Se obtuvieron antisueros en conejos frente a la proteína Pru p3 según el siguiente protocolo. A cada conejo se le inyectaron por vía subcutánea 0,4 mg de proteína disuelta en 0,5 mL de tampón fosfato potásico 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (SSF), 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 8-

10 días de esta segunda inoculación se extrajo una pequeña cantidad de sangre que se dejó coagular para obtener el suero. La presencia en el suero sanguíneo de anticuerpos frente a las proteínas inoculadas se comprobó por las técnicas de inmunodifusión doble, ELISA e inmunodotting, como se describe a continuación. Si resultaba positiva, se extraían 30 ml de sangre por punción en la vena marginal de la oreja con una cánula de mariposa, y se le inyectaba subcutáneamente la misma cantidad de suero fisiológico estéril. En las extracciones sucesivas los animales tuvieron un tiempo de recuperación de 15 días, repitiéndose las inoculaciones cada 30 días.

La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente y se mantuvo en refrigeración durante toda la noche tras lo cual se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos, y posteriormente se congeló en alícuotas a -20°C hasta su utilización.

4.2.6.2. Inmunodifusión doble

La inmunodifusión doble se realizó según el método de Ouchterlony (1948) en geles de agarosa al 1% en tampón 5,5-dietilbarbiturato sódico 30 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,4, preparados sobre portaobjetos. Las muestras se dejaron difundir durante 24 h en una cámara húmeda en la que se introdujeron algunos cristales de timol como conservante.

Después, los geles se lavaron al menos durante 48 h con SSF, que se cambió varias veces y, finalmente, con agua destilada. Tras secar los geles, los inmunoprecipitados se tiñeron con una solución de colorante azul de Coomassie G (0,25 g de colorante Azul de Coomasie tipo G, 450 mL de metanol, 60 mL de ácido acético y 490 mL de agua destilada) y posteriormente se sumergieron en decolorante hasta que quedaron incoloras las zonas del gel donde no había inmunoprecipitados.

4.2.6.3. Inmunodotting

Las muestras (1 μ L) 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 1 h 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 suero correspondiente en ovoalbúmina al 3% (p/v) en SSF, a temperatura ambiente durante 1 h en agitación suave. La hoja se lavó 5 veces con SSF y se incubó con anti IgE humanas conjugadas con peroxidasa, diluidas 1/1.000 en ovoalbúmina al 3% (p/v) en SSF a temperatura ambiente durante 1 h. La hoja se lavó como en la etapa anterior, y para el revelado se incubó con el

sustrato que contenía 6 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 2 mL de metanol, 8 mL de SSF y 10 μ L de H₂O₂ al 30%.

4.2.6.4. Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto

Los pocillos se tapizaron con 120 μ L/pocillo de la proteína Pru p3 (20 μ g/ml) o de un extracto de melocotón 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 μ L/pocillo de agua destilada y se incubaron con 300 μ L/pocillo de una solución de ovoalbúmina al 3% (p/v), 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) a temperatura ambiente durante 2 h, con el objeto de saturar todos los puntos de unión de proteínas. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con agua destilada y se dejaron secar hasta su utilización. Antes del ensayo, las placas se lavaron 3 veces con PBS que contenía 0,5% de Tween-20 (PBST). Para el ensayo, las placas se incubaron con 100 μ L/pocillo de diferentes diluciones del suero de conejo o humano correspondiente a 37 °C durante 1 h. Tras 5 lavados con PBST, se añadieron 100 μ L/pocillo de una dilución adecuada de anti-IgG o anti-IgE marcadas con peroxidasa en PBS, se mantuvieron a 37 °C durante 1 h y se lavaron de nuevo 5 veces con PBST. Por último, se añadieron 100 μ L/pocillo de una solución del sustrato comercial que contenía tetrametilbencidina (TMB), y tras 20 min de incubación a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ L/pocillo de H₂SO₄ 2 M. La absorbancia de los pocillos se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia).

4.2.6.5. 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 μ L/pocillo de las diferentes soluciones estándar o de las muestras problema, y con 50 μ L/pocillo del antisuero anti-Pru p3 diluido 1/1000. Tras la incubación, la placa se lavó 5 veces con PBST y se añadieron 100 μ L/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 anterior.

5. Resultados y discusión

5.1. Aislamiento de la proteína Pru p3

La proteína Pru p3 se aisló a partir de un extracto de melocotón de la variedad Calanda. Para la extracción, se probaron tampones de distinto pH (5,0 y 6,0) y la adición de diversos reactivos (PVPP, EDTA, DIECA y azida sódica). El reactivo PVPP forma complejos con los compuestos fenólicos, inhibiendo así las reacciones de pardeamiento. Los reactivos DIECA y EDTA son quelantes de metales que inhiben la acción de enzimas, entre ellas, oxidasa, que necesitan iones metálicos para ejercer su actividad. La azida sódica es un inhibidor microbiano, por lo que se ha usado como conservante en todos los tampones.

En la Figura 3 se muestran los resultados en la extracción de la piel melocotón en presencia de los reactivos mencionados. La adición de EDTA y PVPP tanto al tampón de pH 7,0 como de pH 5,0 no inhibe las reacciones de pardeamiento, aunque como es esperable se observa un menor pardeamiento a pH más ácido. La adición de DIECA al tampón de pH 7,0 inhibe de forma marcada el pardeamiento del extracto, tanto en presencia como en ausencia de PVPP, pero cuando ambos reactivos se añaden juntos, la muestra presenta una gran turbidez.

Además, la presencia de PVPP o de DIECA en los tampones de extracción da lugar a un considerable aumento en la absorbancia a 280 nm de los mismos. Al efectuar una diálisis de los tampones, la absorbancia del tampón con DIECA disminuye de 2,2 a 0,06 mientras que la del tampón con PVPP disminuye de 0,31 a 0,13. Este hecho es debido a la diferencia en pesos moleculares de ambos reactivos, 225,31 para el DIECA mientras que el PVPP se comercializa con un tamaño de partícula de 110 μm . Por ello, el DIECA se elimina fácilmente por diálisis mientras que el PVPP no puede atravesar los poros de la membrana.

La presencia de PVPP y DIECA produce también interferencias cuando se usa la técnica del BCA para cuantificar las proteínas del extracto. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos con los tampones que contenían DIECA y PVPP en ausencia y presencia de BSA (0,2 mg/ml), proteína usada como estándar en los ensayos, antes y después de llevar a cabo la diálisis de los mismos. Como puede observarse, tanto el tampón como las muestras de BSA dan una mayor absorbancia con los tampones sin dializar que las muestras control, preparadas en ausencia de dichos reactivos, siendo

comparativamente mucho mayor las obtenidas con DIECA. Tras dializar los tampones, las absorbancias son similares a las de las muestras control.

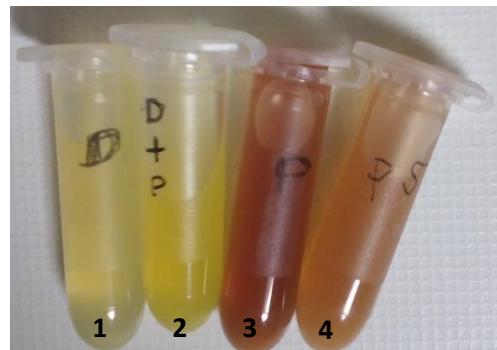


Figura 3. Extracto de melocotón obtenido con diferentes tampones: (1) pH 6,0 con DIECA; (2) pH 6,0 con DIECA y PVPP; (3) pH 7,0 con PVPP; (4) pH 5,0 con PVPP.

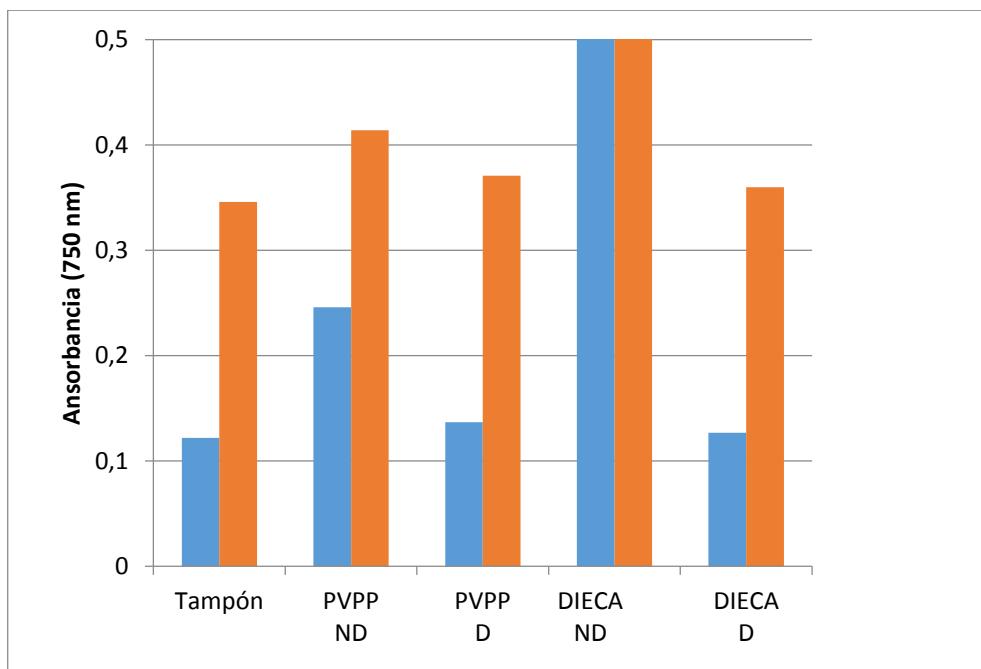


Figura 4. Absorbancia de las muestras de tampón fosfato pH 6,0 sin (azul) y con BSA (naranja) incubadas con el reactivo del ensayo del BCA. PVPP y DIECA indican que el tampón contiene dichos reactivos. ND: tampón no dializado; D: tampón dializado.

Por ello, se seleccionó para la extracción el tampón fosfato sódico 10 mM, pH 6,0 que contenía EDTA 2 mM y DIECA 10 mM como inhibidores del pardeamiento y azida sódica como conservante. Aunque la combinación de los reactivos EDTA, PVPP y DIECA ha sido utilizada en trabajos previos (Pastorello et al., 1999, Carnés et al., 2012), Saito et al (2010) obtuvieron una mayor concentración de Pru 3 en el melocotón extraído sólo con EDTA y DIECA que con PVPP. Así mismo, se ha indicado que la utilización de

un tampón con un pH entre 5,0 y 6,0 es más eficiente para la extracción de la Pru p3 que tampones de pH mayor (7,0) o menor (4,0) (Saito et al., 2010).

El extracto obtenido se centrifugó, se dializó frente a tampón acetato-3 hidrato sódico 50 mM pH 5,0 y se aplicó a una columna de intercambio catiónico de SP-Sepharose cuyo perfil se muestra en la Figura 5a. Tras aplicar la muestra, la columna se lavó con el tampón de extracción hasta que la absorbancia a 280 nm del eluido fue menor a 0,02. Las fracciones eluidas en estas condiciones constituyen el primer pico del cromatograma y corresponden a los componentes de la muestra que no interaccionan con la matriz cromatográfica. Después, los componentes que habían interactuado con el gel se eluyeron al aplicar el mismo tampón que contenía NaCl 1M.

Las fracciones obtenidas en la cromatografía anterior se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras utilizando geles con un gradiente de acrilamida de 8-25% (Figura 5b). Como puede observarse, en el gel teñido con Azul de Comassie se visualizan pocas bandas en las muestras, que si se observan mediante la tinción con plata por su mayor sensibilidad. Asimismo, se observa que en el segundo pico se encuentra una proteína de 9 kDa, además de otras proteínas de mayor peso molecular.

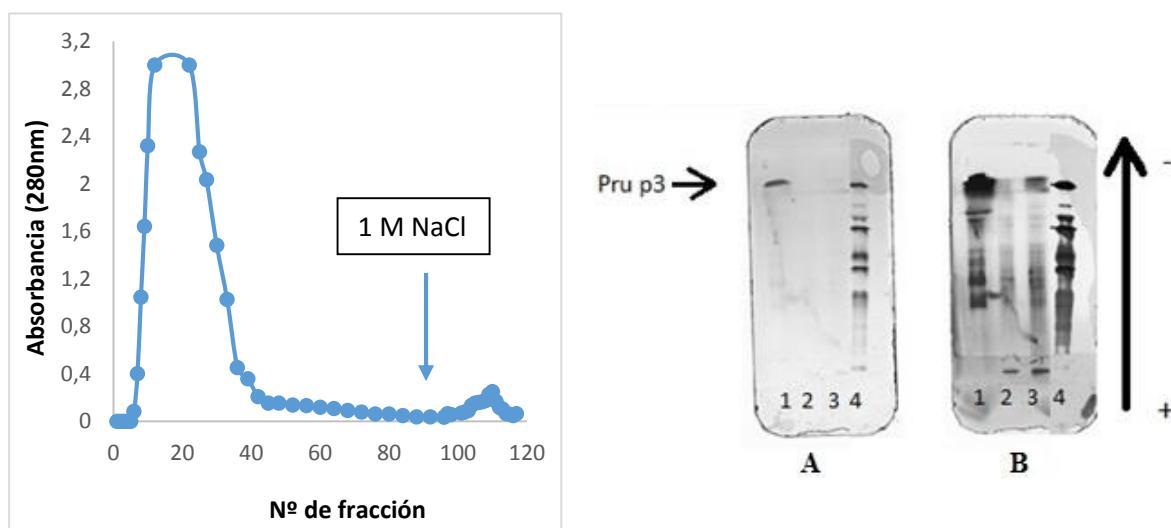


Figura 5. (a) Perfil de la cromatografía en SP-Sepharose del extracto de melocotón. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. (b) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% de la cromatografía en SP-Sepharose del extracto de melocotón. (1) Fracciones correspondientes al pico 2, (2) fracciones correspondientes al pico 1, (3) Extracto de melocotón. (4) Patrón de pesos moleculares. A) Tinción con Azul de Comassie, B) tinción con plata.

El patrón de pesos moleculares está constituido por las siguientes proteínas: fosforilasa B (97.0 kDa), albúmina sérica bovina (67.0 kDa), anhidrasa carbónica (30.0 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactalbúmina bovina (14.4 kDa)

Las fracciones del pico 2 se dializaron frente al tampón fosfato sódico 10 mmol pH 7,0 para eliminar el NaCl, se liofilizaron y se solubilizaron en un pequeño volumen (1ml), que se aplicó en una columna de exclusión molecular de Sephadex G-50.

El cromatograma obtenido muestra la presencia de tres picos cuyas fracciones se analizaron por SDS-PAGE (Figura 6). En el primer pico (fracciones 7 a 10) eluyen los componentes de alto peso molecular, en el segundo pico (fracciones 15 a 23) eluye la proteína Pru p3 y en el tercer pico (fracciones 24 a 28) eluyen probablemente péptidos de bajo peso molecular y/o pigmentos, que absorben a 280 nm pero no se tiñen con el colorante. Las fracciones correspondientes al segundo pico muestran que la proteína Pru p3 obtenida presenta un alto grado de pureza, ya que no se visualiza la presencia de otras bandas de proteína. Las fracciones que contenían la proteína Pru p3 purificada se recogieron conjuntamente y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

En este trabajo, la proteína Pru p3 ha sido purificada siguiendo un protocolo similar al utilizado por Pastorello et al (1999) realizando una cromatografía de intercambio catiónico seguida de una filtración en gel. Otros autores han utilizado otros tipos de cromatografía como filtración en gel seguida de cromatografía hidrofóbica (Carnés et al., 2002), o cromatografía en fase reversa (Duffort et al., 2002; Larocca et al., 2013). En todos los trabajos, se indica que el procedimiento seguido permite obtener Pru p3 con un alto grado de pureza, al igual que se ha obtenido en nuestro trabajo. La ventaja de utilizar en la primera etapa del aislamiento una columna de intercambio iónico es que se puede aplicar un volumen de extracto grande y que la fracción enriquecida en Pru p3 se obtiene concentrada. Por el contrario, en la filtración en gel el volumen a aplicar debe de ser muy pequeño, menor del 5% del volumen del lecho, y la muestra se diluye considerablemente a lo largo del proceso cromatográfico.

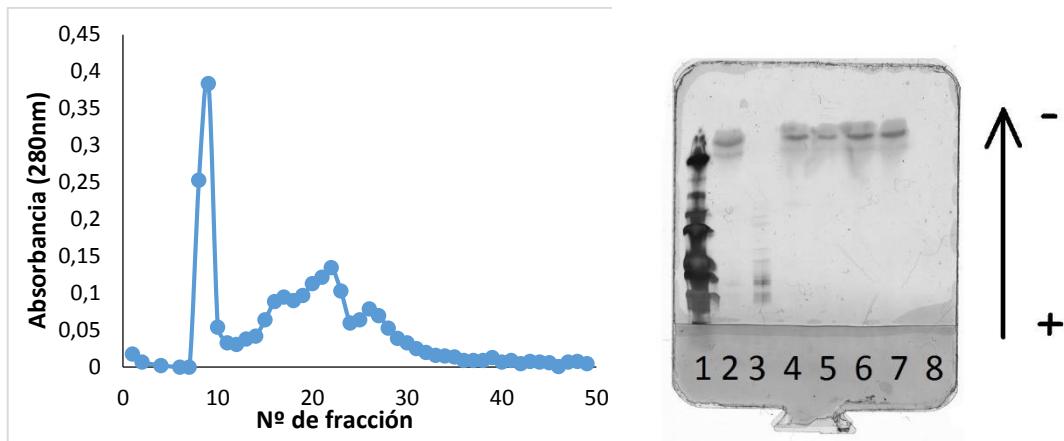


Figura 6. (a) Perfil de la cromatografía en Sephadex G-50 de la muestra liofilizada. Las fracciones recogidas fueron de 2 mL. (b) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida 8-25% de las fracciones de la cromatografía en Sephadex G-50 del pico 2. (1) Patrón de pesos moleculares, (2) Pico 2, (3) Fracción nº 9, (4) Fracción nº 16, (5) Fracción nº 18, (6) Fracción nº 20, (7) Fracción 22, (8) Fracción nº 26.

5.2. Caracterización de la proteína Pru p3 por espectrometría de masas.

Con la banda correspondiente a la proteína purificada recortada del gel de electroforesis se realizó un análisis de identificación de proteínas por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF, comparando los péptidos obtenidos con los péptidos teóricos indicados en la base de datos NCBInr para la proteína Pru p3. En todos los casos la proteína identificada tiene una cobertura de secuencia suficiente para asegurar ($p < 0,05\%$) que las coincidencias no se deben al azar (Tabla 4).

Tabla 4. Datos obtenidos en el análisis de identificación de péptidos por huella peptídica por la técnica de MALDI-TOFF de la banda de la electroforesis para la identificación de la proteína Pru p3 obtenida del melocotón.

Muestra	Proteína Identificada	MW (Da)	Nº de péptidos coincidentes	Cobertura secuencia (%)	Péptidos fragmentados (MH^+ , secuencia)
Proteína piel de Melocón	gi 17974195 Pru 1	9594	8	92	1534.72, TTPDRQAACNCLK 1905.00, QLSASVPGVNPNNAAALPGK 2008.00, ITCGQVSSLAPCIPYV
	gi 83754020 Pru p3	9725	8	91	1534.72, TTPDRQAACNCLK 1905.00, QLSASVPGVNPNNAAALPGK 2008.00, ITCGQVSSLAPCIPYV

5.3. Obtención y caracterización de los antisueros anti-Pru p3.

Los antisueros frente a la proteína Pru p3 se obtuvieron mediante inoculación en dos conejos de la proteína purificada. La inmunorreactividad y la especificidad de los antisueros se comprobaron mediante las técnicas de inmunodifusión doble, inmunodotting (Figura 7), y ELISA de tipo no competitivo indirecto (Figura 8). Mediante la técnica de inmunodifusión doble, no se observó la presencia de arcos de precipitación lo que indica que los anticuerpos no son precipitantes. Este hecho podría deberse al bajo peso molecular de la proteína Pru p3. En las figuras 5 a-d se muestran los resultados del inmunodotting realizados con los sueros de conejo pre-inmunes (obtenidos antes de la inoculación) y los post-inmunes (obtenidos tras la inoculación). Como puede observarse en los inmunodotting de los sueros post-inmunes, se visualiza la presencia de manchas de color grisáceo en el punto de aplicación del extracto de melocotón y de la proteína Pru p3 purificada, pero no en el punto de aplicación de la BSA. En el caso de los sueros pre-inmunes, sólo se visualiza una mancha en el extracto, pero es de color anaranjado no grisáceo, y se visualizaba ya antes de la adición de los antisueros, debido al color que presenta el melocotón. Estos resultados indican que los antisueros obtenidos contienen anticuerpos que son específicos frente a la proteína Pru p3.

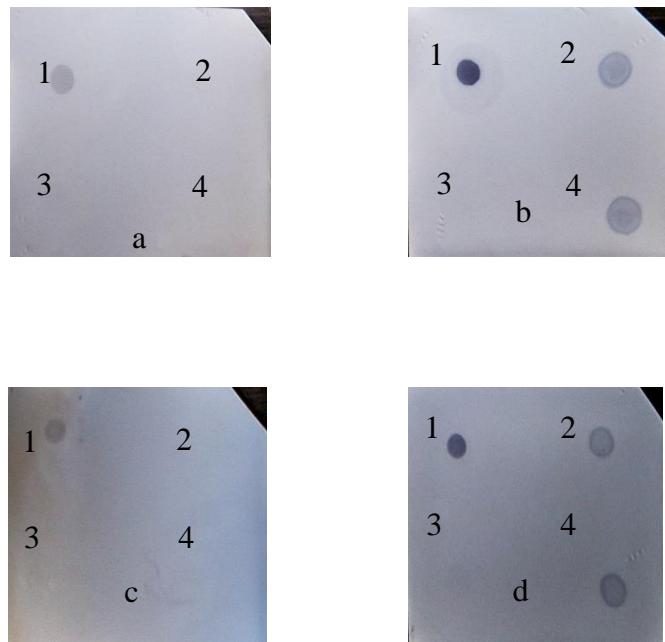


Figura 7. Inmunodottings incubados con los sueros preinmunes (a, c) y los antisueros post-inmunes (b, d) del conejo 1 (a,b) y del conejo 2 (c,d).

1: Extracto de melocotón; **2, 4:** Proteína Pru p3 purificada; **3:** BSA (1mg/ml)

El análisis de los sueros de conejo pre y post-inmunes mediante la técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto se muestra en la Figura 8. Como puede observarse, los sueros preinmunes dan una absorbancia muy baja a todas las diluciones ensayadas, mientras que los sueros post-inmunes dan una señal que se incrementa notablemente al disminuir la dilución. Además, se observa que la segunda extracción post-inmune de ambos conejos tiene un nivel de anticuerpos mucho mayor que la primera. Cabe destacar también que mientras que el nivel de anticuerpos de la extracción 1 es mayor en el conejo 1, el de la segunda extracción es mayor para el conejo 2, hecho que refleja la variabilidad en la respuesta entre los distintos animales.

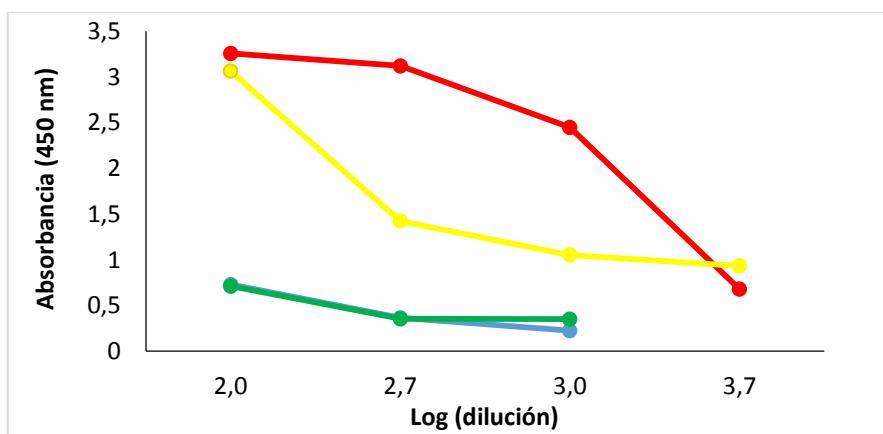


Figura 8. ELISA no competitivo indirecto de los antisueros de conejo pre-inmunes (RA Pre) y post-inmunes (RA Post) de la primera extracción de los conejos 1 y 2. (•) RA Pre 1; (•) RA Pre 2; (•) RA Post 1; (•) RA Post 2.

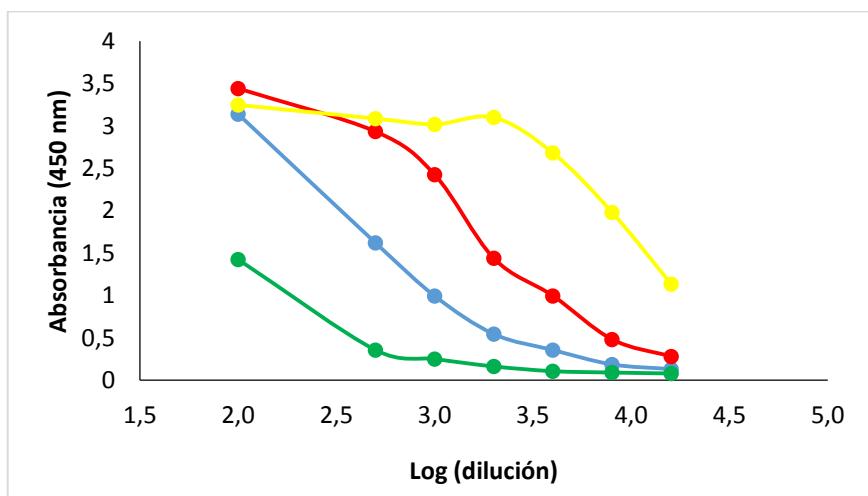


Figura 9. ELISA no competitivo indirecto de los antisueros post-inmunes de la primera y segunda extracción de los conejos 1 y 2. El primer número corresponde al conejo y el segundo a la extracción. (•) RA 11; (•) RA 12; (•) RA 21; (•) RA 22.

Utilizando la técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto, se determinó el título de los antisueros que 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 10, cuyo título fue de 1/1.500 aproximadamente. En la Tabla 5 se muestran los títulos correspondientes a las dos extracciones de los conejos inmunizados.

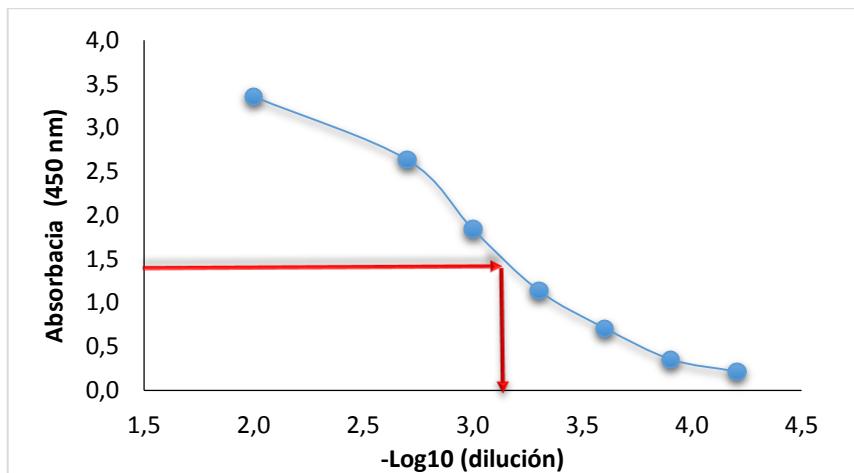


Figura 10. Curva de titulación del antisuero anti-proteína Pru p3 obtenida en la primera extracción de sangre del conejo 1.

Tabla 5. Título de los antisueros anti-proteína Pru p3 obtenidos en las dos primeras extracciones de los conejos 1 y 2.

	Conejo 1	Conejo 2
1 ^a Extracción	1/1500	1/500
2 ^a Extracción	1/2000	1/8000

El título del antisuero es necesario calcularlo cuando se va a usar un ensayo de ELISA de tipo competitivo, en el que la cantidad de antisuero usada debe ser aproximadamente la correspondiente al 50% de la absorbancia máxima, siendo deseable que esta absorbancia se encuentre entre 1,2 y 1,8.

La especificidad de los antisueros se determinó mediante una técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto. Las frutas ensayadas (Figura 11) se han seleccionado teniendo en cuenta la existencia de reacciones cruzadas en los individuos alérgicos al

melocotón debido a la presencia en las mismas de proteínas de transferencia de lípidos de estructura similar a la Pru p3.



Figura 11. Extractos obtenidos de las frutas ensayadas

Previamente, se realizó una cuantificación de las proteínas contenidas en los extractos por la técnica del BCA. Como puede observarse en la Figura 12, el extracto de ciruela es el que contiene un mayor contenido proteico y el de uva el menor. El extracto de melocotón contiene aproximadamente 5,3 mg de proteína/ml.

En este ensayo de ELISA competitivo indirecto, los pocillos tapizados con la proteína Pru p3 se incubaron con extractos de diferentes frutas y con el antisuero obtenido frente a dicha proteína. Así, cuanto menor es la unión de los anticuerpos a los pocillos, es decir cuanto menor es la absorbancia, significa una mayor competición entre las proteínas del extracto ensayado y la proteína Pru p3 fijada al pocillo, lo que es indicativo de una mayor reacción cruzada. Como puede observarse en la Figura 12, existe reacción cruzada con todas las frutas ensayadas de la familia de las rosáceas y no se observa a penas reacción con la uva y la zanahoria que pertenecen a otras familias. La existencia de reacción cruzada entre las rosáceas es esperable dada la alta similitud en la secuencia que muestra la Pru p3 con otras proteínas del grupo LTP de dicha familia (Borges et al,2006, García y Lizaso, 2011).

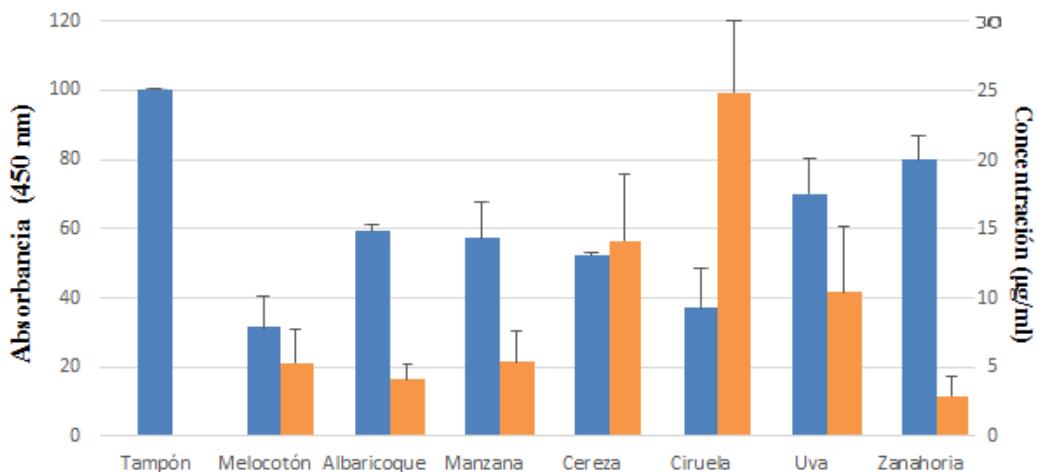


Figura 12. ELISA en el que se muestra la reacción cruzada del antisuero-anti proteína Pru p3 frente a extractos de diferentes frutas () y concentración de los extractos de frutas determinado por la técnica del BCA ().

5.4. Optimización del ensayo de ELISA.

Para optimizar el ensayo de ELISA de tipo competitivo indirecto para la determinación de la proteína Pru p3 se probaron diferentes condiciones de tapizado de los pocillos. En la Figura 13 se muestran los resultados al utilizar diferentes concentraciones de proteína para tapizar los pocillos. El tapizado con 20 y 40 μ g/ml da una diferencia ligeramente mayor entre los valores de absorbancia del blanco (PBS) y de las muestras (Pru p3 o extracto) que el tapizado con 10 mg/ml, por lo que se seleccionó la concentración de 20 mg/ml para minimizar el gasto de proteína.

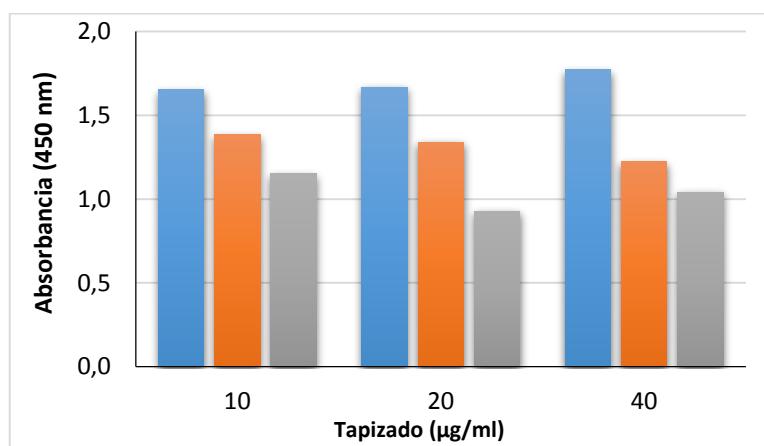


Figura 13. ELISA competitivo indirecto realizado con diferentes concentraciones de proteína Pru p3 para el tapizado de los pocillos () PBS; () Pru p3; () Extracto.

Respecto al pH del tampón de tapizado de los pocillos, aunque los valores de la absorbancia a todas las concentraciones ensayadas fueron un poco menores a pH 9,6 que a pH 7,4, las curvas fueron prácticamente paralelas por lo que se podrían usar ambos pHs sin afectar a la sensibilidad del ensayo. En este trabajo, hemos seleccionado el tampón de mayor pH por ser el más comúnmente utilizado en los ensayos de ELISA.

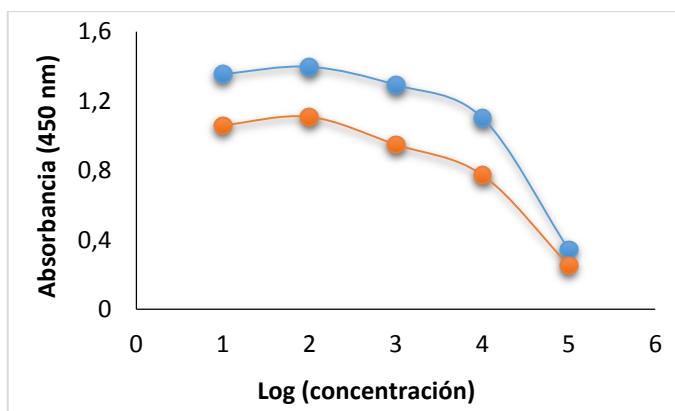


Figura 14. ELISA de tipo competitivo indirecto realizado con pocillos tapizados con proteína Pru p3 a diferentes pHs. (•) pH 7,4; (●) pH 9,6

Por otra parte, se determinó si sería posible sustituir el tapizado de los pocillos con proteína pura por el tapizado con un extracto de melocotón. Para ello, se realizó una curva de titulación y un ensayo competitivo en las mismas condiciones con los pocillos tapizados con proteína y con extracto diluidos en tampón de pH 9,6. Como se observa en las Figuras 15, los resultados fueron similares en ambos ensayos, tanto si la competición se realiza con los estándares de la proteína pura como con los del extracto. Por lo tanto, la sensibilidad de la técnica de ELISA desarrollada no varía si se utiliza para el tapizado de los pocillos un extracto de melocotón, lo que supondría un considerable ahorro de tiempo al no tener que usar proteína pura, pues el rendimiento de su purificación es muy bajo.

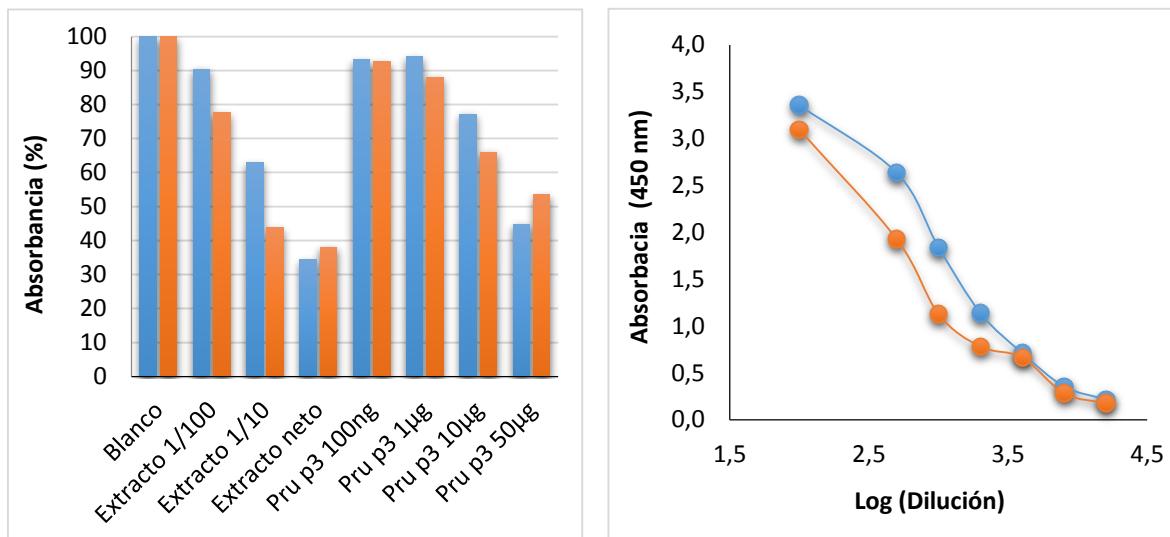


Figura 15. (a) Curva de titulación con pocillos tapizados con (■) Pru p 3 o (■) extracto de melocotón (a). (b) ELISA competitivo indirecto realizado con los pocillos tapizados con proteína Pru p3 (●) o extracto de melocotón (●)

Se determinó también si existen diferencias en la sensibilidad de la técnica de ELISA cuando la fase de incubación correspondiente a la competición entre la proteína fijada y la presente en los estándares (proteína pura o extracto) por su unión con los anticuerpos se realiza o bien en el propio pocillo o en un tubo de forma separada. Los resultados obtenidos indican que la sensibilidad es similar en ambos casos (Figura 16) por lo que se optó por realizar esta etapa en el pocillo, dada su mayor sencillez operativa.

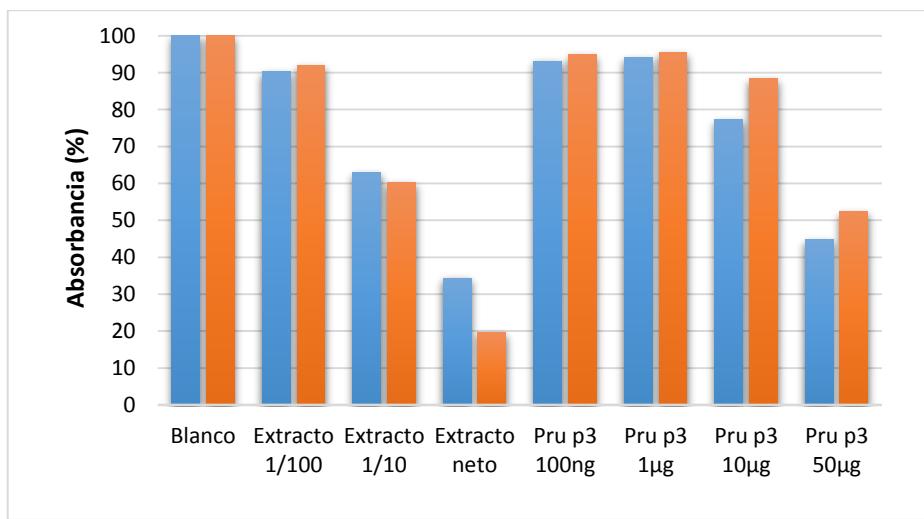


Figura 16. Incubación de proteína junto a anticuerpos en (■) pocillo o (■) tubo.

Utilizando los pocillos tapizados con la proteína Pru p3 y el antisuero obtenido en la primera extracción del conejo 1 se realizó un ensayo competitivo con un amplio rango de concentraciones de Pru p3 como estándares. La curva estándar obtenida con todas las concentraciones ensayadas se muestra en la Figura 17 (a) y la zona lineal de dicha curva en la Figura 17 (b), que se encuentra entre valores de 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

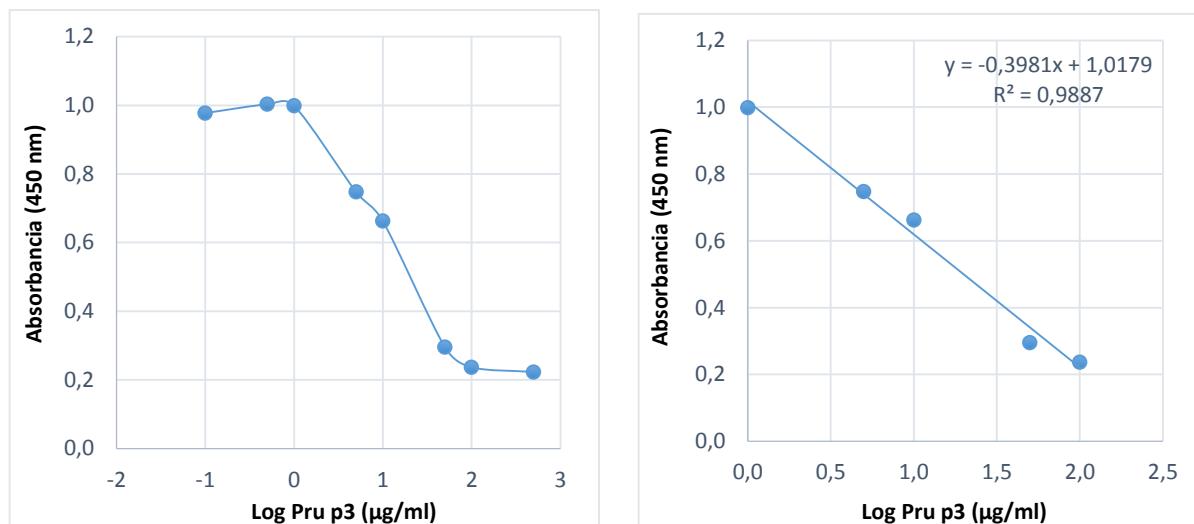


Figura 17. Curva de calibración obtenida para la proteína Pru p3 a todas las concentraciones ensayadas (a) y de la zona lineal de dicha curva (b).

En estas condiciones, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación de la técnica desarrollada, que corresponden a la absorbancia de 10 determinaciones del blanco (tampón) en dos ensayos más 3 y 10 veces su desviación estándar, respectivamente. Los valores obtenidos fueron de 1,6 y 3,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

El ensayo realizado con todos los antisueros (las dos extracciones de los dos conejos) mostró que la sensibilidad de la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto es similar con todos ellos a la dilución óptima de antisuero seleccionada en cada caso.

En ensayos de ELISA de tipo competitivo indirecto (Carnés et al., 2012) o de sándwich (Duffort et al., 2002) previamente desarrollados para la determinación de la proteína Pru p3 la sensibilidad de las técnicas ha sido mayor que la obtenida en nuestro trabajo, del orden de un orden de magnitud mayor. Este hecho se debe probablemente a que la afinidad de los anticuerpos era mayor que la de los obtenidos en nuestro trabajo en las dos sangrías realizadas en los dos animales inoculados. Se conoce que la afinidad de los anticuerpos suele aumentar en las sucesivas inoculaciones de los animales (Forde, y Coley, 2000), por lo que se tiene previsto repetir las inoculaciones y extracciones con el fin de obtener anticuerpos de mayor afinidad. Además, se podría aumentar la

sensibilidad del ensayo utilizando un sistema de amplificación basado en la utilización de un anticuerpo primario o secundario biotinilado y el complejo avidina-peroxidasa como sustrato (Abdul-Ahad, y Brett, 2000).

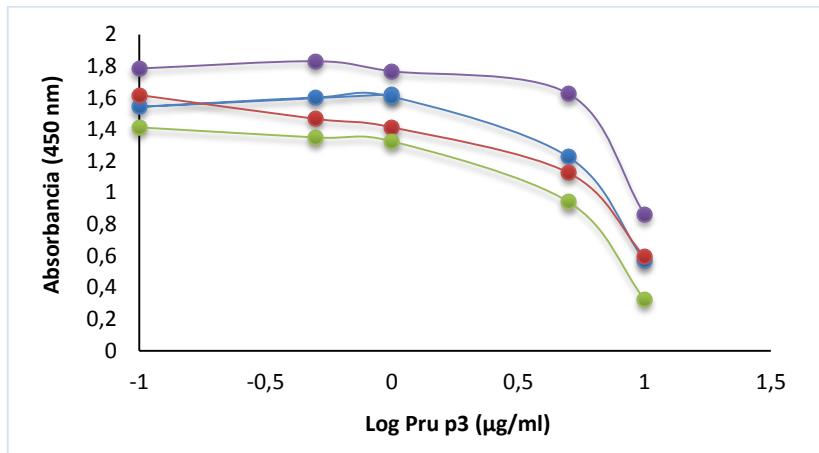


Figura 18. ELISA de tipo competitivo indirecto utilizando los antisueros post-inmunes de la primera y segunda extracción de los conejos 1 y 2. El primer número corresponde al conejo y el segundo a la extracción. (●) RA 1 1; (●) RA 1 2; (●) RA 2 1; (●) RA 2 2.

5.5. Efecto de los tratamiento tecnológicos en la desnaturalización de la proteína Pru p3.

En este trabajo, se ha estudiado el efecto que tienen los tratamientos tecnológicos (térmicos y de altas presiones) de un extracto de melocotón en la desnaturalización de la proteína Pru p3. La desnaturalización se ha determinado midiendo la pérdida de inmunorreactividad de la proteína con sus anticuerpos específicos mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo desarrollada.

Las técnicas inmunoquímicas son particularmente útiles para detectar cambios en la estructura de las proteínas por efecto de los tratamientos tecnológicos ya que si inducen su desnaturalización, disminuye el reconocimiento de los epítopos conformacionales por los anticuerpos dirigidos contra ellos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para estudiar la desnaturalización de las proteínas sometidas a tratamientos tecnológicos (Wehbi *et al.*, 2005).

En la Figura 18 se muestra la concentración de proteína inmunorreactiva determinada tras los tratamientos aplicados al extracto de melocotón. Como puede observarse, el calentamiento de la proteína a 100°C durante 10 minutos en un baño termostático o en autoclave a 121 °C durante 2,5 min desnaturaliza más del 80% de la proteína presente en el extracto, obteniéndose un resultado similar a los tiempos mayores aplicados. Esta inmunorreactividad remanente se debe probablemente a que algunos de los anticuerpos

presentes en el antisuero reaccionan con epítopenos lineales de la proteína, que como es de esperar no se destruyen durante el tratamiento térmico, ya que sería necesario su hidrólisis para perder la reactividad con los anticuerpos. Sería necesario probar otras temperaturas más bajas a diferentes tiempos para calcular la cinética de la desnaturalización de esta proteína. Se determinó también la inmunorreactividad de un zumo de melocotón comercial pasterizado (90 °C, 3-5 min), en el que sólo se obtuvo una pérdida de proteína inmunorreactiva de aproximadamente el 20%.

Cuando se aplicaron los tratamientos de altas presiones, entre 400 y 600 MPa, durante 15 minutos al extracto de melocotón, no se observaron cambios en la inmunorreactividad de la Pru p3, lo que indica que no se producen cambios sustanciales en su estructura.

Estudios previos han mostrado que mediante técnicas de ELISA utilizando IgG de conejo anti-Pru p3 se puede cuantificar la cantidad de proteína presente en diversos alimentos comerciales que contienen melocotón, como mermeladas, yogures y zumos. Sin embargo, la Prup 3 no se pudo detectar en otros productos como bebidas alcohólicas o té, lo que podría deberse a que esas muestras contienen una baja proporción de melocotón o han sufrido un tratamiento térmico intenso que la ha desnaturalizado (Duffort et al., 2002).

Cuando las muestras tratadas térmicamente y con altas presiones se analizaron en un ELISA de tipo competitivo indirecto utilizando sueros de dos individuos alérgicos al melocotón, no se observaron diferencias en la absorbancia de las muestras con respecto a la muestra de extracto de melocotón sin tratar utilizada como control. Estos resultados indican que la alergenicidad de la proteína Pru p3, determinada como la capacidad de interaccionar con las IgE no se ve modificada por dichos tratamientos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Brenna et al (2000) quienes observaron, mediante la técnica de western-blotting utilizando sueros de alérgicos al melocotón, que los extractos de la fruta tratada a 121 °C durante 10 y 30 minutos reaccionaban con las IgE.

Los resultados obtenidos en este y otros trabajos sugieren que la mayoría de los epítopenos reconocidos por las IgG son conformacionales y dependen de la estructura terciaria de la proteína. Por ello, la técnica desarrollada en este trabajo permitiría estudiar la cinética de la desnaturalización de la Pru p3 por efecto de los tratamientos tecnológicos. Por el contrario, los epítopenos reconocidos por las IgE no se ven afectados por los tratamientos térmicos severos lo que sugiere que son epítopenos lineales. Sería necesario diseñar tratamientos industriales que indujeran la reducción de la

alergenicidad de la Pru p3 para que los alimentos que la contienen sean seguros para los consumidores alérgicos.

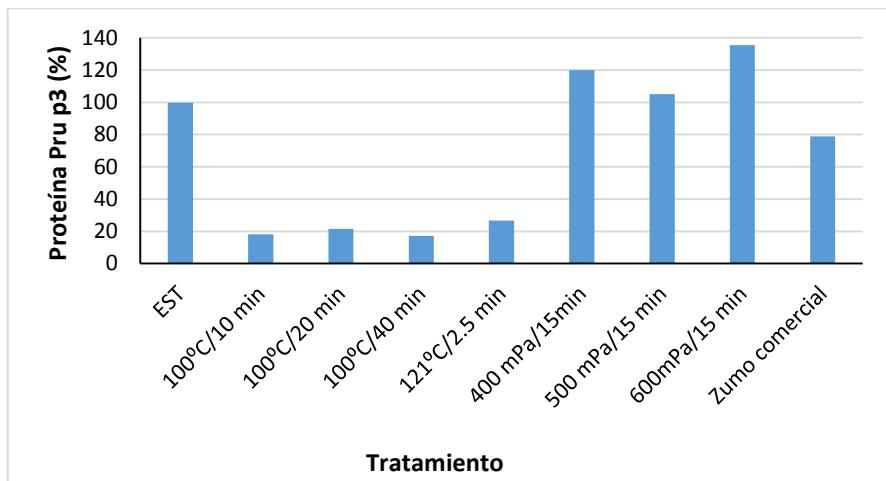


Figura 18. Efecto de los tratamientos térmicos y de altas presiones en la inmunorreactividad de la proteína Pru p3 determinada mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto usando un antisuero de conejo. La concentración de Pru p3 inmunorreactiva está expresada como porcentaje de la concentración de proteína del extracto sin tratar (EST).

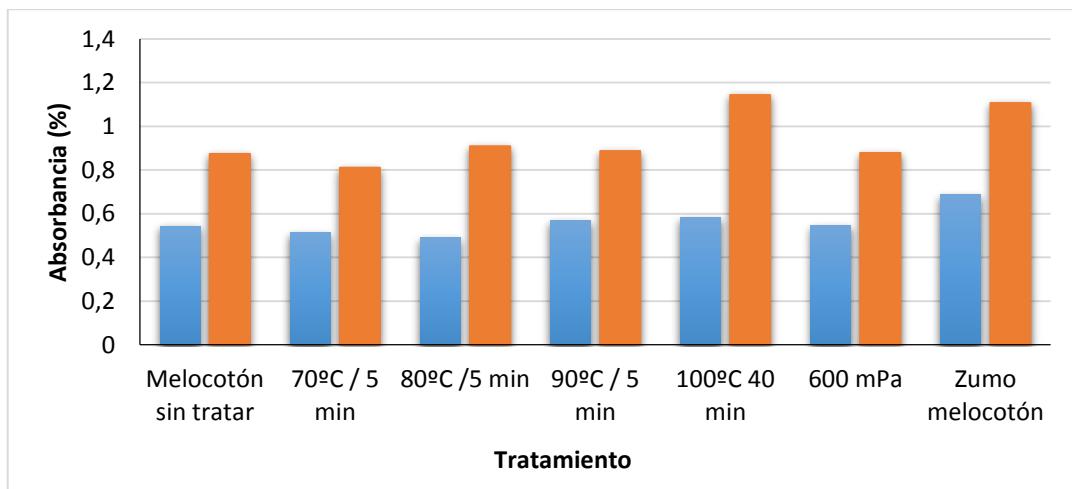


Figura 19. Efecto de los tratamientos térmicos y de altas presiones en la alergenicidad de la proteína Pru p3 determinada mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto usando el suero de dos individuos alérgicos al melocotón

6. Conclusiones

1. La aplicación de técnicas de cromatografía de intercambio catiónico y filtración en gel permite obtener la proteína alergénica Pru p3 del melocotón con un alto grado de pureza.
2. La inoculación de la proteína Pru p3 purificada en conejos da lugar a la obtención de antisueros con un alto título de anticuerpos. Los anticuerpos presentan reacción cruzada con proteínas de otras frutas de la familia de las rosáceas.
3. La técnica de ELISA en placa de tipo competitivo indirecto desarrollada tiene un límite de detección y de cuantificación de 1,6 y 3,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.
4. Los tratamientos térmicos disminuyen la antigenicidad de la Pru p3, entendida como la capacidad de reaccionar con las IgG de conejo obtenidas frente a ella, pero no afectan su alergenicidad, entendida como la capacidad para reaccionar con las IgE del suero de pacientes alérgicos a melocotón.
5. Los tratamientos con altas presiones del extracto de melocotón no afectan ni la antigenicidad ni la alergenicidad de la proteína Pru p3.

Conclusions

1. The application of chromatographic techniques, cation exchange chromatography and gel filtration, allows to isolate the allergenic protein Pru p3 from peach with a high level of purity.
2. The inoculation of purified Pru p3 in rabbits leads to the obtention of antisera with a high antibody title. Antibodies obtained present cross-react with other fruits of the Rosaceae family.
3. The indirect competitive format of the ELISA technique developed has a limit of detection and quantification of 1.6 and 3.9 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively.
4. Heat treatments of peach extracts decrease the antigenicity of Pru p3, which is the ability to react with IgG form rabbit antisera. However, heat treatments do not affect allergenicity of Pru p3, which is its ability to react with IgE form sera of peach allergic individuals.
5. High pressure treatments of peach extracts do not affect neither the antigenicity nor the allergenicity of Pru p3.

7. Aportaciones en materia de aprendizaje

Atendiendo a los objetivos planteados en la guía docente respectiva al Trabajo de Fin de Grado, puede decirse que éstos se han podido cumplir a lo largo de todo el desarrollo del trabajo.

En primer lugar, la búsqueda de información para poder trabajar siguiendo referencias pasadas de trabajos similares al realizado, la autonomía desarrollada en el laboratorio, organización y capacidad para solucionar problemas, son aspectos que han estado muy presentes, lo que ayuda de un modo incalculable en vistas al futuro y a la entrada en el mercado laboral, por adoptar una madurez ante el laboratorio que si no fuera por este trabajo individual nunca se hubiera alcanzado.

La elaboración de un informe como esta memoria, ha supuesto un trabajo dificultoso puesto que, aunque anteriormente se habían redactado otro tipo de informes, ninguno había sido de tanta extensión y rigurosidad. Además, gran parte de la búsqueda de información se realizó en inglés, lo que aportó una mejora del nivel.

Se ha trabajado en equipo junto a los compañeros de laboratorio, y se ha desarrollado una amistad que bajo mi punto de vista es muy importante para crear un entorno agradable y productivo en un laboratorio.

Por último, cabe destacar la iniciativa y creatividad de este trabajo, puesto que fue una propuesta personal hacia los tutores del Trabajo de Fin de Grado, lo que incrementó la motivación hacia todos los aspectos del proyecto al tratarse de un tema de gran interés para mí por ser alérgica al melocotón, adquiriéndose por consiguiente nuevos conocimientos sobre técnicas de análisis que se habían estudiado previamente pero no se habían llevado nunca a la práctica, lo que permite entender mucho mejor todas las técnicas inmunoquímicas y cromatográficas.

8. Bibliografía

- Aalberse, R. C. 2000. Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106, 229-238.
- Abdul-Ahad, W. y Brett, M. (2000) Labels and endpoints. En: *Immunoassays practical approach*. (Gosling, J.P., Ed.), Oxford University Press, Oxford. Pag.89-128.
- 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*. Accesible en: <http://aesan.msssi.gob.es/> [Acceso el: 05/08/2015]
- Blanco, C. 2003. Latex-fruit syndrome. *Current Allergy and Asthma Reports*, 3, 47-53.
- Borges, J. P., Jauneau, A., Brulé, C., Culquerier, R., Barre, A. et al. 2006. The lipid transfer proteins (LTP) essentially concentrate in the skin of Rosaceae fruits as cell surface exposed allergens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 535–542.
- Bousoño García, C. 1999. Mesa Redonda: Alergia e intolerancia alimentaria. Principales formas clínicas de presentación. *Boletín de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*. 39, 148-151
- Boye, J. I., Danquah, A. O., Thang, C. L. y Zhao, X. 2012. Food Allergens. En *Food Biochemistry and Food Processing* (Simpson, B. K., Ed), WILEY-BLACKWELL, Oxford, Pag 798-819.
- Breiteneder, H. 2006. Classifying food allergens. En: *Detecting allergens in food*. (Koppelman, S. J. Y Hefle, S. L., Eds), CRC Press, Cambridge. Pag. 21-61
- Brenna, O., Pompei, C., Ortolani, C., Pravettoni, V., Farioli, L., y Pastorello, E. A. 2000. Technological processes to decrease the allergenicity of peach juice and nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 493-497.
- Carnés, J., Fernández-Caldas, E., Gallego, M. T., Ferrer, A. y Cuesta-Herranz. 2002. Prup 3 (LTP) content in peach extracts. *Allergy*, 57, 1071-1075.
- De Oliveira, A. y Moreira, V. 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology – A concise review. *Peptides*, 28, 1144-1153.
- Duffort, O. A., Polo, F., Lombardero, M., Díaz-Perales, A., Sánchez-Monge, R., García-Casado, G. et al. 2002. Immunoassay to quantify the major peach allergen Prup 3 in foodstuffs. Differential allergen release and stability under physiological conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7738-7741.

- EFSA. 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. EFSA Journal 2014 Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/> [Acceso el: 06/08/2015]
- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO Technical Committee on Food Allergies. Rome, Italy, November, 13-14.
- Fernández-Rivas, M., González-Mancebo, E., Rodríguez-Pérez, R., Benito, C., Sánchez-Monge, R. et al. 2003. Clinically relevant peach allergy is related to peach lipid transfer protein, Pru p 3, in the Spanish population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 789-795.
- Forde, A. y Coley, J. (2000) Choosing and characterizing antibodies. En: Immunoassays practical approach. (Gosling, J.P., Ed.), Oxford University Press, Oxford. Pag.59-88.
- García, BE. y Lizaso MT. 2011. Cross-reactivity Syndrome in Food Allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21, 162-170.
- González-Mancebo, E., González-de-Olano, D., Trujillo, M. J., Santos, S., Gandolfo-Cano, M., et al. 2011. Prevalence of Sensitization to Lipid Transfer Proteins and Profilins in a Population of 430 Patients in the South of Madrid. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21, 278-282.
- Larocca, M., Martelli, G., Grossi, G., Padula, M. C., Riccio, P. et al. 2013. Peel LTP (Pru p 3) – The major allergen of peach – is methylated. A proteomic study. *Food Chemistry*, 141, 2765-2771.
- López-Expósito, I., López-Fandiño, R. y Molina Hernández, E. 2013. Alergia a alimentos. *Alimentación Nutrición y Salud*, 20, 1-8.
- Martorell, A., Martín, F., Porcel, S., Dalmau, J., y Martin, M. 2007. Prevención y tratamiento de la alergia a los alimentos En Tratado de Alergia. (Dávila, I., Peláez, A., Eds) Ergon, Madrid. Pag 105-160.
- Meglio, P., Bartone, E., Plantamura, M., Arabito, E. y Giampietro, P.G. 2004. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*, 59, 980-987.
- Molinas, J., Arduoso, L. y Crisci, C. 2004. Alergia Alimentaria. INVENIO, 7, 133-141.
- Ouchterlony, O. 1948. In vitro method for testing toxin producing capacity of diphtheria bacteria. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 25, 186-191.
- Pasini, G., Curioni, A., Vegro, M., Pagani, M., Masi, A. et al. 2010. Extraction and mass spectrometry identification of a major peach allergen Pru p 1. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 570-576

- Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Folloni, S., Cianci, M. et al. 2005. Crystal Structure of Peach Pru p 3, the Prototypic Member of the Family of Plant Non-specific Lipid Transfer Protein Pan-allergens. *Journal of Molecular Biology*, 356, 684-694.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M. et al. 1999. The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 521-526
- Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Incorvaia, C. y Bellanti, J. A. 1999. Food allergy: an update. *Allergy*, 54, 43-45.
- Reglamento (UE) Nº 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.
- Saito, M., Onda, T., Kojima, M., Naganuma, K., Tsuji M. et al. 2010. Extraction of Peach Allergen Pru p 3 from Peach Skin. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 57, 150-156.
- Salcedo, G., Sánchez-Monge, A., Díaz-Perales y Pacios, L. F. 2008. Review. Plant food allergens: peach non-specific lipid transfer protein Pru p 3 as a model. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6, 30-37.
- Salcedo, G., Sánchez-Monge, R., Barber, D. y Díaz-Perales, A. 2007. Plant non-specific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 781-791.
- Sampson, H.A. 2004. Food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113, 805-819.
- Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., y Salcedo, G. 1999. Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103, 515-519.
- Sechi, S., y Chait, B.T. 1998. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical Chemistry*, 70, 5150-5158.
- Taylor, S. L. 2000. Emerging problems with food allergens. *Food, Nutrition and Agriculture*, 26, 14-29.
- Taylor, S. L. y Hefle, S. L. 2001. Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology*, 55, 68-83.
- Taylor, S.L., y Lehrer, S.B. 1996. Principles and characteristics of food allergens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(S), S91-S118.

- Tuppo, L., Spadaccini, R., Alessandri, C., Wienk, H., Boelens, R. et al 2014. Structure, Stability, and IgE Binding of Peach Allergen Peamaclein (Pru p 7). *Peptide Science*, 102, 416-425.
- Van Ree, R., Poulsen, L. K., Wong, G. W. K., Ballmer-Weber, B. K., Zhongshan, G. et al. 2015. Food allergy: definitions, prevalence, diagnosis and therapy. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 49, 87-92.
- Vieths, S., Scheurer, S., y Ballmer-Weber, B. 2002. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 964, 47-68.
- Wehbi, Z., Pérez, M.D., Sánchez, L., Pocoví, C., Barbana et al (2005) Effect of heat treatment on denaturation of bovine alpha-lactalbumin: determination of kinetic and thermodynamic parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9370-9376.
- Yeats, T. H. y Rose, J. K. C. 2007. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*, 17, 191-198.
- Zugasti, A. 2009. Intolerancia alimentaria. *Endocrinología y Nutrición*, 56, 241-250.

Páginas web:

- Internet Symposium on Food Allergens 2(4): 185-201 (2000) <http://www.food-allergens.de/symposium-2-4/peach/peach-allergens.htm> [Acceso el 27/03/2015].
- Expasy Bioinformatics Resource Portal. <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam1?Q9LED1@noft@> [Acceso el 27/03/2015].
- IUIS. International Union of Immunological Societies. Allergen Nomenclature Subcommittee. Accesible en: <http://www.allergen.org/>. [Acceso el 20/08/2015].

ANEXO I:

El Anexo II del Reglamento (UE) nº 1169/2011 incluye la siguiente lista de ingredientes o adyuvantes tecnológicos y sus derivados de mención obligatoria:

1. Cereales que contengan gluten (trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y sus derivados, excepto:
 - Jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;
 - Maltodextrinas a base de trigo;
 - Jarabes de glucosa a base de cebada;
 - 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:
 - Gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados carotenoides;
 - Gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuetes y productos a base de cacahuetes.
6. Soja y productos a base de soja, excepto:
 - Aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;
 - Tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa-tocoferol natural, acetato de d-alfa-tocoferol natural y succionato de d-alfa-tocoferol natural derivados de la soja;
 - Fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
 - Ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), excepto:
 - Lactosuero utilizado para hacer destilados alcohólicos, incluido el alcohol etílico de origen agrícola;
 - Lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir: almendras (*Amygdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium accidentale*), pacanas

[*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), alfónigos (*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.

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.