



**Trabajo fin de Máster en  
Calidad, Seguridad y Tecnología  
de los Alimentos**

**Obtención de antígenos y anticuerpos para el desarrollo de un test para la detección de crustáceos en alimentos**

**Obtaining of antigen and antibody for the development of a test to detect crustacean in food**

**Autor**

**Nehemías David Sebastián Sánchez**

**Directoras:**

**Dra Patricia Galán Malo (ZEULAB S.L.)**

**Dra M<sup>a</sup> Dolores Pérez Cabrejas (UNIZAR)**

**Facultad de Veterinaria**

**Curso 2017 – 2018**

Resumen.....	4
Summary.....	5
1. Introducción.....	6
1.1. Alergia alimentaria.....	6
1.2. Mecanismo de la alergia alimentaria mediada por IgE.....	6
1.3. Manifestaciones clínicas y tratamiento de la alergia alimentaria.....	8
1.4. Normativa y etiquetado de alimentos alergénicos.....	9
1.5. Alergia al marisco.....	10
1.6. Alérgenos de los crustáceos.....	10
1.7. Tropomiosina.....	12
1.8. Reactividad cruzada entre la tropomiosina de crustáceos y otras especies.....	13
1.9. Técnicas de detección de alérgenos en alimentos.....	13
1.9.1. Técnicas inmunoquímicas.....	14
1.9.2. Técnicas de espectrometría de masas.....	16
1.9.3. Técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
1.10. Objetivos del estudio.....	18
2. Material y métodos:.....	19
2.1. Materiales.....	19
2.2. Métodos.....	19
2.2.1. Extracción de proteínas de langostino.....	19
2.2.2. Obtención de extractos de otras especies animales.....	20
2.2.3. Determinación de la concentración de proteína.....	20
2.2.4. Purificación de tropomiosina de langostino.....	21
2.2.4.1. Purificación mediante técnicas de precipitación.....	21
2.2.4.2. Purificación mediante cromatografías de exclusión molecular en gel ..	22
a) Cromatografía en Sephadex G-75.....	22
b) Cromatografía en Sephacryl S-200.....	23
2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
2.2.6. Técnicas inmunoquímicas.....	24
2.2.6.1. Obtención de antisueros.....	24
2.2.6.2. Técnica de inmunodifusión doble.....	24
2.2.6.3. Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto.....	25
2.2.7. Optimización de la extracción de tropomiosina.....	26
3. Resultados y discusión: .....	27

3.1.	Obtención de extractos de langostino. ....	27
3.2.	Purificación de tropomiosina. ....	30
3.2.1.	Purificación mediante técnicas de precipitación.....	30
3.2.2.	Técnicas cromatográficas. ....	30
3.2.3.	Optimización de la purificación de tropomiosina.....	33
3.2.3.1.	Eliminación del exoesqueleto antes de la extracción. ....	33
3.2.3.2.	Cromatografía en Sephadex G-75 en presencia de un agente quelante. ..	35
3.4.	Caracterización del antisuero anti-tropomiosina.....	37
3.4.1.	Técnica de inmunodifusión doble.....	37
3.4.2.	Técnica de ELISA no competitivo indirecto. ....	38
3.4.3.	Reactividad con extractos de diferentes especies. ....	39
3.5.	Optimización de las condiciones de extracción .....	43
4.	Conclusiones: .....	44
5.	Bibliografía.....	45

## **Resumen.**

Los crustáceos se encuentran entre los mariscos más comúnmente consumidos, pero también representan un grupo importante de alimentos que causa alergia alimentaria, siendo la tercera causa más importante de anafilaxia inducida por alimentos. La actual normativa de etiquetado obliga incluir los crustáceos si se utilizan como ingredientes en la elaboración de un alimento. Sin embargo, pueden también estar presentes como alérgenos ocultos debido a una contaminación cruzada durante el procesado, por lo que es necesario disponer de técnicas analíticas específicas y sensibles para su detección.

La presente memoria forma parte de un proyecto cuyo objetivo es desarrollar técnicas inmunoquímicas rápidas para la detección de crustáceos en alimentos procesados. Para realizar este trabajo ha sido necesario poner a punto un método de purificación de la tropomiosina, la proteína diana seleccionada por ser abundante y la de mayor potencial alergénico de los crustáceos, además de presentar una elevada termoestabilidad. Estas características son esenciales para que las técnicas que se desarrollen puedan alcanzar una buena sensibilidad y se puedan aplicar en alimentos que hayan sido sometidos a tratamientos térmicos durante su procesado.

Se han ensayado diferentes condiciones de preparación de las muestras de langostino (eliminando o no el exoesqueleto, aplicando o no un tratamiento térmico, entre otras), así como diferentes condiciones de extracción (pH y fuerza iónica del tampón, presencia de agentes desnaturalizantes, temperatura y tiempo de incubación, entre otros). Asimismo, se han ensayado dos procesos de purificación, uno mediante técnicas de precipitación isoeléctrica y salina y otro mediante técnicas de cromatografía de filtración en gel).

El protocolo de purificación de la tropomiosina con el que se han obtenido los mejores resultados en cuanto a pureza y rendimiento ha incluido la extracción de las proteínas del tejido muscular del langostino con PBS tras un tratamiento en ebullición durante 5 min y la separación de las proteínas mediante una cromatografía de filtración en Sephadex G-50 en presencia de un agente quelante.

La tropomiosina purificada se inoculó en conejos para obtener antisueros, que se han caracterizado para conocer su título y especificidad. Los antisueros, analizados mediante una técnica de ELISA indirecto, tienen un título alto y muestran reacción cruzada con extractos de otras especies de crustáceos, tanto crudos como tratados

térmicamente, pero no con extractos de moluscos, pescado, carne de ternera o de pollo. Estos resultados indican que los antisueros obtenidos podrían ser usados para desarrollar técnicas inmunoquímicas para la detección de especies de crustáceos en alimentos procesados.

### **Summary.**

Crustaceans are among the most commonly consumed seafood, but they also represent an important food group that causes food allergy. Proteins of crustaceans are the third most important cause of food-induced anaphylaxis. The current labeling regulation requires including crustaceans if they are used as ingredients in the preparation of food. However, they can also be present as hidden allergens due to cross-contamination during processing. Therefore, it is necessary to have specific and sensitive analytical techniques for their detection.

The present report is part of a project whose objective is to develop rapid immunochemical techniques for the detection of crustaceans in processed foods. To accomplish this work it has been necessary to fine-tune a method of purification of tropomyosin. This target protein has been selected for being abundant and the one of the highest allergenic proteins of crustaceans, and also presenting a high thermostability. These characteristics are essential so that the techniques developed can reach a good sensitivity and can be applied to thermal processed foods.

Different tropomyosin purification protocols have been tested from shrimp, varying the conditions of the extraction buffer, salinity, denaturing or boiling, physical elimination of the exoskeleton, use of reducing agents, denaturing agents and chelating agents. The protocol which presented a higher degree of purity was obtained by the extraction of protein from the muscle tissue of the shrimp in PBS buffer, boiled 5 min. Then, the protein fraction purified by a gel chromatography with EDTA as a chelating agent. Subsequently, antisera were obtained in rabbits against the purified protein. The antiserum titer was determined by an indirect non-competitive ELISA technique. Antisera properties of specificity and sensitivity were determined using double immunodiffusion and indirect ELISA techniques. Results showed a high titer for the antiserum and cross-reactivity against other crustaceans; even if they have been suffer thermal treatment. Besides, no cross-reactivity has been found with mollusk, fish, beef or chicken. Therefore, the antisera obtained could be used for developing immunochemical techniques to detect crustacean in processed food.

## **1. Introducción.**

### **1.1. Alergia alimentaria.**

Las alergias alimentarias son reacciones adversas a alimentos debido a su ingestión, contacto o inhalación, que tienen una patogenia inmunitaria comprobada (EFSA, 2014). Estas reacciones se producen solamente en individuos sensibilizados, y su respuesta no está relacionada con la dosis ni con ningún efecto fisiopatológico del alimento.

Las alergias alimentarias no deben confundirse con otras reacciones adversas a alimentos como las intolerancias o las toxiinfecciones alimentarias, en las que no está implicado el sistema inmunitario. Las intolerancias están causadas fundamentalmente por un déficit en el organismo de algún enzima que metaboliza un compuesto determinado de los alimentos, siendo la más conocida la intolerancia a la lactosa. Las toxiinfecciones alimentarias están causadas por la presencia en el alimento de bacterias o sus toxinas, como es el caso de una salmonelosis o el botulismo (Guandalini y Newland, 2011).

Existen dos tipos de alergias alimentarias, según estén mediadas o no por inmunoglobulinas de la clase E (IgE). Las mediadas por IgE presentan un alto título de esta clase de anticuerpos y se caracterizan porque los síntomas se presentan de forma rápida tras la toma de alimento (menos de 2 horas) por lo que se conocen como alergias de tipo inmediato. En las alergias no mediadas por IgE participan otras clases de inmunoglobulinas o células del sistema inmune, apareciendo los síntomas pasados varios días tras la ingestión del alimento sensibilizante, por lo que se denominan alergias de tipo retardado. En este grupo se incluye la enfermedad celíaca y otras enteropatías y enterocolitis a proteínas alimentarias de la leche de vaca, arroz, pollo o soja, entre otros (AESAN, 2007; Guandalini y Newland, 2011; Rajan, 2003).

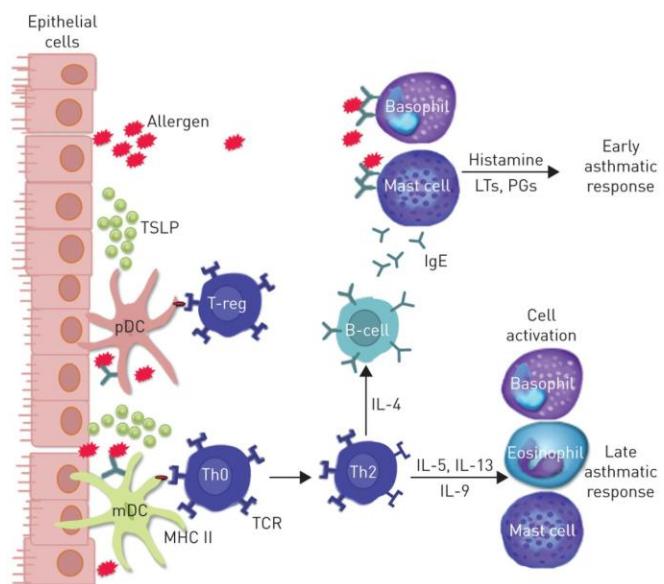
### **1.2. Mecanismo de la alergia alimentaria mediada por IgE.**

La alergia alimentaria tiene lugar en dos fases, la primera de sensibilización y la segunda de la reacción sintomática, como se muestra en la Figura 1 (Álvarez-Cuesta et al., 2006).

Tras la ingestión de un alimento ocurre un fenómeno fisiológico conocido como tolerancia oral a nivel de la mucosa gastrointestinal (Cardona et al., 2006), donde las

células presentadoras de antígeno y las células T reguladoras cooperan para memorizar tolerancia frente a los péptidos de la dieta (Chehade y Mayer, 2005). En las reacciones alérgicas mediadas por IgE, la primera vez que el individuo entra en contacto con el alimento alergénico tiene lugar la fase de sensibilización, que es asintomática. En esta fase las proteínas alergénicas presentes en el alimento son captadas por las células presentadoras de antígeno de la superficie de la mucosa digestiva. Estas células procesan el alérgeno y después se lo presentan a las células Th CD4<sup>+</sup>, induciendo su proliferación y diferenciación a linfocitos Th2 (Amsen et al., 2009). Estos linfocitos producen citoquinas e interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-13) que a su vez inducen la activación y proliferación de linfocitos B a plasmocitos productores de IgE específicas frente al alérgeno, lo cual inicia y propaga una respuesta inmune mediada por IgE (Abramovitch et al., 2017).

Las IgE se unen entonces a receptores de las células mastocíticas por su fracción constante. En las siguientes exposiciones (fase desencadenante) el alérgeno se une a las IgE específicas de la superficie de los mastocitos, lo que induce su activación y consiguiente degranulación, liberando histamina y otros componentes con potente actividad vasoactiva que son los causantes de los síntomas y manifestaciones clínicas de la reacción alérgica (Cardona et al., 2006, Sampath et al. 2017).



**Figura 1.** Mecanismo de una reacción alérgica mediada por IgE (Gauvreau et al., 2015).

### **1.3. Manifestaciones clínicas y tratamiento de la alergia alimentaria.**

Las alergias alimentarias presentan características clínicas bien definidas, y los signos y síntomas varían en severidad, duración, órganos y sistemas afectados (EFSA, 2014).

Las alergias alimentarias mediadas por IgE son las más comunes y pueden afectar a la piel, al sistema digestivo o/y al sistema respiratorio. La gravedad de los síntomas puede variar desde leve a severa, pudiendo en ocasiones causar un choque anafiláctico que pone en peligro la vida del individuo (Boyce et al., 2011).

A nivel de la piel, las alergias alimentarias suelen producir urticaria con prurito intenso y angioedema localizado especialmente en la submucosa de ojos, labios y a veces lengua y garganta. Los niños y adultos con dermatitis atópica tienen más probabilidad de sufrir alergias alimentarias dada su predisposición genética a tener mayores niveles de IgE sanguíneas. En el tracto gastrointestinal, los síntomas más característicos son náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea, y pueden aparecer aislados o en combinación.

Las afecciones del aparato respiratorio cursan principalmente con rinitis y asma. El síndrome de alergia oral producido por la ingestión de ciertos alimentos como frutas frescas u otros vegetales crudos, se presenta casi exclusivamente con prurito oral u orofaríngeo aunque en ocasiones puede haber también edema de labios, lengua y laringe. Estos síntomas suelen ir asociados al consumo de esos alimentos crudos y no cuando se ingieren procesados dada la naturaleza termosensible de los alérgenos implicados en el proceso.

La reacción alérgica más grave es la que da lugar a una reacción anafiláctica, que cursa de forma aguda e implica la afectación de numerosos órganos y sistemas, manifestándose con dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, disnea, cianosis, dolor torácico, urticaria, angioedema, arritmia, hipotensión y shock (Bock y Atkins, 1990). Esta reacción, que constituye el 1-2% de los casos de alergia alimentaria inmediata, puede causar la muerte si no se instaura de forma rápida un tratamiento con adrenalina o epinefrina.

El tratamiento más eficaz para prevenir una alergia alimentaria consiste en evitar el consumo del alimento sensibilizante. Cuando se han manifestado los síntomas, el tratamiento consiste en la administración de antihistamínicos o  $\beta$ -adrenérgicos, y en el

caso de un choque anafiláctico hay que inyectar de forma urgente epinefrina por vía intramuscular (Boyce et al., 2011).

En los últimos años se están aplicando terapias de desensibilización oral para inducir tolerancia a algunos alimentos alergénicos. Su fundamento radica en la ingestión progresiva de dosis crecientes del alérgeno en un periodo de tiempo corto. Los resultados han mostrado que se puede llegar a generar tolerancia clínica a ciertos alimentos como la leche (Skripak et al., 2008) y el huevo (Buchanan et al., 2007), consiguiendo en algunos individuos llegar a una tolerancia completa del alimento en raciones estándar (Itoh et al., 2010).

#### **1.4. Normativa y etiquetado de alimentos alergénicos.**

Dado que la forma más eficaz de prevenir una alergia alimentaria es evitar el consumo del alimento sensibilizante, es de gran importancia que los ingredientes alergénicos que se utilizan en la elaboración de alimentos estén declarados en la etiqueta de los alimentos que los contienen. Esta situación ha conducido a la publicación de una normativa de etiquetado (Reglamento UE Nº 1169/2011) que incluye un anexo en el que se recogen los alimentos con capacidad de inducir alergias o intolerancias, que deben ser obligatoriamente indicados en la etiqueta de forma resaltada si se añaden como ingredientes. Los alimentos incluidos en la lista de ese anexo son la leche, los huevos, el pescado, los crustáceos, el marisco, los frutos secos, los cacahuetes, el trigo y la soja, así como sus derivados que, en conjunto, son causantes de más del 95% de las reacciones alérgicas a alimentos (EUFIC, 2013).

Sin embargo, existe la posibilidad de que un alimento contenga una pequeña cantidad de un componente alergénico sin estar incluido en la etiqueta al no haber sido añadido como ingrediente, debido a la presencia de los denominados “alérgenos ocultos”. Se consideran “alérgenos ocultos”, aquellos presentes en un producto alimentario debido a una contaminación cruzada durante el transporte o el procesado. Para estas situaciones, la legislación permite a las industrias utilizar un etiquetado preventivo (“puede contener...”). Sin embargo, el uso indiscriminado de este tipo de etiquetado restringe la elección del consumidor alérgico y supone un riesgo potencial por falta de credibilidad. Por ello, la industria alimentaria debería implementar un plan de gestión de alérgenos para evitar el abuso de este tipo de etiquetado, para lo cual, resulta necesario disponer de técnicas analíticas sensibles y específicas para detectar la

presencia de alérgenos en los ingredientes y en los alimentos procesados, así como para comprobar que se realizan procesos de limpieza adecuados (FIAB, 2013). Estas técnicas podrían ser además usadas por los organismos oficiales para comprobar que se cumple la legislación sobre etiquetado, resultando todo ello en una mayor protección para el consumidor alérgico (Cucu et al., 2013).

### **1.5. Alergia al marisco.**

El marisco (clasificación no taxonómica que engloba moluscos y crustáceos marinos) es un grupo de alimentos que está experimentando un considerable incremento en su consumo en los últimos años por sus propiedades nutritivas y sensoriales. Sin embargo, las proteínas de este grupo de alimentos pueden dar lugar a reacciones alérgicas. La prevalencia de la alergia a crustáceos y moluscos en España se ha estimado en un 3,8% y 1,6% de los casos de alergia alimentaria, respectivamente, siendo la gamba y el calamar los implicados con mayor frecuencia. Además, se estima que en torno a un 75% de los individuos alérgicos a un tipo de marisco puede desarrollar alergia frente a otros tipos dada la alta reactividad cruzada que existe entre algunas de sus proteínas alergénicas (Borrego et al., 2003). Esta alergia tiene lugar fundamentalmente tras la ingestión del alimento, aunque es también frecuente su aparición tanto por inhalación de los vapores durante el cocinado como por su manipulación (Jeebhay et al., 2001; Jeebhay y Lopata, 2012).

La alergia al marisco afecta fundamentalmente a los adultos y a los niños mayores de 6 años y se caracteriza porque suele persistir de por vida.

La sintomatología de la alergia al marisco es similar al resto de las alergias alimentarias, predominando la urticaria, el angioedema, la rinitis y el asma. Además, el marisco es uno de los alimentos que causa con más frecuencia reacciones severas y un choque anafiláctico, en aproximadamente un 11% de los casos (Lopata y Lehrer, 2009; Lopata et al., 2010).

### **1.6. Alérgenos de los crustáceos.**

En 1981 Hoffman et al. describieron dos antígenos mayoritarios en el extracto de langostino. Por una parte, el antígeno I, formado por un dímero de dos cadenas polipeptídicas de un peso molecular de 21 kDa, unidas probablemente por enlaces no covalentes, que fue detectado a niveles de traza en extractos hervidos y que presentaba

una baja alergenicidad. Por otra parte, el antígeno II, de un peso molecular de 37 kDa y fuertemente alergénico, que fue identificado posteriormente como la tropomiosina (Shanti et al., 1993) y aislado gracias a su termorresistencia. Ambos antígenos fueron detectados tanto en el cuerpo como en el exoesqueleto del langostino (Álvarez-Cuesta et al., 2006).

Actualmente se han descrito y caracterizado más de 30 alérgenos de crustáceos que se pueden encontrar en la base de datos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) (Lopata et al., 2016). De todos ellos la tropomiosina se considera la proteína más alergénica, ya que más del 60% de los individuos alérgicos a los crustáceos presentan IgE específicas frente a ella. Además, entre las proteínas alergénicas más representativas de los crustáceos también se encuentran la arginina quinasa (AK), las cadenas ligera de la miosina, la proteína de unión al calcio del retículo sarcoplasmático, la troponina C, la troponina I y la triosa fosfato-isomerasa como se muestra en la Tabla 1 (Lopata et al., 2016; Rahman et al., 2012). Todas estas proteínas alergénicas han sido detectadas en el langostino *Penaeus monodon*. La tropomiosina ha sido encontrada en prácticamente todos los tipos de crustáceos (langostino, cangrejo y langosta, entre otros) (Lopata et al., 2016).

**Tabla 1.** Proteínas alergénicas de los crustáceos (Chen et al., 2013; Lopata et al., 2016).

Alérgeno	Peso molecular	Características	Exposición	Funciones
Tropomiosina	34-38 kDa	Muy termoestable e IgE reactiva	Ingestión, inhalación	Junto con la troponina regula la interacción actina-miosina
Arginina quinasa	40-45 kDa	Lábil	Ingestión, inhalación	Cataboliza la transferencia reversible de un grupo fosforilo del ATP a la arginina
Cadenas ligera de miosina	17-20 kDa	Termoestable	Ingestión	Función reguladora en la contracción del músculo liso cuando es fosforilada por la MLC quinasa
Proteína sarcoplasmática de unión al calcio	20-25 kDa	Termoestable, muy polimórfica, IgE reactiva	Ingestión	Regula la disponibilidad del calcio en el músculo. Análoga a la parvalbúmina de pescado
Troponina C	20-21 kDa	No conocida	Ingestión	Regula la interacción de la actina y la miosina durante la contracción muscular al unirse al calcio
Triosafosfato isomerasa	28 kDa	Lábil	Ingestión, inhalación	Enzima clave de la glucólisis: cataliza la conversión de dihidroxiacetona fosfato a gliceraldehído-3 fosfato

## **1.7. Tropomiosina.**

La tropomiosina es una proteína que forma parte de las superestructuras proteicas que componen las unidades estructurales del músculo, como los sarcómeros del músculo estriado de mamíferos. Su función es, junto con la troponina, la de separar la actina de la miosina cuando no hay un estímulo por parte del sistema nervioso, al interponerse entre ellas.

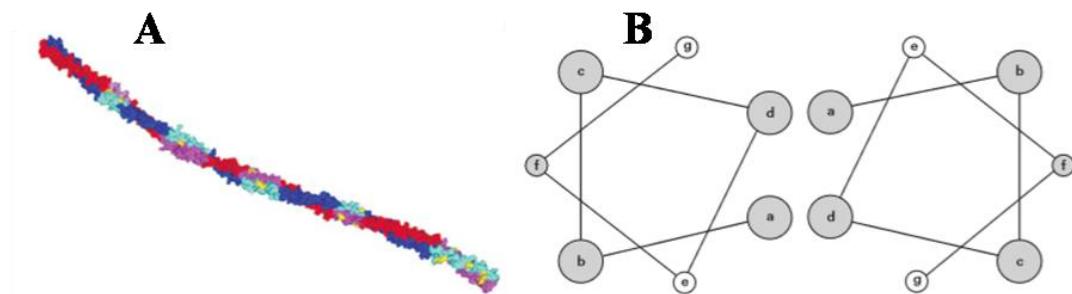
La tropomiosina fue el primer alérgeno identificado en el langostino y se denominó como Pen a 1. Tiene un peso molecular de 38 kDa y un punto isoeléctrico de 5,4-5,8 (Hoffman et al., 1981). La tropomiosina se encuentra asociada a la troponina (proteína globular), que consta a su vez de tres subunidades: TnT (responsable de la unión a la tropomiosina), TnC (que une iones  $\text{Ca}^{2+}$ ) e TnI (con actividad ATPasa) (Greaser, et al. 1973). El peso molecular de la subunidad la TnT es aproximadamente de 43 kDa, el de la subunidad TnC de 18,5 a 19 kDa y el de la subunidad TnI de 28 a 31 kDa (Miegel, et al. 1992).

La tropomiosina es una proteína filamentosa termoestable, de estructura homodimérica con los monómeros asociados de forma no covalente (DeWitt et al., 2004; Hoffman et al., 1981). Cada subunidad está compuesta por dos cadenas de hélice alfa (Figura 2A), que presentan una repetición de un patrón de siete tipos de aminoácidos según su cadena lateral (ácidos, básicos o neutros) (Hoffman et al., 1981).

En la Figura 2B se muestran esquemáticamente los tipos de aminoácidos de las dos cadenas de la tropomiosina. Como se puede observar, presenta residuos hidrofóbicos apolares en las posiciones a y d gracias a los cuales se mantienen unidas ambas cadenas, mientras que en las posiciones b, c, e, f y g se sitúan los aminoácidos polares o iónicos. Las interacciones entre los residuos ácidos de la posición e y los básicos de la g ayudan a estabilizar la doble hélice (Reese et al., 1999). Así mismo, las tropomiosinas son proteínas ricas en residuos de lisina (Kamath et al., 2013) y carecen tanto de residuos aromáticos (ausencia de triptófano y escasa presencia de tirosina y fenilalanina) como de puentes disulfuro (Ayuso et al., 2001; Hoffman et al., 1981).

Desde el punto de vista inmunológico, el equipo de Ayuso et al. (2001) observó que los cinco epítopos de unión a IgE identificados en la proteína alergénica Pen a 1 contienen la secuencia de aminoácidos LEXXL, siendo L leucina y X normalmente un aminoácido cargado negativamente, como el ácido glutámico (E) o el ácido aspártico

(D). La reactividad entre IgE y tropomiosina no siempre se da por secuencias tandem, pero siempre que se encuentren éstas son reactivas para las IgE.



**Figura 2.** **A:** Estructura tridimensional de la doble hélice alfa de la tropomiosina de langostino. **B:** Modelo transversal de la estructura de la doble hélice, las letras simbolizan los aminoácidos. (Reese et al., 1999; 2005).

### 1.8. Reactividad cruzada entre la tropomiosina de crustáceos y otras especies.

El 89% de la estructura primaria de la cadena polipeptídica de la tropomiosina es compartida por las diferentes especies de crustáceos, lo que hace que sea la principal proteína alergénica implicada en la reacción cruzada entre ellos (Kamath et al., 2013).

Además, la tropomiosina de los crustáceos presenta reacción cruzada con la tropomiosina de otros artrópodos como la cucaracha roja (*Periplaneta americana*) (Asturias, 1999), los ácaros del polvo (*Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* y *Euroglyphus maynei*) (Witteman et al., 1994) o el pececillo de plata (*Lepisma saccharina*) (Barletta et al., 2005), lo que puede ocasionar que una alergia a los crustáceos derive también en una alergia a alguna de estas especies.

La tropomiosina de los crustáceos está también implicada en la reacción cruzada con algunos moluscos como el calamar, aunque su grado de similitud es menor (EFSA, 2014). Por otro lado, la tropomiosina de las especies de vertebrados no es alergénica y no da reactividad cruzada con la de los crustáceos, a excepción del pez *Oreochromis mossambicus* (Liu et al., 2013).

### 1.9. Técnicas de detección de alérgenos en alimentos.

En los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo en desarrollar técnicas analíticas para detectar alérgenos alimentarios y se ha estudiado su aplicación en alimentos procesados. Los requisitos que deberían cumplir estas técnicas incluyen el

poseer una alta sensibilidad y especificidad, además de ser sencillas y rápidas, requisitos que en ocasiones son difíciles de cumplir.

La EFSA clasifica las técnicas de detección de alérgenos en dos grandes grupos: las basadas en la determinación de proteínas o péptidos como las técnicas electroforéticas, inmunoquímicas o la espectrometría de masas, y las basadas en la determinación de DNA, como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus variantes convencional y en tiempo real.

La utilización de materiales de referencia permitiría establecer una comparación entre las técnicas desarrolladas y facilitaría el proceso de validación de las mismas. Sin embargo, actualmente existen muy pocos materiales de referencia de alimentos alergénicos.

### **1.9.1. Técnicas inmunoquímicas.**

Las técnicas inmunoquímicas son aquellas que están basadas en el reconocimiento de una determinada proteína por los anticuerpos específicos obtenidos frente a ella. Existen diversos tipos de técnicas inmunoquímicas entre las que destacan las de precipitación, las de inmunoensayo enzimático y la inmunocromatografía de flujo lateral.

Las técnicas de precipitación son aquellas en las que la reacción antígeno-anticuerpo da lugar a un complejo que forma un precipitado visible siendo la más usada la técnica de inmunodifusión doble. Estas técnicas fueron las que primero se aplicaron en el análisis de alimentos. Son técnicas muy sencillas, cuyo resultado se observa visualmente. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad, del orden de  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y a que la formación del precipitado requiere un tiempo largo (24 a 48 horas), han sido sustituidas por otras técnicas inmunoquímicas que resultan más sensibles y rápidas.

#### **Técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorben Assay):**

Las técnicas de inmunoensayo enzimático, son aquellas en las que se emplean antígenos o anticuerpos marcados con enzimas. De ellas, las técnicas de ELISA en placa son las más usadas en la actualidad en el análisis de alimentos (Yolken, 1978). En estas técnicas, la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza al añadir un sustrato del enzima marcador, que da lugar a la formación de un producto coloreado. Estas técnicas tienen

una gran sensibilidad, del orden de ng/ml, y son rápidas, ya que el ensayo se puede completar en menos de 2 horas (EFSA, 2014).

Los dos formatos de ELISA en placa más empleados son el sándwich y el competitivo indirecto. En el formato de tipo sándwich, la proteína diana es capturada por los anticuerpos específicos que tapizan el pocillo, y el complejo es detectado por la adición de anticuerpos específicos marcados que se unen a la proteína formando un sándwich. En este formato la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la concentración de proteína presente en la misma.

El formato competitivo indirecto se basa en la competición entre la proteína diana presente en la muestra y la fijada al pocillo por la unión con sus anticuerpos específicos. La detección del complejo formado se realiza mediante la adición de un anticuerpo secundario que son inmunoglobulinas marcadas que interaccionan con los anticuerpos que han reaccionado con la proteína fijada al pocillo. En este formato, la absorbancia de la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la misma (Zao et al. 2002).

La primera técnica de ELISA para cuantificar la proteína alergénica Pen a 1 fue desarrollada por Jeoung et al. (1997) utilizando anticuerpos monoclonales. Esta técnica tenía una buena sensibilidad (1 ng/ml de tropomiosina) y no presentó reacción cruzada con la cucaracha, los ácaros y la ostra. En los últimos años se han desarrollado técnicas de ELISA que utilizan anticuerpos policlonales marcados con peroxidasa o biotina, capaces de detectar crustáceo crudo y hervido, como se refleja en la revisión de la EFSA (2014).

#### **Técnica de inmuno Cromatografía de flujo lateral:**

En esta técnica, los anticuerpos específicos, tapizados en la superficie de microesferas de poliestireno coloreado o de oro coloidal, reaccionan con la proteína diana presente en la muestra, y el complejo formado asciende por capilaridad a lo largo de una membrana de nitrocelulosa o nylon que contiene anticuerpos específicos inmovilizados en una fina línea. El complejo es capturado por los anticuerpos inmovilizados, y la presencia de la proteína en la muestra problema se visualiza por la aparición de una línea coloreada en la membrana (van Herwijnen, 2006).

Este tipo de ensayo presenta una alta sensibilidad, del orden de ng/ml, es muy sencillo de realizar, y rápido ya que se puede completar en 10 minutos. Estas características han hecho que actualmente sea la técnica inmunoquímica de elección

como prueba cualitativa rápida. Algunas empresas, como R-BIOPHARM, NEOGEN y ROMERLABS, comercializan tests de inmunocromatografía de flujo lateral para la detección de tropomiosina (crustáceo). Algunos de estos test parecen presentar cierta reacción cruzada con moluscos (ostra, mejillón y calamar), como se ha indicado en la revisión publicada por Schubert-Ullrich et al. (2009).

### **Microarrays:**

Son técnicas que permiten detectar un gran número de alérgenos simultáneamente. Los más habituales son los microarrays de anticuerpos, donde éstos son inmovilizados por procesos de microestructurado, quedando estampados en la superficie del chip de microarray. Permite el reconocimiento y cuantificación de alérgenos en el rango de ng/ml a µg/ml y precisa disponer de un programa informático de procesado de imagen.

#### **1.9.2. Técnicas de espectrometría de masas.**

Su fundamento radica en la vaporización e ionización de las moléculas que han sido previamente separadas mediante una técnica de cromatografía líquida. Los resultados proporcionan una relación entre su masa y su carga eléctrica, que permite llevar a cabo su identificación por comparación con bases de datos de compuestos previamente caracterizados (EFSA, 2014). Hay dos estrategias principales:

**Con digestión de las proteínas.** Requiere una degradación previa de las proteínas a péptidos, su separación por cromatografía, ionización de los mismos y posterior reconstrucción informática de la proteína a partir de los fragmentos peptídicos. El límite de detección de esta técnica suele ser de 1 a 5 mg/kg.

**Sin digestión previa de proteínas.** En este caso no es posible detectar pequeñas variaciones en la secuencia de proteínas y el límite de detección suele ser de 5 mg/kg. Esta técnica resulta útil para determinar proteínas especialmente pequeñas sin degradarlas.

La utilización de estas técnicas requiere operarios especializados ya que el manejo y la interpretación de los resultados es compleja. Además, el equipo es muy costoso, por lo que su uso se limita fundamentalmente al ámbito de la investigación y de laboratorios especializados.

En 2013, Abdel Rahman et al. desarrollaron una técnica de espectrometría de masas para detectar y cuantificar la tropomiosina, la arginina quinasa y la proteína sarcoplasmática de unión al calcio del camarón boreal (*Pandalus borealis*), resultando una técnica muy selectiva, reproducible y precisa.

### 1.9.3. Técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR es una técnica en la que se amplifica de forma exponencial y específica una región determinada de DNA o RNA a partir de una muestra compleja. Esta técnica consta de 30-40 ciclos, que incluye cada uno una etapa de desnaturación para desplegar la doble cadena de ADN, una etapa de hibridación de los cebadores al DNA diana; y una etapa de extensión de la cadena de DNA por acción de la DNA polimerasa. El DNA amplificado puede visualizarse mediante electroforesis, utilizando un colorante fluorescente.

En la PCR a tiempo real, la amplificación se realiza en presencia de un fluorocromo que aumenta notablemente la fluorescencia cuando se une al DNA que se está amplificando. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de DNA amplificado.

Estas técnicas presentan una alta sensibilidad, del orden de 0,1 a 100 mg/kg y resultan muy adecuadas para ser usados en alimentos que contienen poca cantidad de proteína como el apio (Poms et al. 2004; Monaci y Visconti, 2010).

En el caso de los crustáceos, estas técnicas permiten precisar la especie presente en el alimento. Un ejemplo de detección e identificación de la especie de crustáceo en alimentos es el método del estudio de los Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción por PCR, que consiste en la digestión de los DNA amplificados por PCR por enzimas de restricción y el análisis de los fragmentos de DNA obtenidos (Brzezinski, 2005). Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción consisten en la variación de la secuencia de un gen por la multiplicación de un grupo de bases nitrogenadas, generando diferentes alelos, lo que permitiría identificar desde especies diferentes hasta individuos de una misma especie.

**Microarrays de DNA:** En estas técnicas los oligonucleótidos complementarios a cadenas específicas de DNA se fijan a una superficie sólida por diferentes técnicas.

Después, los fragmentos amplificados de DNA por la PCR, marcados con un fluorocromo, dan lugar a una señal interpretable informáticamente (EFSA, 2014).

### **1.10. Objetivos del estudio.**

Este trabajo se engloba dentro de un proyecto que se está realizando en la empresa ZEULAB. El objetivo de dicho proyecto es el desarrollo de un método para la detección de crustáceos en alimentos mediante técnicas inmunoquímicas, en concreto de ELISA y de inmunocromatografía de flujo lateral. El desarrollo de este trabajo Fin de Máster constituye la primera etapa de dicho proyecto cuyo objetivo principal ha sido la obtención de antisueros capaces de reconocer específicamente proteínas de crustáceos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- 1- Determinar las condiciones óptimas para la extracción y purificación de la tropomiosina.
- 2- Obtener antisueros frente a la tropomiosina y caracterizarlos (título y especificidad).
- 3- Determinar las condiciones óptimas de extracción de las proteínas de crustáceos.

## **2. Material y métodos:**

### **2.1. Materiales.**

Los alimentos utilizados en este trabajo se han obtenido de supermercados locales. Todos los reactivos para la preparación de soluciones, detergentes y colorantes han sido de calidad de análisis de las marcas Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, Estados Unidos), PANREAC (Darmstadt, Alemania) y Scharlab (Sentmenat, Barcelona, España).

Los marcadores de pesos moleculares preteñidos para electroforesis, así como los anticuerpos secundarios empleados para la técnica de ELISA, IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa, fueron de Sigma-Aldrich (Poole, Reino Unido).

Los geles de cromatografía Sephadex G-75 y Sephacryl S-200 proceden de GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Los equipos técnicos relevantes para el estudio están indicados la primera vez que se presenten en esta memoria.

Los ensayos de BCA se realizaron en placas de 96 pocillos (Greiner, SIGMA-ALDRICH) y un kit de Pierce BCA Protein (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.2. Métodos.**

#### **2.2.1. Extracción de proteínas de langostino.**

Se prepararon extractos a partir de langostino (*Penaeus vannamei*) crudo descongelado. Tras separar la cabeza, el cuerpo del langostino se trituró con (eliminando la cabeza) o sin exoesqueleto (hirviendo 20 minutos el langostino entero y retirando cabeza y exoesqueleto al enfriar) y cada muestra se conservó en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

La extracción de proteínas se realizó utilizando diferentes tampones que se añadieron en una proporción de  $1,0 \pm 0,1$  g de pasta de langostino por cada 10 ml. Los tampones ensayados fueron: tampón borato 0,1M pH 8,0; tampón borato 0,1M, NaCl 0,15 M, pH 9,0 y tampón fosfato potásico 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (PBS).

La muestra triturada se homogeneizó mediante agitación en un vórtex seguido de una agitación suave en un rotatubos a temperatura ambiente durante 30 min o a 4 °C durante 2 h.

Con algunos de los extractos obtenidos se llevó a cabo un tratamiento térmico en un baño de agua en ebullición durante 5 min, previo a la centrifugación, o durante 20 min tras la centrifugación.

En algunas muestras se realizó el tratamiento térmico del langostino entero (previamente a su triturado) manteniéndolo en ebullición durante 20 min, tras lo cual se retiró el exoesqueleto, se trituró y las proteínas se extrajeron de la pasta obtenida mediante agitación durante 4,5 h a 4 °C.

Todos los extractos fueron filtrados a través de filtros de 0,22 µm (Merk-Millipore, Darmstadt, Alemania). Finalmente, se realizó una centrifugación a 3000 g durante 5 min, recogiéndose el sobrenadante que se filtró por filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. Todos los extractos se conservaron a 4°C en presencia de azida sódica al 0,01% hasta su purificación y a -20°C hasta la inmunización para la producción de antisueros.

### **2.2.2. Obtención de extractos de otras especies animales.**

Se han preparado extractos de las especies de crustáceos decápodos: cigala (*Nephrops norvegicus*), carabinero (*Aristaeopsis edwardsiana*), gamba (*Parapenaeus longirostris*), gambón (*Pleoticus muelleri*). Además, se han obtenido extractos de moluscos: mejillón (*Mytilus edulis*) y pulpo (*Octopus vulgaris*); de peces: bacalao (*Gadus morhua*) y merluza (*Merluccius merluccius*); y de carne: ternera (*Bos taurus*) y pollo (*Gallus gallus*). En el caso de los crustáceos se tomaron muestras del cuerpo muscular con y sin exoesqueleto, y en el caso del mejillón con y sin valvas.

De cada especie, se pesaron 2,5 g de la muestra previamente triturada y se añadieron 5 ml de PBS. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 40 min y después se centrifugó durante 20 min a 9000 g. El sobrenadante se filtró por 0,22 µm y se almacenó en alícuotas a -20 °C hasta su uso. Para los ensayos posteriores mediante la técnica de ELISA, los extractos se incubaron en un baño de agua en ebullición durante 20 min.

### **2.2.3. Determinación de la concentración de proteína.**

La concentración de proteína de los extractos se ha determinado usando el test colorimétrico del ácido bicinchonínico (BCA, Bicinchoninic Acid Assay). Este método combina la reducción del Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> en medio alcalino (pH 11,2) por las proteínas con

la detección selectiva del catión Cu<sup>+1</sup> utilizando el ácido bicinconílico. El producto de la reacción formado por el complejo de BCA con un ion Cu<sup>+1</sup> tiene un color púrpura con un máximo de absorbancia a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra (Smith et al. 1985). Previamente, se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) en un rango de concentraciones de 0,125 a 2 mg/ml. Para realizar el ensayo, se añadieron a los pocillos por duplicado 25 µl de muestra o de estándar y 200 µl del reactivo de BCA, y tras incubar la mezcla a 37°C durante 30 min, se leyó la absorbancia de los pocillos en un lector de placas Microtiter (SUNRISE™, TECAN, Männedorf, Suiza) a una longitud de onda 595 nm. La concentración de proteína de las muestras se calculó interpolando los valores de absorbancia en la recta estándar obtenida con los patrones de BSA.

#### **2.2.4. Purificación de tropomiosina de langostino.**

La purificación de tropomiosina de los extractos de langostino se ha llevado a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando tampones de diferente contenido en NaCl, así como en presencia o ausencia de un agente quelante. Además, se ha realizado una purificación utilizando técnicas de precipitación isoeléctrica y de precipitación salina en presencia de un agente reductor.

Las fracciones purificadas, se dializaron frente a PBS y se concentraron utilizando una célula de ultrafiltración con una membrana de poliamida de punto corte de 10 kDa (GE, EEUU).

##### **2.2.4.1.Purificación mediante técnicas de precipitación.**

Siguiendo el protocolo descrito por Aki y Kodama en 1995, en el que se utiliza una alta concentración salina y un agente reductor, el ditiotreitol (DTT), se purificó una fracción de tropomiosina. Para ello, se tomó el cuerpo del langostino entero y se hirvió durante 20 min y, tras retirar el exoesqueleto, se trituró. Despues, a 3 g de masa se adicionaron 30 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, KCl 1 M, DTT 0,5 mM, pH 7,0 y se mantuvo en agitación durante 10 min. A continuación, la muestra se centrifugó a 3000 g durante 15 min. El sobrenadante obtenido se sometió a una precipitación isoeléctrica, para lo cual se ajustó el pH a 4,6 con HCl 0,1 M y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. Tras centrifugar la mezcla a 5000 g durante 15 min,

se recogió el precipitado, se resuspendió en 30 ml de tampón de extracción y se centrifugó durante 15 min a 3000 g. El sobrenadante obtenido se ajustó de nuevo a pH 4,6 con HCl 0,1 M y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 26 ml de tampón Tris HCl 50 mM, pH 7,0, que contenía DTT 0,5 mM, y se sometió a una precipitación salina añadiendo 29,3 ml de una solución saturada (5,6 M) de sulfato amónico manteniendo la mezcla en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar durante 20 min a 10000 g, al sobrenadante obtenido se le añadieron 9,7 ml de la solución de sulfato amónico saturada y la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min a temperatura ambiente. Después, la mezcla se centrifugó durante 20 min a 10000 g y el precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de DTT 0,5 mM en agua destilada.

#### **2.2.4.2.Purificación mediante cromatografías de exclusión molecular en gel.**

Esta técnica de cromatografía permite separar los componentes de una muestra en función de su tamaño molecular. Para ello, se utiliza un lecho cuya fase estacionaria es un gel que está constituido por partículas esféricas que tienen poros de un determinado tamaño. Los componentes de la muestra de tamaño pequeño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardados en su paso por la columna, mientras que las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel, eluyendo primero (Jason, 2012; Porath y Flodin, 1959).

Los geles empleados fueron Sephadex G-75 y Sephadex S-200. El primero es un gel de dextrano (polímero de glucosa) que tiene un rango de resolución para proteínas globulares de 1 a 100 kDa. El segundo es un gel de alildextrano y N, N'-metilenbisacrilamida entrecruzados, con un rango de resolución de 5 a 250 kDa.

##### **a) Cromatografía en Sephadex G-75.**

Un volumen de extracto de langostino (entre 4 y 15 ml) se aplicó a una columna de Sephadex G-75 (2 x 60 cm) previamente equilibrada con el tampón correspondiente. Las proteínas se eluyeron a un flujo de 1,8 ml/min, recogiéndose fracciones de 1,4 ml. Los tampones de elución ensayados fueron: tampón borato 0,1 M, pH 8,0 y PBS con o sin 10 mM de EDTA. La absorbancia de las fracciones eluídas se determinó a 280 nm y las que presentaron una absorbancia mayor a 0,2 se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las fracciones enriquecidas en tropomiosina se juntaron y

concentraron y se estimó su concentración mediante espectrofotometría considerando su coeficiente de extinción ( $A^{0,1\%}_{280}$  nm) de 0,15 (DeWitt et al., 2004).

**b) Cromatografía en Sephadex S-200.**

Un volumen de entre 1 y 4,5 ml de la fracción enriquecida en tropomiosina procedente de la etapa anterior se aplicó en una columna Sephadex S-200 (1,5 x 50 cm). El flujo se mantuvo a 1,8 ml/min y el eluado se recogió en fracciones de 1,4 ml. Los tampones de elución ensayados en esta chromatografía contenían NaCl 0,5 M, KC1 0,5 M o ácido acético al 5%, con el objeto de minimizar las interacciones electrostáticas entre los componentes de la muestra y el gel. Las muestras a aplicar en la columna se dializaron previamente con tampones de la misma composición al del tampón de elución.

**2.2.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Para caracterizar las proteínas contenidas en los extractos o en las fracciones obtenidas en las etapas de purificación de la tropomiosina se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y de mercaptoetanol.

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. La utilización de SDS proporciona una relación carga/masa constante por lo que las proteínas se separan en función de su peso molecular. Además, la utilización de un agente reductor rompe las interacciones covalentes por puentes disulfuro, lo que permite separar las proteínas que se encuentren agregadas o las subunidades de una proteína que se encuentran unidas covalentemente.

Las muestras a analizar se prepararon añadiendo a 20 µl de la muestra, 5 µl del tampón de carga compuesto por Tris-HCl 0,22 M, pH 6,8, que contenía SDS 7,27 % w/v, glicerol 36,37 % v/v, azul de bromofenol 0,01 % (p/v) y β-mercaptopropanoal 1,3 M e incubando la mezcla a 100°C durante 10 min. El tampón de la electroforesis empleado fue Tris-HCl 0,9 M, 13 mM de glicina, SDS 1 g/l, pH 8,2. Para la electroforesis, se utilizaron geles Mini-PROTEAN® de Biorad de 10 pocillos al 12% de acrilamida, y una cubeta de electroforesis Biorad Power Pac™ Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EEUU). En todas las electroforesis se incluyó en uno de los pocillos un marcador de pesos moleculares. Las electroforesis se desarrollaron aplicando una corriente de 120 V y se dejó desarrollar hasta que el colorante alcanzó el final del gel.

Posteriormente se tiñeron los geles con una solución de azul de Coomassie (0,5 g/l del colorante Comassie Brillant Blue R250, 40% metanol y 7% ácido acético en agua destilada) durante 30 min. Para la decoloración se incubó el gel durante 30 min en una solución de 40% metanol y 7% ácido acético. Finalmente se realizó un último lavado con una solución que contenía un 7% ácido acético y un 5% metanol.

## **2.2.6. Técnicas inmunoquímicas.**

### **2.2.6.1. Obtención de antisueros.**

Para la obtención de los antisueros, se inyectaron a cada conejo por vía subcutánea repartida en cuatro puntos distintos, 0,7 mg de tropomiosina purificada o bien 0,7 mg de un extracto de langostino preparado con exoesqueleto y sin hervir, ambos disueltos en 0,5 ml de PBS y emulsionados con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freud. Tras 15 días se repitió la misma inoculación, pero con adyuvante incompleto de Freud. Pasado un mes de la inoculación se realizó una extracción de sangre de la vena marginal de la oreja. Tras la extracción de la sangre, los animales se rehidrataron inoculando un volumen igual al de la sangre extraída, de suero fisiológico estéril por vía subcutánea. El tiempo de recuperación entre extracciones sucesivas fue de 30 días, realizándose reinoculaciones a los 15 días de cada extracción. La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a 4°C y se centrifugó a 3000 g durante 15 min. Tras eliminar el precipitado se alicuotó en fracciones de 1 ml y se guardó a -20 °C hasta su uso. Se realizaron un total de tres inoculaciones y dos extracciones.

### **2.2.6.2. Técnica de inmunodifusión doble.**

Esta técnica se ha utilizado para determinar la inmunorreactividad de los antisueros obtenidos. El fundamento de la técnica radica en la capacidad de migración de las proteínas a través de un gel de agarosa y de la precipitación que ocurre cuando éstas interaccionan con anticuerpos específicos en una proporción adecuada, dando lugar a la aparición de un precipitado visible (Bailey, 1996).

Esta técnica se realizó en geles de agarosa al 1% en tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,4 que contenía NaCl 0,15 M y un 0,01 % de azida de sodio, que se prepararon en placas de Petri. Se troquelaron 7 pocillos por placa, seis en la periferia y

uno central. En los pocillos radiales se cargaron cuatro muestras (entre 10-20 µl) y un control positivo (extracto crudo de langostino o tropomiosina purificada, según el antisuero analizado) y un control negativo (agua destilada). En el pocillo central se cargaron 20 µl del antisuero anti-proteínas solubles de langostino o anti-tropomiosina. La placa se incubó 24 horas en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se lavó con una solución de NaCl 0,15 M y azida sódica al 0,01 % durante 72 horas, renovando la solución cada 24 horas para eliminar las proteínas no precipitadas. Se desecaron los geles y se tiñeron con una solución colorante de negro amido 0,1% (p/v), ácido acético 0,45 M y acetato sódico 45 mM durante una hora. Después los geles se decoloraron con ácido acético al 2% hasta que las zonas del gel sin inmunoprecipitados quedaron incoloras.

#### **2.2.6.3.Técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto.**

Esta técnica se ha utilizado también para caracterizar los antisueros obtenidos ya que tiene la ventaja de tener una mayor sensibilidad que la técnica de inmunodifusión doble. Para ello, los pocillos se tapizaron con 300 µl de los extractos proteicos preparados a partir de las diferentes especies, tanto en su forma nativa como desnaturalizada térmicamente, a concentraciones de 1 y 10 µg/ml en tampón carbonato sódico 0,1 M, pH 9,6. También se tapizaron pocillos con tropomiosina purificada a concentraciones de 10, 5, 1 y 0,5 µg/ml en el mismo tampón. Se realizó una incubación de 18 horas a 4°C. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS que contenía un 0,01 % de Tween 20 (PBST). Después, se adicionaron 100 µl por pocillo del antisuero anti-tropomiosina del segundo sangrado en un rango de diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-5}$  y se incubaron una hora a temperatura ambiente. Tras realizar nuevamente cuatro lavados con PBST, se añadieron 100 µl por pocillo de una solución adecuada de IgG de cabra anti-IgG de conejo marcadas con peroxidasa y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Tras realizar cuatro lavados, se añadieron 100 µl por pocillo del sustrato cromógeno compuesto por 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción enzimática, se añadieron 50 µl por pocillo de una solución de ácido sulfúrico 1 M. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm de los pocillos en un lector de placas microtiter.

## **2.2.7. Optimización de la extracción de tropomiosina.**

Para la detección de proteínas de crustáceos en alimentos mediante una técnica inmunoquímica, la primera fase es la extracción de las proteínas de la muestra alimentaria. Esta extracción debe de ser efectiva para solubilizar las proteínas presentes en la muestra y además compatible con la reacción antígeno-anticuerpo.

Para seleccionar el tampón de extracción más eficiente, se ensayaron trece condiciones diferentes utilizando muestras de langostino entero crudo triturado. Las muestras se trajeron en una relación de 10 ml de tampón por gramo de muestra, realizando una incubación en agitación durante 15 min a 40°C y una posterior centrifugación a 7000 g durante 20 min. La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el test de BCA. Los tampones de extracción ensayados fueron: carbonato sódico 0,1 M pH 9,6; citrato 0,15 M pH 4,5; TrisHCl 0,2 M pH 8,2; borato pH 8,0 y PBS. Los tampones carbonato, citrato, TrisHCl y borato se ensayaron también tras añadirles NaCl o KCl a una concentración final de 0,2 M.

### 3. Resultados y discusión:

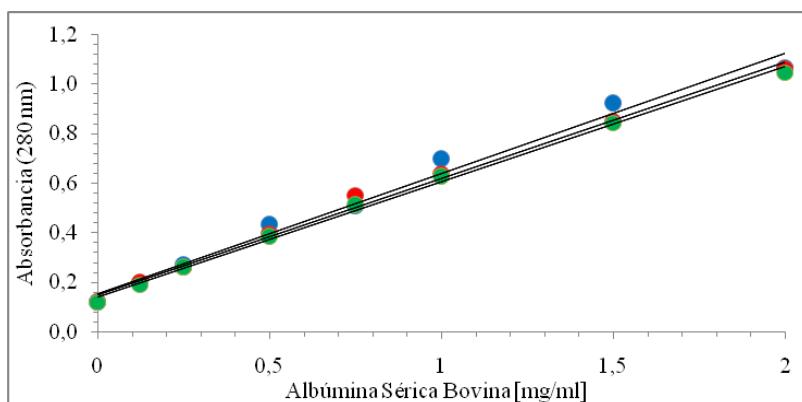
#### 3.1. Obtención de extractos de langostino.

Se prepararon extractos de langostino, tanto crudo como hervido (antes o después de la centrifugación), utilizando tampones de diferente pH y concentración de NaCl, con el fin de seleccionar el que permitiese obtener una mayor cantidad de proteína. Los tampones ensayados fueron PBS y borato a pH 8,0 y 9,0 (Hoffman et al., 1981).

Los extractos se cuantificaron por el test de BCA, por lo que previamente se realizó un ensayo con los estándares disueltos en cada tampón para comprobar que el tampón no afecta la cuantificación. Como se muestra en la Figura 2, las rectas patrón obtenidas tenían una pendiente similar en todos los casos y un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) superior a 0,98 por lo que sólo se usó la obtenida con PBS para cuantificar la proteína total de todos los extractos, independientemente del tampón utilizado.

De este modo, se trabajó con extractos tratados térmicamente ya que al ser la tropomiosina una proteína que presenta una considerable termoestabilidad, cabe esperar que las proteínas del extracto de langostino que sean más termosensibles se desnaturalarían y/o agregarían permitiendo una mejor eliminación de las mismas durante el proceso de purificación (Olander et al. 1967; Woods, 1965).

Además, ya que los alimentos deben ser sometidos a tratamientos térmicos para asegurar su higienización y alargar su vida útil, el obtener anticuerpos frente a proteínas diana que han sido tratadas en condiciones similares a las de los alimentos en los que se pretende detectar su presencia suele mejorar su inmunodetección.



**Figura 2.** Rectas patrón obtenidas con los estándares de albúmina bovina sérica en PBS (●;  $r^2 = 0,987$ ), tampón borato 0,1 M, pH 8,0 (●;  $r^2 = 0,993$ ) y tampón borato 0,1 M, pH 9,0 (●;  $r^2 = 0,997$ ) mediante el test de BCA.

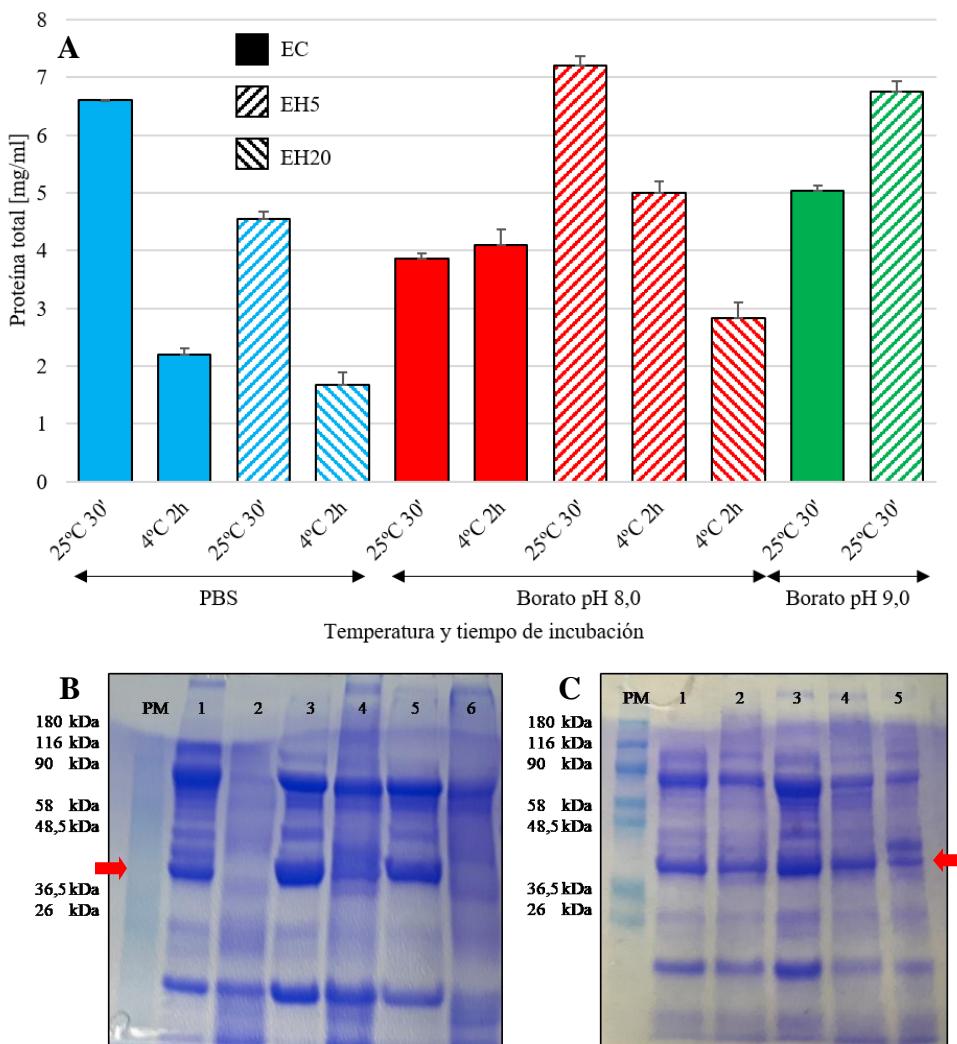
En las Figuras 3A, 3B y 3C se muestran los resultados obtenidos en la extracción de proteínas de langostino con exoesqueleto realizadas con tampones de diferente pH, diferentes temperaturas y tiempos de extracción, así como tras haber realizado o no un tratamiento térmico de 5 minutos antes de la centrifugación del extracto o de 20 minutos tras la misma.

Como se puede observar se obtuvo un rango de extracción de proteínas totales que varió de 1,68 a 7,2 mg/ml. Se ensayaron, por tanto, tres factores: el tiempo y temperatura de incubación, el hervido de los extractos y el propio tampón de extracción (pH y salinidad).

En primer lugar se observó que la extracción a 4°C durante 2 horas presentaba un menor rendimiento que la extracción a T<sup>a</sup> ambiente durante 30 min. Por otro lado, el hervido de los extractos de pH básico (tampones borato pH 8,0 y 9,0) durante 5 min produjo un incremento de la cantidad de proteína, lo que podría deberse a una desagregación de las proteínas debido al pH básico y la temperatura que, usualmente, podría haber liberado las proteínas termoestables “atrapadas”, quedando así solubilizadas. En la electroforesis de los extractos obtenidos (Figura 3C) se observa la presencia de tres bandas mayoritarias de aproximadamente 17, 37 y 75 kDa, correspondiendo la de 37 kDa a la tropomiosina, al igual que se ha observado previamente (Kamath et al., 2013).

Las condiciones de extracción en las que se solubilizó una mayor cantidad de proteína fueron utilizando un pH de 8,0 y realizando un tratamiento térmico de la muestra de 5 min. Por el contrario, el hervido durante 20 min de las muestras, en los tres tampones, redujo la cantidad de proteína extraída, hecho que se podría deber a que la cantidad de proteína en los sobrenadantes fuese menor que en el extracto completo por una agregación excesiva. En el caso del PBS, el hervido tanto durante 5 min como 20 minutos, redujo la cantidad de proteína de los extractos, posiblemente debido también a reacciones de agregación (Kamath et al. 2013).

A pesar de haberse obtenido en los extractos hervidos durante 5 min, una concentración de proteína aceptable utilizando los tampones ensayados, en la electroforesis de las muestras no se observa la banda de 37 kDa de la tropomiosina (tropomiosina) (Figura 3B), por lo cual se decidió realizar otro ensayo variando las condiciones de extracción (Figura 3C).



**Figura 3.** Concentración de proteínas totales determinada por la técnica de BCA (A) y SDS-electroforesis (B y C).

**A:** Extractos en PBS, tampón borato pH 8,0 y en tampón borato pH 9,0 NaCl 0,15 M. Los valores corresponden a la media +DS de dos extracciones, analizadas cada una por duplicado. **EC:** Extracto crudo. **EH5:** Extracto hervido 5 min. **EH20:** Extracto hervido 20 min.

**B:** Extractos incubados a **25°C durante 30 min.** **PM:** marcador de pesos moleculares.

**1:** Extracto crudo en PBS. **2:** Extracto hervido 5 min en PBS. **3:** Extracto crudo en tampón borato pH 8,0. **4:** Extracto en tampón borato pH 8,0 hervido 5 min. **5:** Extracto crudo en tampón borato pH 9,0. **6:** Extracto en tampón borato pH 9,0 hervido 5 min.

**C:** Extractos incubados a **4°C durante 2 h.** **PM:** marcador de pesos moleculares. **1:** Extracto crudo en PBS. **2:** Extracto en PBS hervido 20 min. **3:** Extracto en tampón borato pH 8,0. **4:** Extracto en tampón borato pH 8,0 hervido 20 min. **5:** Extracto en tampón borato pH 8,0 hervido 5 min.

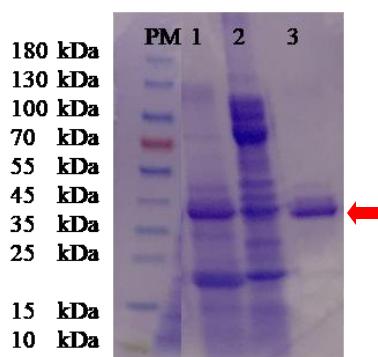
Las flechas señalan la banda correspondiente a la tropomiosina.

### **3.2. Purificación de tropomiosina.**

#### **3.2.1. Purificación mediante técnicas de precipitación.**

Se ha ensayado un protocolo de purificación a partir de langostino sin exoesqueleto, hervido 20 minutos previamente a la eliminación del mismo, basado en la utilización de técnicas de precipitación en presencia de un agente reductor, como el DTT. La utilización de este agente ha sido indicada en el estudio de Aki y Kodama (1995) en la purificación de tropomiosina recombinante con la finalidad de romper los agregados covalentes que eventualmente pudieran haberse formado entre la tropomiosina y otras proteínas musculares.

La Figura 4 muestra la fracción obtenida al final del proceso de purificación de una muestra de langostino sin exoesqueleto (3). Como puede observarse, la pureza de la tropomiosina en esta fracción es muy alta, ya que sólo se observa la presencia de algunas bandas de muy baja intensidad. Sin embargo, la cantidad de proteína purificada fue muy baja, al igual que indicaron Aki y Kodama (1995) quienes obtuvieron un rendimiento del 0,03%, y el proceso de purificación resultó largo y tedioso, lo que nos hizo descartar este protocolo de purificación de la tropomiosina.



**Figura 4. SDS-Electroforesis.** PM: Marcador de pesos moleculares. **1:** Extracto de langostino sin exoesqueleto, hervido. **2:** Extracto crudo de langostino con exoesqueleto. **3:** tropomiosina purificada. La flecha señala la banda correspondiente a la tropomiosina.

#### **3.2.2. Técnicas cromatográficas.**

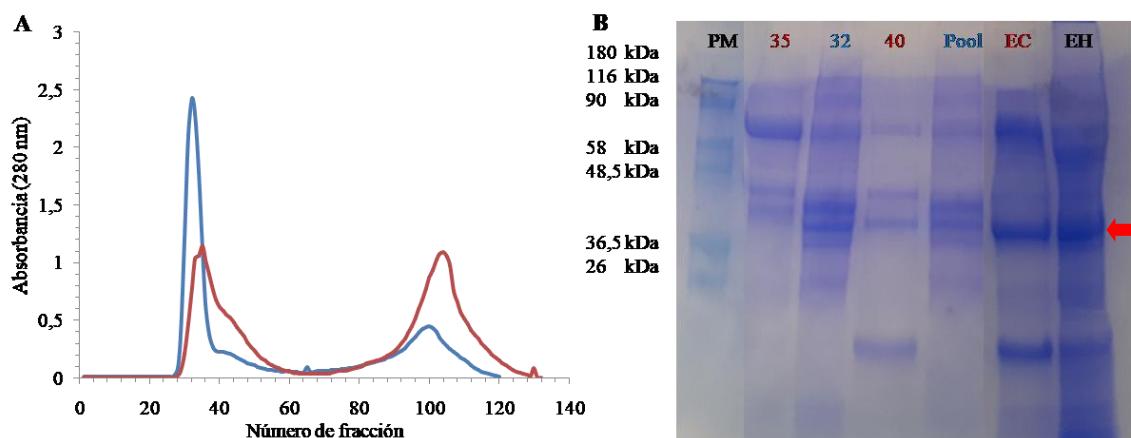
La purificación de tropomiosina se ha ensayado también utilizando dos técnicas cromatográficas de exclusión molecular de forma sucesiva.

### a) Cromatografía en Sephadex G-75.

Los extractos de langostino obtenidos a pH 8,0, hervidos o no durante 5 min, se aplicaron en una columna Sephadex G-75. Los perfiles cromatográficos obtenidos muestran 2 picos (Figura 5).

En el perfil de la muestra hervida durante cinco minutos se observa un primer pico mucho más definido y simétrico, así como un segundo pico minoritario en comparación con la muestra sin hervir. En el primer pico de la muestra de langostino hervido, correspondiente a las fracciones 25 a 40, eluye la tropomiosina y algunas proteínas de un peso molecular entre 58 y 90 kDa, como ya observaron Hoffman et al. (1981). Además, en la fracción 32 se observa también una banda mayor de 37 kDa que podría corresponder a la troponina T que se encuentra asociada a la tropomiosina (Eisenberg y Kielley, 1974; Greaser y Gergely, 1971) o a una isoforma de la tropomiosina.

En la fracción 40 del extracto crudo, que corresponde al hombro que acompaña al pico de la tropomiosina se observa una banda de bajo peso molecular (inferior a 26 KDa) que no se visualiza en el extracto hervido. En la electroforesis del segundo pico no se observaron bandas, por lo que podrían eluirse péptidos o pigmentos de bajo peso molecular. En vista a estos resultados, se decidió purificar la tropomiosina a partir del extracto hervido.

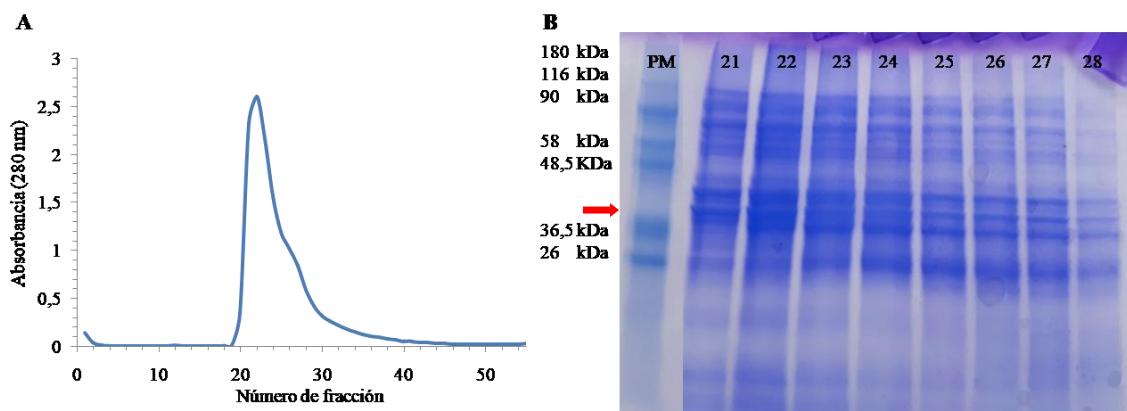


**Figura 5.** Perfil de la cromatografía en Sephadex G-75 (A) y SDS-electroforesis de las fracciones obtenidas en dicha cromatografía (B) de los extractos de langostino obtenidos con tampón borato pH 8,0 sin hervir (—) y hervido 5 min antes de la centrifugación (—). Los números de la electroforesis corresponden a las fracciones de las cromatografías y tienen su color correspondiente. La flecha señala la banda correspondiente a la tropomiosina.

**PM:** Marcador de pesos moleculares. **EC:** extracto crudo. **EH:** extracto hervido. **Pool:** fracciones 28 a 30 y 35 a 40 de la chromatografía del extracto hervido.

### b) Cromatografía en Sephadex S-200.

Las fracciones enriquecidas en tropomiosina (fracciones 30 a 36) de la cromatografía en Sephadex G-75 del extracto hervido se concentraron y se aplicaron a una columna de Sephadex S-200. El perfil de la cromatografía y la electroforesis de las fracciones obtenidas en la misma se muestran en la Figura 6. Como se puede observar, la cromatografía muestra un único pico con una pequeña cola y todas las fracciones tienen un perfil similar en la electroforesis, con varias bandas de diferentes pesos moleculares. Estos resultados indican que esta etapa de filtración en el gel Sephadex S-200 no aporta ninguna mejora en el proceso de purificación de la tropomiosina.

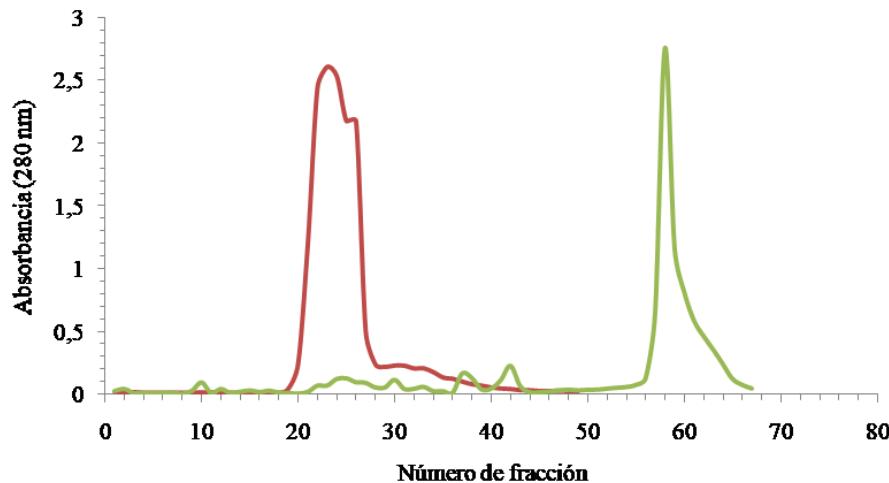


**Figura 6.** Perfil de la cromatografía en Sephadex S-200 (A) y SDS-electroforesis de las fracciones obtenidas en la misma de la muestra procedente de la cromatografía en Sephadex G-75 (B). Los números de la electroforesis corresponden a las fracciones de la cromatografía. **PM:** marcador de pesos moleculares. La flecha señala la banda correspondiente a la tropomiosina.

Con el objeto de conocer si un incremento de la fuerza iónica del medio podría aportar alguna mejora en la separación cromatográfica al disgregar los agregados no covalentes que eventualmente pudieran estar presentes en la muestra, se realizó la cromatografía añadiendo a la muestra y al tampón de elución NaCl o KCl a una concentración de 0,5 M. Los perfiles cromatográficos y electroforéticos obtenidos de sus fracciones fueron similares al obtenido sin NaCl (resultados no mostrados).

Ante estos resultados se consideró la posibilidad de que las proteínas del extracto pudiesen estar agregadas por interacciones más fuertes, por lo que se probó añadir a la muestra y al tampón de elución un 5% de ácido acético.

La Figura 7 muestra que en presencia de ácido acético se obtiene un único pico (fracciones 55 a 65) que eluye mucho más tarde que a pH neutro, lo que indica que las proteínas han interactuado con el gel. Al realizar la electroforesis de las fracciones del pico no se visualizaron bandas, lo que sugiere que la proteína habría quedado retenida en el gel.



**Figura 7.** Perfil de la cromatografía en Sephadex G-75 de la muestra procedente de la cromatografía en Sephadex G-75. La elución se realizó en ausencia (—) o en presencia de ácido acético al 5% (—).

### 3.2.3. Optimización de la purificación de tropomiosina.

Dado que partiendo de extracto de langostino que se había triturado con el exoesqueleto y al que se habían aplicado las etapas de cromatografía indicadas anteriormente, no se había conseguido obtener tropomiosina con un grado de pureza deseado ( $>75\%$ ), se procedió a trabajar con extractos a los que se les había eliminado previamente el exoesqueleto y a realizar la cromatografía en Sephadex G-75 en presencia de un agente quelante.

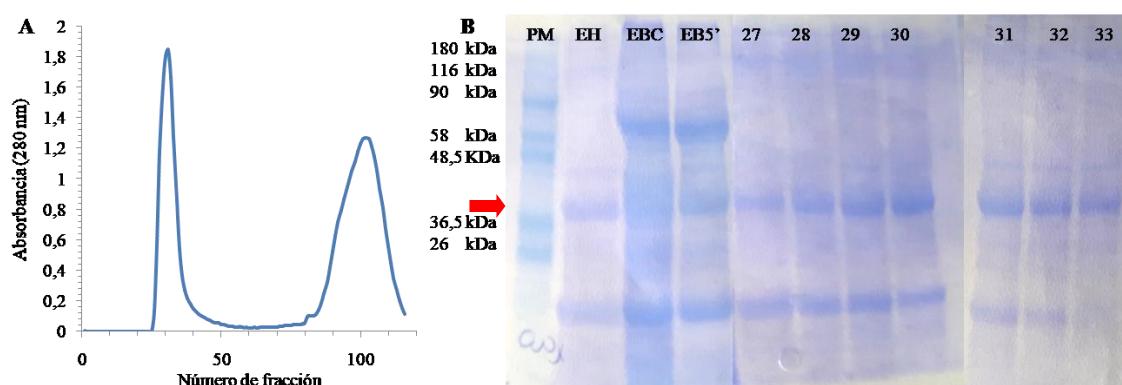
#### 3.2.3.1. Eliminación del exoesqueleto antes de la extracción.

Se preparó un extracto siguiendo el protocolo indicado anteriormente pero partiendo de una muestra de langostino cocido 20 min al que se le había retirado el exoesqueleto. El extracto se aplicó en una columna de Sephadex G75. En la Figura 8 se muestra la electroforesis de las fracciones purificadas, en la que se observa que los extractos con exoesqueleto contienen una banda de un peso molecular  $>58$  kDa, que desaparece en los extractos que no contienen el exoesqueleto.

La eliminación de algunas proteínas de peso molecular mayor al de la tropomiosina en las muestras de langostino en las que se había eliminado el exoesqueleto ha sido observado previamente (DeWitt et al., 2004; Hoffman et al., 1981; Kamath et al., 2013).

El perfil de esta cromatografía, así como la SDS-electroforesis de las fracciones obtenidas en la misma se muestra en la Figura 8. La cromatografía muestra dos picos, eluyéndose la tropomiosina en el primero (fracciones 27 a 33). El perfil electroforético de las fracciones del primer pico muestra la presencia de dos bandas mayoritarias, una que corresponde a la tropomiosina y la otra a una proteína de peso molecular menor de 26 kDa. Sin embargo, no se visualizan bandas de peso molecular mayor al de la tropomiosina, que si se observaban en el extracto preparado con el exoesqueleto, lo que sugiere que esas bandas contaminantes procedían del exoesqueleto del langostino.

Las fracciones 31 a 33, que presentaron una menor cantidad de la banda de peso molecular menor de 26 kDa, se recogieron conjuntamente y se concentraron.



**Figura 8.** Perfil de la cromatografía en Sephadex G-75 del extracto de langostino sin exoesqueleto obtenido con PBS (A) y SDS-electroforesis de las fracciones de la cromatografía (B). Los números de la electroforesis corresponden a las fracciones de la cromatografía. La flecha señala la banda correspondiente a la tropomiosina.

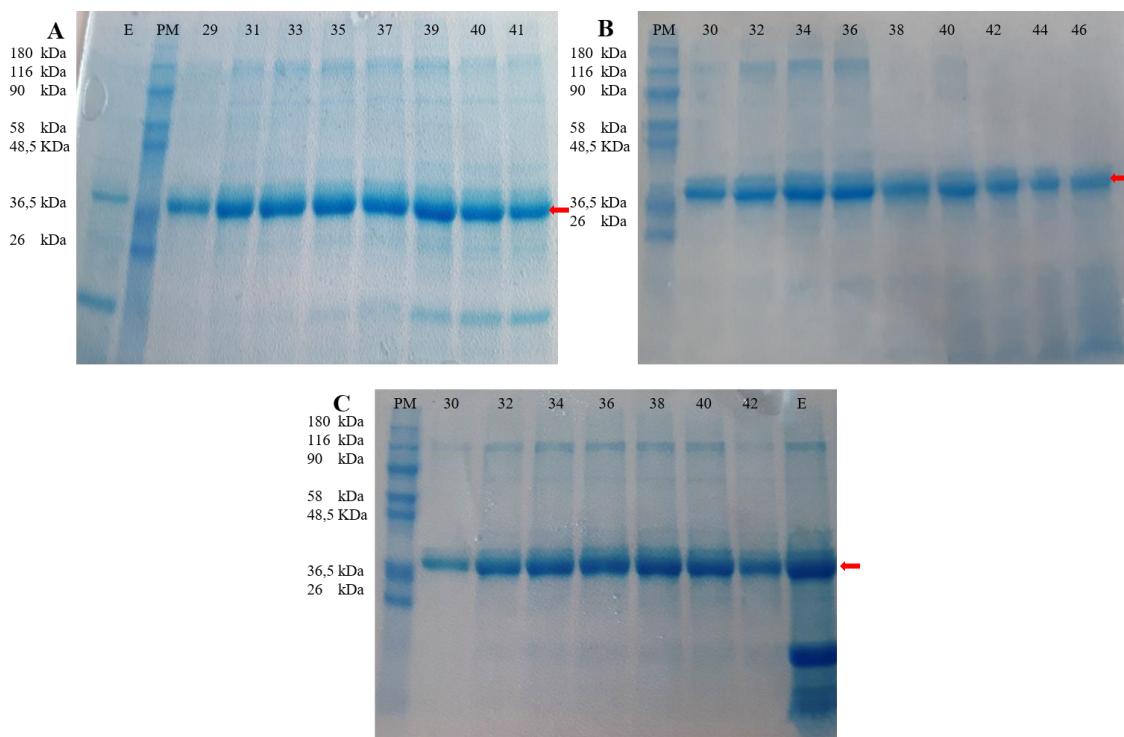
**PM:** Marcador de pesos moleculares. Muestra triturada sin exoesqueleto, extraída con PBS a 4°C y hervida 5 min (**EH**); Extracto crudo con exoesqueleto en tampón borato pH 8,0 sin calentar (**EBC**) o hervido durante 5 min (**EB5'**).

Aunque la pureza de la tropomiosina purificada sin exoesqueleto no era todavía la deseada (<75%), se procedió a inocular un conejo con la fracción obtenida en esta etapa.

### **3.2.3.2.Cromatografía en Sephadex G-75 en presencia de un agente quelante.**

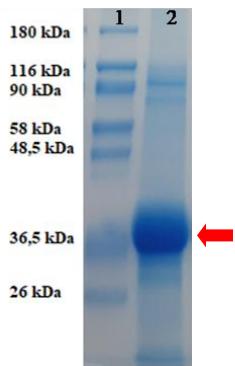
Atendiendo a la estructura y función de la tropomiosina en el músculo, es posible que las proteínas de bajo peso molecular que no se pueden eliminar en la chromatografía en Sephadex G-75, se deba a que se encuentren asociadas a la tropomiosina en el sarcómero (Eisenberg y Kielley, 1974). La función de la tropomiosina en el músculo es impedir que la actina se una a la miosina y así se produzca el ciclo de los puentes cruzados cuando no hay un impulso nervioso que lo ordene. El impulso nervioso desencadena la liberación al citosol del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado, que se une a la troponina. Al unirse el calcio a la troponina, se produce la separación de la tropomiosina de la actina comenzando el ciclo de contracción del sarcómero (Fitts, 2008). En presencia de calcio, la troponina permanece unida a la tropomiosina. En base a ello, se procedió a añadir EDTA (entre 1 y 10 mM) tanto a la muestra de langostino hervida, sin exoesqueleto, como al tampón de elución antes de realizar la chromatografía. De esa forma, al ser quelado el calcio por el EDTA, cabe esperar la disociación de la tropomiosina que estaba interaccionando con otras proteínas del sarcómero.

El perfil de la chromatografía en Sephadex G-75 realizada en presencia de las tres concentraciones de EDTA mostró la presencia de dos picos, encontrándose la tropomiosina en el primero (fracciones 25 a 45) (resultados no mostrados). El perfil electroforético de las fracciones obtenidas muestra como al incrementar la concentración de EDTA, se reduce el número y la intensidad de las bandas contaminantes de bajo peso molecular (<37 kDa) presentes en la fracción de tropomiosina (Figura 9).



**Figura 9.** SDS-electroforesis de las fracciones obtenidas en las cromatografías en Sephadex G-75 en presencia de EDTA 1 mM (A), 5 mM (B) y 10 mM (C). **PM:** marcador de pesos moleculares. **E:** extracto de langostino hervido, sin exoesqueleto. El resto de los números corresponden a las fracciones del primer pico de cada cromatografía. Las flechas señalan la banda correspondiente a la tropomiosina.

Estos resultados indican que la preparación del extracto de langostino al que se ha eliminado previamente el exoesqueleto y posteriormente se ha adicionado con EDTA a una concentración final de 10 mM antes de la cromatografía en Sephadex G-75 permite obtener tropomiosina con un alto grado de pureza (> 90%). En el proceso completo de purificación en estas condiciones se han obtenido aproximadamente 28 mg de tropomiosina (Figura 10). Esta proteína, con un mayor grado de pureza, se utilizará posteriormente a este trabajo, para preparar una columna de inmunoafinidad con la que purificar los anticuerpos específicos presentes en los antisueros de conejo.



**Figura 10. SDS-Electroforesis de la tropomiosina purificada.** 1: Marcador de pesos moleculares. 2: Tropomiosina purificada. La flecha señala la banda correspondiente a la tropomiosina.

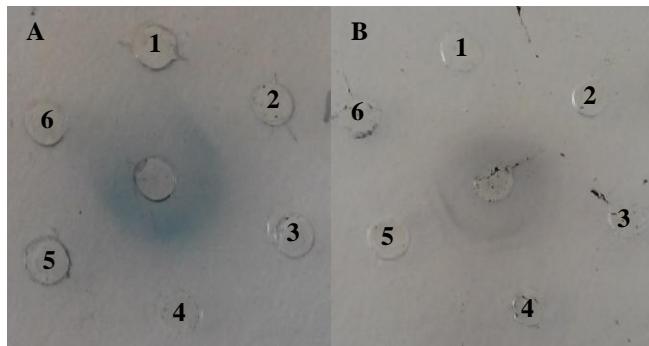
### 3.4. Caracterización del antisuero anti-tropomiosina.

Para caracterizar los antisueros anti-proteínas de langostino y anti-tropomiosina obtenidos se aplicaron técnicas de inmunodifusión doble y de ELISA no competitivo indirecto.

#### 3.4.1. Técnica de inmunodifusión doble.

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos en el análisis de los antisueros anti-proteínas de langostino y anti-tropomiosina, obtenidos ambos en la segunda extracción, frente a extractos de langostino y tropomiosina purificada, por la técnica de inmunodifusión doble. En esta técnica la presencia de un arco de precipitación entre el pocillo en el que se ha aplicado una muestra y el pocillo en el que se ha aplicado el antisuero indica la presencia en el mismo de anticuerpos frente a la/s proteína/s presente/s en la muestra. Como puede observarse, el antisuero anti-tropomiosina dio un resultado positivo frente a la tropomiosina a todas las concentraciones ensayadas (entre 1 y 15 µg de proteína total por pocillo). Sin embargo, no se observó banda de precipitación en el pocillo del extracto de langostino, probablemente debido a que no hay sensibilidad suficiente por la baja concentración de tropomiosina presente en dicho extracto. En el caso del antisuero anti-proteínas de langostino se observó la presencia de varias bandas, lo que indica, como era de esperar, que existen anticuerpos en el antisuero frente a varias proteínas del extracto. Además se observó un resultado positivo en los extractos de menor concentración (entre 1,3 y 5,3 µg) debido probablemente a

que las concentraciones altas se encuentran fuera del rango de la zona de equivalencia, en la que no se pueden formar precipitados por un exceso de antígeno.



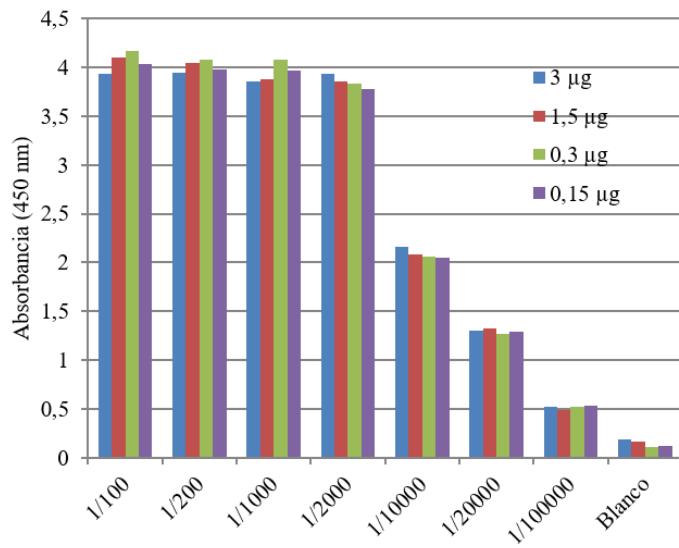
**Figura 11.** Inmunodifusión doble de;

- A. Antisuero anti-tropomiosina. Control negativo (Agua destilada) (1); tropomiosina 4 $\mu$ g (2), 10 $\mu$ g (3) 12 $\mu$ g (4), 15 $\mu$ g (5), extracto crudo de langostino (ECL) 58,3 $\mu$ g (6).
- B. Antisuero anti-proteínas de langostino. Extracto crudo de langostino 21,2 $\mu$ g (1); 10,6 $\mu$ g (2), 5,3 $\mu$ g (3) 2,7 $\mu$ g (4), 1,3 $\mu$ g (5), control negativo (agua destilada) (6).

Los números indican la cantidad de proteína total aplicada a los pocillos.

### 3.4.2. Técnica de ELISA no competitivo indirecto.

Esta técnica se ha utilizado para titular los antisueros obtenidos. Para ello, los pocillos tapizados con la proteína diana se ensayaron con diferentes diluciones del antisuero. En la Figura 12 se muestra la titulación del antisuero anti-tropomiosina utilizando pocillos tapizados con diferentes concentraciones de tropomiosina. Como puede observarse, la respuesta fue similar a todas las concentraciones de tropomiosina ensayadas y aumentó al disminuir la dilución del antisuero, alcanzándose saturación a diluciones de 1/2000 o menores. El título del antisuero anti-tropomiosina, que se define como la dilución con la que se obtiene la mitad de la absorbancia máxima, ha sido de 1/10.000.

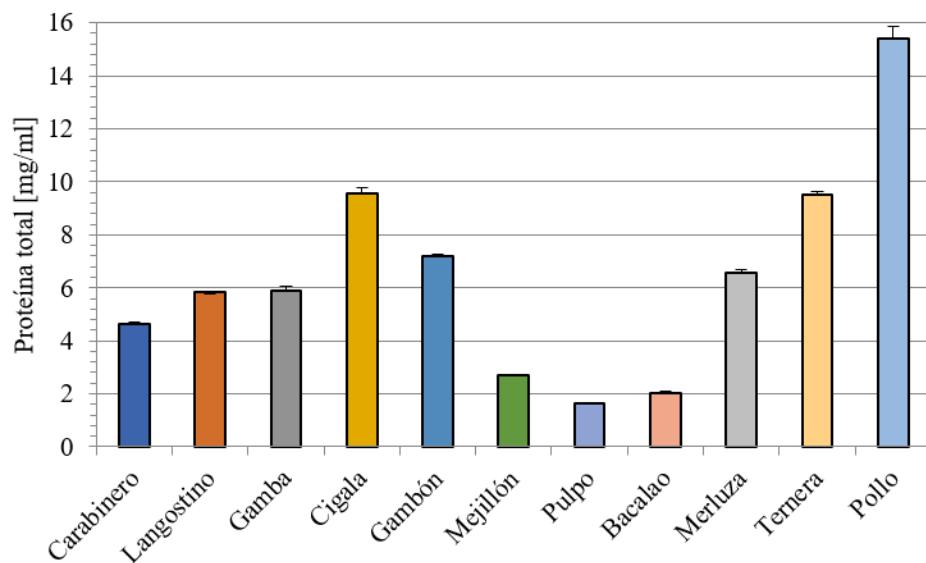


**Figura 12.** Titulación del antisuero anti-tropomiosina en pocillos tapizados con diferentes concentraciones de tropomiosina.

### 3.4.3. Reactividad con extractos de diferentes especies.

Para ensayar la reactividad cruzada de los antisueros, se obtuvieron extractos de diferentes especies de crustáceos, moluscos, pescados y carne, en los que se determinó previamente la concentración de proteína con el objeto de aplicar en todos los pocillos la misma cantidad de proteína.

La Figura 13 muestra la concentración de proteína de los extractos determinada por la técnica de BCA. Los extractos de carne de ternera y pollo fueron los que mostraron una mayor cantidad de proteína (9,53 y 13,42 mg/ml respectivamente) mientras que las muestras de mejillón, bacalao y pulpo fueron las de menor contenido proteico (1,66 a 2,74 mg/ml). En el caso de los crustáceos, la concentración de proteína varió entre 4,64 mg/ml (carabinero) y 10,12 mg/ml (cigala).



**Figura 13.** Concentración de proteína en extractos crudos de diferentes especies animales. El valor corresponde a la media +DS de dos extracciones, analizadas cada una por duplicado.

Para determinar la reactividad del antisuero anti-tropomiosina con los extractos de otras especies se han utilizado las técnicas de inmunodifusión doble y de ELISA de tipo competitivo indirecto con pocillos tapizados con tropomiosina.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos por la técnica de inmunodifusión doble. Como puede observarse, el suero anti-proteínas de langostino no fue capaz de reconocer el extracto de langostino hervido 5 min. Además, este antisuero tampoco reaccionó con los extractos de otros crustáceos como gamba, gambón, cigala o carabinero.

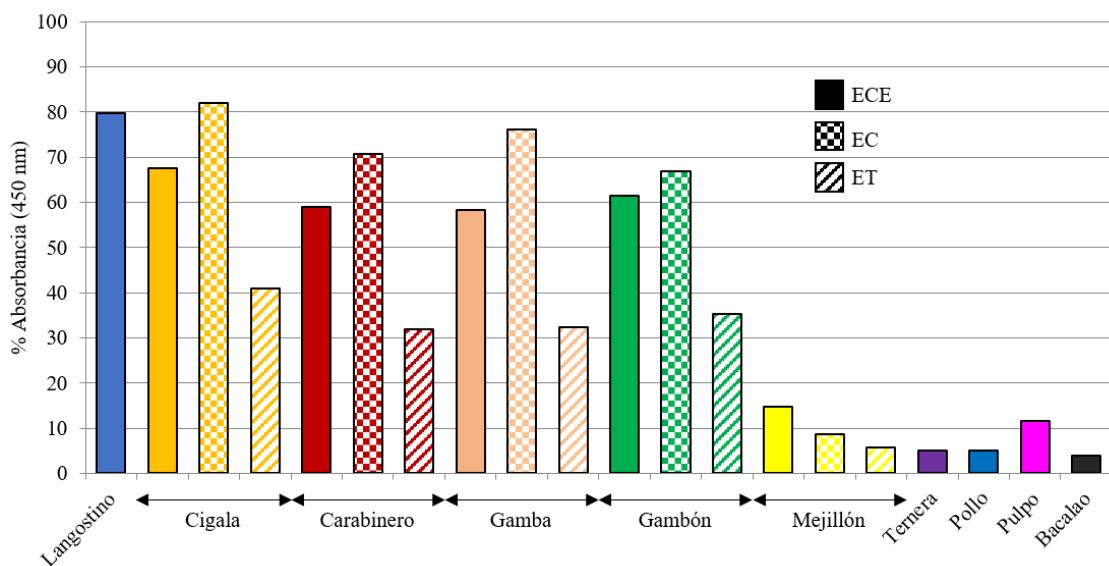
Por el contrario, el antisuero anti-tropomiosina fue capaz de detectar el extracto de langostino hervido y el extracto crudo de cigala aunque no el de gamba y gambón. Para ninguno de los dos antisueros se observó reacción cruzada frente a los extractos de moluscos, pescado o carne.

**Tabla 2.** Resultados de la inmunodifusión doble obtenidos con los antisueros anti-proteínas de langostino (L) y anti-tropomiosina (T) frente a tropomiosina, extracto de langostino hervido y extractos de diferentes especies crudos (C) o hervidos (H).

-: resultado negativo. +: resultado positivo. ±: resultado dudoso. NA: no analizado.

Muestra:	Antisuero		Muestra:	Antisuero	
	L	T		L	T
Langostino (H)	NA	+	Pulpo (C) 33 µg	-	-
Gamba (C) 59 µg	-	±	Pulpo (H)	NA	-
Gamba (H)	NA	-	Pollo (C) 154 µg	-	-
Gambón (C) 72 µg	-	-	Pollo (H)	NA	-
Gambón (H)	NA	-	Ternera (C) 95 µg	-	-
Carabinero (C) 46 µg	±	-	Ternera (H)	NA	-
Carabinero (H)	NA	+	Bacalao (C) 41 µg	-	-
Cigala (C) 96 µg	-	+	Bacalao (H)	NA	-
Cigala(H)	NA	-	Merluza (C) 66 µg	-	-
Mejillón (C) 54 µg	-	-	Merluza (H)	NA	-
Mejillón (H)	NA	-			

En la Figura 14 se muestra la reactividad del antisuero anti-tropomiosina con los extractos de diferentes especies por la técnica de ELISA de tipo no competitivo indirecto. Los resultados indican que el antisuero muestra una alta reactividad (55-85%) con los extractos crudos de todas las especies de crustáceos ensayadas, siendo mayor para los extractos procedentes únicamente de músculo, puesto que la tropomiosina se encuentra en mayor proporción que en los extractos con exoesqueleto. Sin embargo, la reactividad es menor en los extractos tratados térmicamente, hecho que se debe probablemente a la desnaturización y/o agregación de la proteína diana, que por una parte disminuyen su solubilidad y por lo tanto dificultan su extracción y por otra parte producen la pérdida o enmascaramiento de algunos epítopos que son reconocidos por los anticuerpos (Hoffman et al., 1981). Por el contrario, la reactividad del antisuero es menor del 15% con los extractos crudos de mejillón, bacalao, ternera y pollo.



**Figura 14.** Reactividad del antisuero anti-tropomiosina con los extractos de diferentes especies mediante la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto. Todos los extractos se ensayaron a una cantidad total de 3 µg. Los resultados se expresan en porcentaje de reactividad respecto a la reacción con la tropomiosina purificada (100%).

**ECE:** extracto crudo con exoesqueleto; **EC:** extracto crudo sin exoesqueleto;

**ET:** extracto hervido sin exoesqueleto.

Los resultados obtenidos indican que con las dos técnicas ensayadas, el antisuero anti-tropomiosina presenta una alta especificidad para detectar especies de crustáceos, no mostrando reacción cruzada con extractos de otras especies animales. Así, utilizando la técnica de inmunodifusión doble, el antisuero anti-tropomiosina resultaría adecuado para detectar la presencia de langostino y cigala en alimentos crudos así como de langostino en alimentos tratados térmicamente. Si se utilizara la técnica de ELISA de tipo competitivo indirecto y el mismo antisuero, se podría detectar la presencia de todas las especies de crustáceos ensayadas, en alimentos tratados o no térmicamente, aunque en los procesados la reactividad sería menor.

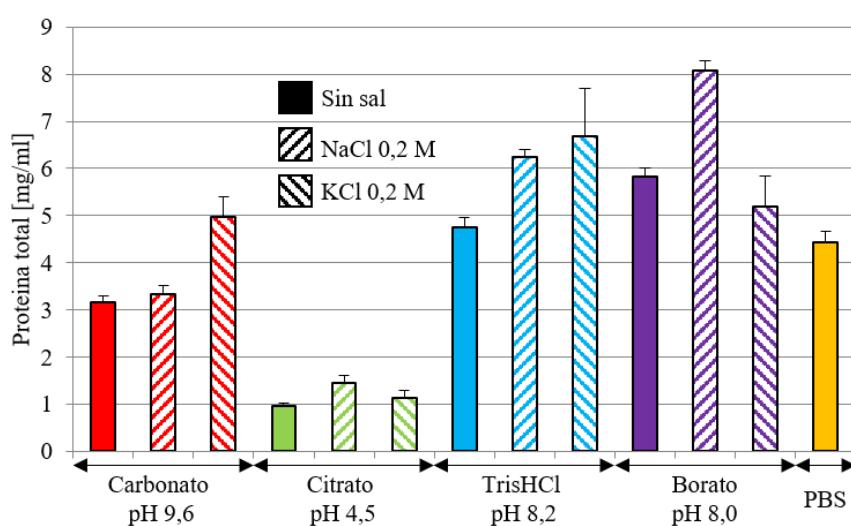
Por otra parte, dada la alta sensibilidad de la técnica de ELISA se espera que permitiese detectar la presencia de pequeñas cantidades de proteína de crustáceos, del orden de µg/g, por lo que resultaría adecuada para ser utilizada tanto en el control de calidad en la industria alimentaria como por los organismos oficiales para asegurar un correcto etiquetado de los alimentos de acuerdo a la legislación vigente de alérgenos alimentarios. Todo ello redundaría en una mayor seguridad para proteger a los individuos alérgicos a los crustáceos.

### 3.5. Optimización de las condiciones de extracción

Uno de los retos a los que se enfrenta la detección de alérgenos en alimentos es optimizar el proceso de extracción para que resulte eficiente y reproducible. Esta etapa de extracción debe ser capaz de solubilizar la mayor cantidad posible de la proteína diana y por otra parte debe de ser compatible con la reacción que se ha de establecer entre dicha proteína y sus anticuerpos específicos. Por ello, en este trabajo se han ensayado tampones de extracción de diferente composición y pH con el objeto de seleccionar el que resulte más efectivo para extraer las proteínas de crustáceo.

En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos con los tampones ensayados. La cantidad de proteína extraída, determinada por la técnica de BCA, ha variado entre 0,97 y 8,06 mg/ml, obteniéndose los mejores resultados con PBS, Tris-HCl y borato, siendo con el tampón borato pH 8,0, NaCl 0,2 M el que se consiguió extraer la mayor cantidad de proteína. La adición de las dos sales mejoró el rendimiento de la extracción.

Estos resultados preliminares servirán como base para optimizar otras condiciones de la extracción como temperatura y tiempo de incubación, intensidad de agitación, así como la adición a los tampones de agentes desnaturalizantes (SDS, compuestos reductores o detergentes, entre otros) que mejoren la extracción de proteínas. Posteriormente, será necesario comprobar que la composición de los tampones que resultan más eficientes para la extracción, no dificultan la reacción entre la proteína diana y sus anticuerpos específicos.



**Figura 15.** Concentración de proteína determinada por la técnica de BCA de los extractos de langostino obtenidos con diferentes tampones. Los resultados muestran la media +DS de dos extracciones, analizada cada una por duplicado.

#### **4. Conclusiones:**

1. Las condiciones óptimas para la extracción de la tropomiosina de langostino para su posterior purificación requieren previamente la cocción del langostino y la eliminación del exoesqueleto. El tampón óptimo para la extracción es borato a pH 8,0.
2. La purificación de la tropomiosina mediante técnicas de precipitación isoeléctrica y salina en presencia de un agente reductor proporciona un alto grado de pureza pero el proceso resulta largo, tedioso y de muy bajo rendimiento.
3. La purificación de la tropomiosina mediante una cromatografía en Sephadex G-75 del extracto de langostino hervido proporciona un mayor rendimiento, pero un menor grado de pureza que utilizando técnicas de precipitación. El grado de pureza puede aumentarse si se incluye EDTA a una concentración de 10 mM en el tampón de elución como agente quelante.
4. Los antisueros anti-tropomiosina obtenidos presentan un alto título y reconocen la proteína en extractos de langostino crudo y tratado térmicamente. Además, los antisueros muestran una alta reactividad con extractos de otras especies de crustáceos pero no con los de moluscos, pescados y carne, por lo que podrían ser usados para detectar la presencia de crustáceos en alimentos procesados.

## 5. Bibliografía.

- Abdel Rahman , A. M., Kamath, S. D., Gagné , S., Lopata, A. L., & Helleur, R. (2013). Comprehensive proteomics approach in characterizing and quantifying allergenic proteins from northern shrimp: toward better occupational asthma prevention. *Journal of proteome research*, 12 (2), 647-656.
- Abramovitch, J. B., Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Rolland, J. M. (2017). Effect of thermal processing on T cell reactivity of shellfish allergens-Discordance with IgE reactivity. *PloS one*, 12 (3), e0173549.
- AESAN, M. D. C. C. (2007). Informe del Comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias. *Revista del Comité Científico*, 5 (5), 1-61.
- Aki, T., Kodama, T., Fujikawa, A., Miura, K., Shigeta, S., Wada, T. et al., (1995). Immunochemical characterization of recombinant and native tropomyosins as a new allergen from the house dust mite, *Dermatophagoides farinae*. *Journal of allergy and clinical immunology*, 96 (1), 74-83.
- Alvarez-Cuesta, E., Bousquet, J., Canonica, G. W., Durham, S. R., Malling, H. J., & Valovirta, E. (2006). Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 61 (s82), 1-3.
- Amsen, D., Spilianakis, C. G., & Flavell, R. A. (2009). How are TH1 and TH2 effector cells made?. *Current Opinion in Immunology*, 21 (2), 153-160.
- Asturias, J. A., Gómez-Bayón, N., Arilla, M. C., Martínez, A., Palacios, R., Sánchez-Gascón, F., & Martínez, J. (1999). Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. *The Journal of Immunology*, 162 (7), 4342-4348.
- Ayuso, R., Reese, G., Leong-Kee, S., Plante, M., & Lehrer, S. B. (2002). Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *International Archives of Allergy and Immunology*, 129 (1), 38-48.
- Bailey, G. S. (1996). Ouchterlony double immunodiffusion. In *The protein protocols handbook* (pp. 749-752). Humana press.
- Barletta, B., Butteroni, C., Puggioni, E. M. R., Iacovacci, P., Afferni, C., Tinghino, R. et al., (2005). Immunological characterization of a recombinant

tropomyosin from a new indoor source, *Lepisma saccharina*. *Clinical & Experimental Allergy*, 35 (4), 483-489.

Bock, S. A., & Atkins, F. M. (1990). Patterns of food hypersensitivity during sixteen years of double-blind, placebo-controlled food challenges. *The Journal of Pediatrics*, 117 (4), 561-567.

Borrego, J. T., Cuevas, J. M., & García, J. T. (2003). Reactividad cruzada entre pescados y mariscos. *Allergologia et Immunopathologia*, 31 (3), 146-151.

Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., Wood, R. A. et al., (2011). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: summary of the NIAID-sponsored expert panel report. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 64 (1), 175-192.

Brzezinski, J. L. (2005). Detection of crustacean DNA and species identification using a PCR-restriction fragment length polymorphism method. *Journal of Food Protection*, 68 (9), 1866-1873.

Buchanan, A. D., Green, T. D., Jones, S. M., Scurlock, A. M., Christie, L., Althage, K. A. et al., (2007). Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119 (1), 199-205.

Cardona, V., Guilarte, M., & Luengo, O. (2006). Alergia a alimentos. *Medicina Clínica*, 126 (11), 424-430.

Chehade, M., & Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115 (1), 3-12.

Chen, H. L., Cao, M. J., Cai, Q. F., Su, W. J., Mao, H. Y., & Liu, G. M. (2013). Purification and characterisation of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food Chemistry*, 139 (1-4), 213-223.

DeWitt, Å. M., Mattsson, L., Lauer, I., Reese, G., & Lidholm, J. (2004). Recombinant tropomyosin from *Penaeus aztecus* (rPen a 1) for measurement of specific immune-globulin E antibodies relevant in food allergy to crustaceans and other invertebrates. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48 (5), 370-379.

Diario oficial de la Unión Europea (2011). *Reglamento (UE) nº 1169/2011, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) nº 1924/2006 y (CE) nº 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del*

Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE (Vol. 304, pp. 18-62) y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) nº 608/2004 de la Comisión. DOUE 2013.

Eisenberg, E., & Kielley, W. W. (1974). Troponin-tropomyosin complex column chromatographic separation and activity of the three active troponin components with and without tropomyosin present. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (15), 4742-4748.

Fitts, R. H. (2008). The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. *Journal of Applied Physiology*, 104 (2), 551-558.

Gauvreau, G. M., El-Gammal, A. I., & O'Byrne, P. M. (2015). Allergen-induced airway responses. *European Respiratory Journal*, 46 (3), 819-831.

Greaser, M. L., & Gergely, J. (1971). Reconstitution of troponin activity from three protein components. *Journal of Biological Chemistry*, 246 (13), 4226-4233.

Greaser, M. L., Yamaguchi, M., Brekke, C., Potter, J., & Gergely, J. (1973, January). Troponin subunits and their interactions. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 37, pp. 235-244). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Guandalini, S., & Newland, C. (2011). Differentiating food allergies from food intolerances. *Current Gastroenterology Reports*, 13 (5), 426.

Hoffman, D. R., Day Jr, E. D., & Miller, J. S. (1981). The major heat stable allergen of shrimp. *Annals of Allergy*, 47 (1), 17-22.

Itoh, N., Itagaki, Y., & Kurihara, K. (2010). Rush specific oral tolerance induction in school-age children with severe egg allergy: one year follow up. *Allergology International*, 59 (1), 43-51.

Jeebhay, M. F., & Lopata, A. L. (2012). Occupational allergies in seafood-processing workers. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 66, pp. 47-73). Academic Press.

Jeebhay, M. F., Robins, T. G., Lehrer, S. B., & Lopata, A. L. (2001). Occupational seafood allergy: a review. *Occupational and Environmental Medicine*, 58 (9), 553-562.

Jeoung, B. J., Reese, G., Hauck, P., Oliver, J. B., Daul, C. B., & Lehrer, S. B. (1997). Quantification of the major brown shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) by a monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100 (2), 229-234.

Kamath, S. D., Rahman, A. M. A., Komoda, T., & Lopata, A. L. (2013). Impact of heat processing on the detection of the major shellfish allergen tropomyosin in crustaceans and molluscs using specific monoclonal antibodies. *Food Chemistry*, 141 (4), 4031-4039.

Liu, R., Holck, A. L., Yang, E., Liu, C., & Xue, W. (2013). Tropomyosin from tilapia (*Oreochromis mossambicus*) as an allergen. *Clinical & Experimental Allergy*, 43 (3), 365-377.

Lopata, A. L., & Lehrer, S. B. (2009). New insights into seafood allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 9 (3), 270-277.

Lopata, A. L., Kleine-Tebbe, J., & Kamath, S. D. (2016). Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy. *Allergo Journal*, 25 (7), 24-32.

Lopata, A. L., O'hehir, R. E., & Lehrer, S. B. (2010). Shellfish allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 40 (6), 850-858.

Miegel, A., Kobayashi, T., & Maéda, Y. (1992). Isolation, purification and partial characterization of tropomyosin and troponin subunits from the lobster tail muscle. *Journal of Muscle Research and cell motility*, 13(6), 608-618.

Monaci, L., & Visconti, A. (2010). Immunochemical and DNA-based methods in food allergen analysis and quality assurance perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (6), 272-283.

Olander, J., Emerson, M. F., & Holtzer, A. (1967). Dissociation and reassociation of the poly-peptide chains of tropomyosin and paramyosin. *Journal of the American Chemical Society*, 89 (12), 3058-3059.

Poms, R. E., Anklam, E., & Kuhn, M. (2004). Polymerase chain reaction techniques for food allergen detection. *Journal of AOAC International*, 87 (6), 1391-1397.

Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183 (4676), 1657-1659.

Rahman, A. M. A., Helleur, R. J., Jeebhay, M. F., & Lopata, A. L. (2012). *Characterization of seafood proteins causing allergic diseases* (pp. 107-140). InTech.

Rajan, T. V. (2003). The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *TRENDS in Immunology*, 24 (7), 376-379.

Reese, G., Ayuso, R., & Lehrer, S. B. (1999). Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen. *International archives of allergy and immunology*, 119 (4), 247-258.

Reese, G., Viebranz, J., Leong-Kee, S. M., Plante, M., Lauer, I., Rando, S. et al., (2005). Reduced allergenic potency of VR9-1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin). *The Journal of Immunology*, 175 (12), 8354-8364.

Sampath, V., Tupa, D., Graham, M. T., Chatila, T. A., Spergel, J. M., & Nadeau, K. C. (2017). Deciphering the black box of food allergy mechanisms. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 118 (1), 21-27.

Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., & Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395 (1), 69-81.

Shanti, K. N., Martin, B. M., Nagpal, S., Metcalfe, D. D., & Rao, P. V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *The Journal of Immunology*, 151 (10), 5354-5363.

Skripak, J. M., Nash, S. D., Rowley, H., Brereton, N. H., Oh, S., Hamilton, R. G. et al., (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122 (6), 1154-1160.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. et al., (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.

Van Herwijnen, R., & Baumgartner, S. (2006). The use of lateral flow devices to detect food allergens. In *Detecting Allergens in Food* (pp. 175-181). Elsevier.

Witteman, A. M., Akkerdaas, J. H., van Leeuwen, J., van der Zee, J. S., & Aalberse, R. C. (1994). Identification of a cross-reactive allergen (presumably tropomyosin) in shrimp, mite and insects. *International Archives of Allergy and Immunology*, 105 (1), 56-61.

Woods, E. F. (1965). Peptide chains of tropomyosin. *Nature*, 207 (4992), 82-83.

Yolken, R. H. (1978). ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. *Hospital Practice*, 13 (12), 121-127.