

Detección de los alérgenos principales de la soya en diferentes matrices alimentarias.

Reyes-Farfán S.¹, Santellán-Olea M.R.², Luna-Suárez S.¹

¹Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México. Ex Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5 Tlaxcala. C.P. 90700, México, Centro. 90700 Tlax. * silvials2004@yahoo.com.mx.

²Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla. Edificio IC 10. Ciudad Universitaria, Colonia San Manuel, C.P. 72570. Puebla, Puebla México

RESUMEN

Los alimentos son esenciales para el desarrollo de los humanos ya que provee de los nutrimentos necesarios para el desarrollo, entre ellos las proteínas cobran especial interés debido a sus variadas funciones, una de ellas es que funcionan como moléculas de reconocimiento, en este sentido, el sistema inmunológico tiene la capacidad de reconocer algunas proteínas de algunos alimentos y montar una respuesta alérgica, conocida como hipersensibilidad. La hipersensibilidad es una reacción exacerbada del sistema inmunológico ante un agente que en condiciones generales es inocuo. La soya es un alimento ampliamente utilizado en diferentes alimentos gracias a sus propiedades fisicoquímicas, consta de 4 fracciones, que se clasifican según sus propiedades de sedimentación: 2S, 7S, 11S y 15S, de las cuales 2S y 11S se consideran los alérgenos principales debido a las propiedades moleculares de sus componentes proteicos. En este trabajo se hizo la producción de anticuerpos policlonales [anti-glicinina (11S) y anti-albumina 2S de soya] y se evaluó la detección de las proteínas provenientes de la soya por medio de los métodos ELISA y Western Blot en diferentes alimentos. Se logró la detección de los alérgenos en la semilla de soya, la soya texturizada, chorizo y en menor medida en atún.

Palabras clave: Alérgeno, anticuerpo, soya, albumina 2S, glicinina

ABSTRACT

Food is essential for the development of humans since they provide the necessary nutrients for development, among them, proteins are of special interest due to their various functions, one of them is that they function as recognition molecules, in this sense, the immune system has the ability to recognize some proteins in some foods and mount an allergic response, known as hypersensitivity. Hypersensitivity is an exacerbated reaction of the immune system to an agent that is generally harmless. Soybean is a food widely used completely or partially in different foods thanks to its physicochemical properties, it consists of 4 fractions, which are classified according to their sedimentation properties: 2S, 7S, 11S and 15S, of which 2S and 11S are considered the allergens due to the molecular properties of its protein components. In this work, the production of polyclonal antibodies [anti-glycinin (11S) and anti-2S soy albumin] was carried out and the detection of proteins from soy was evaluated by means of ELISA and Western Blot methods in different foods. The detection of allergens in soybeans, textured soybeans, chorizo and to a lesser extent in tuna was found.

Keywords: Allergen, antibody, soy, albumin 2S, glycinin

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la alergia por alimentos ha cobrado especial interés ya que se considera un problema de salud sustancial en países desarrollados, estando en seguida de problemas de salud como la rinitis alérgica y el asma, ya que han aumentado su prevalencia a partir de los últimos años del siglo XX¹, afectando alrededor de mil millones de personas en todo el mundo y se pronostica que su prevalencia esté alrededor de los 4 millones para el año 2050². El sistema inmunológico distingue en el cuerpo lo que es propio de lo que es extraño a él, y representa protección al cuerpo frente a organismos patógenos, esto mediante la activación de una respuesta inmunológica que coordina la actuación de los componentes humorales y celulares del sistema inmunológico. Una reacción alérgica o hipersensibilidad es considerada como una respuesta inapropiada del sistema inmunológico ante un agente que es inocuo y que no debería representar un peligro para el cuerpo humano, y éste producirá lesiones en diversos tejidos. La hipersensibilidad se puede clasificar en cuatro tipos, diferenciados específicamente por sus mecanismos de reacción, donde; la hipersensibilidad tipo I se considera como inmediata en la que se producen anticuerpos IgE que provocaran dilatación vascular, edema, contracción del musculo liso, producción de moco, lesión tisular e inflamación³.

La comida es esencial para la vida y es importante para la identidad cultural⁴, 170 alimentos representan una importante fuente de antígeno para desencadenar una reacción alérgica⁵. Dentro de estos alimentos resaltan algunos de mayor importancia y de los cuales la aparición de las reacciones alérgicas varía con la edad, en este sentido resulta importante destacar a la soya, debido a que en la actualidad la soya es ocupada en diferentes alimentos gracias a su versatilidad y propiedades funcionales, entre las cuales encontramos la capacidad de retención de agua que da viscosidad a los alimentos, las interacciones entre proteína y proteína mediante la cual es posible hacer geles, así como la capacidad espumante y emulsificante⁴. La soya principalmente consta de 4 fracciones de globulinas, que se clasifican según sus propiedades de sedimentación: 2S, 7S, 11S y 15S. Aproximadamente el 70-80% de la proteína de almacenamiento está constituida por 2 fracciones de proteína: β -conglucina y la glicina, la primera tiene un coeficiente de sedimentación de 7S, mientras que la segunda tiene un coeficiente de sedimentación es de 11S, es un hexámero con una masa molecular de entre 300 y 380 kDa, la proteína está compuesta por seis subunidades de las cuales cada una tiene una cadena ácida con pesos moleculares entre los 35 kDa y cadenas básicas de pesos moleculares entre los 20 kDa que se encuentran unidos mediante un único puente disulfuro^{6,7}. Fukushima *et al.*, (2011) mencionan que uno de los principales alérgenos de este alimento es la subunidad Gly m BD 30 K, así como la albumina 2S que es una proteína de bajo peso molecular, ha sido investigada por sus estructuras y propiedades. Se encontró que la fracción 2S de proteína de soya exhibe una alta hidrofobicidad superficial y una buena flexibilidad de cadena, lo que le proporciona mejores propiedades de formación de espuma y emulsificación en comparación a las otras dos fracciones moleculares⁸. La fracción 2S también ha sido reportado como inhibidor de tripsina, que se usa en biomedicina⁹, industrias biológicas, y alimentarias^{10,11}. Sin embargo, la investigación sobre 2S, no es tan extensa como el de las otras dos fracciones (7S, 11S). Esta proteína está formada por dos subunidades una entre 3 y 5 kDa y la otra entre 8 y 12 kDa, estas dos subunidades son codificadas de un ARN mensajero del cual se produce un péptido bioactivo¹².

Es por ello que este trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar las fracciones 11S y 2S, la subunidad Gly m BD 30 K de la fracción 11S y la albúmina 2S como principales alérgenos de la soya, en diferentes matrices alimentarias, mediante técnicas inmunológicas, debido a que actualmente existen pocas investigaciones en México referentes a la evaluación de estos alérgenos en matrices alimentarias en el contexto cultural del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de inmunógeno.

Se prepararon anticuerpos contra las dos proteínas de interés, la glicinina obtenida de la semilla de soya, y la albúmina 2S de soya recombinante purificada en el grupo de trabajo Jara *et al.*, (2017)¹³.

Esquema de inmunización

Se inmunizó a conejos machos de la raza New Zeland de 6 semanas de edad, bajo el siguiente esquema de inmunización que consistió en cinco inoculaciones con siete días de intervalo cada una. La inmunización se realizó por vía intradérmica en distintos lugares del dorso del huésped e intramuscular en la pata inferior derecha con 0.5 mL del extracto crudo de proteínas (1 mg/mL) y 0.5 mL de adyuvante completo de Freund (ACF) en la primera inoculación; las cuatro inoculaciones posteriores se hicieron con adyuvante incompleto de Freund (AIF), a la misma proporción con un volumen final de 0.5 mL de emulsión.

Sacrificio del huésped y recolección de anticuerpos

Al finalizar el programa de inmunización se realizó el sangrado completo del huésped y la sangre se recolectó en tubos de ensayo; posteriormente, se incubó a 37°C durante 45 minutos para permitir la formación del coágulo y se centrifugó durante 10 minutos a 4.000 rpm a 4°C. El suero se dividió en alícuotas de 1.5 ml cada una y se guardó a 4°C hasta su uso.

Extracción de proteínas de interés de matrices alimentarias

Se prepararon las muestras de matrices alimentarias, para esto se pesaron 250 mg de las diferentes matrices alimentarias y se añadieron 500 µL de buffer Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, se agitó en vortex, se centrifugó, se separó el sobrenadante en un nuevo tubo, y se congeló hasta su uso. Posteriormente se verificó la presencia de las proteínas mediante el método de Bradford, se llevó a cabo la separación de proteínas por electroforesis SDS-PAGE con un gel de poliacrilamida al 12% y se compararon con un marcador molecular.

Detección de las proteínas mediante Western blot.

Se realizó la separación electroforética, posteriormente se hizo la transferencia a 50 V por una hora utilizando el método húmedo, Se utilizó el primer anticuerpo en una dilución 1:5000 en buffer TTBS, el anticuerpo secundario fue anti-conejo unido a la fosfatasa alcalina (1:3000). Se reveló la membrana utilizando BCIP y NBT, se detuvo la reacción con agua, se dejó secar la membrana y se fotodocumentó.

Detección de las proteínas por el método ELISA

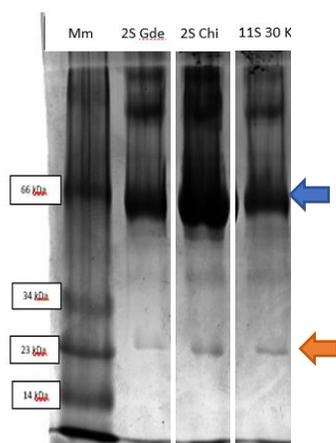
Se agregaron 100 µl de la extracción de proteínas en los pocillos de la placa de ELISA, cada muestra por triplicado. Se incubaron las muestras en los pocillos a 4°C durante toda la noche, se lavó tres veces con buffer TPBS, se bloqueó la placa con 200 µL por pocillo con leche descremada al 5% en buffer TPBS durante una hora a temperatura ambiente. Se repitió el procedimiento de lavado tres veces. Posteriormente se añadió 100 µl de anticuerpo primario, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, se repitió el procedimiento de lavado tres veces. Se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con agitación suave, se lavó con TPBS y PBS. Por último, se agregaron 100 µl de sustrato p-NPP, se incubó durante 30 minutos en oscuridad, transcurrido este tiempo se realizó la lectura a 405 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de los anticuerpos

Se cuantificó la proteína de los inmunosueros de anti-albúmina 2S y anti-glicinina, mediante el método de Bradford (los resultados se muestran en la tabla 1). Se sometieron a SDS-PAGE usando un gel de concentración de acrilamida al 10%, se mostró la presencia de las inmunoglobulinas, con base a la conformación de la IgG, ya que ésta se compone de dos cadenas pesadas unidas mediante puentes disulfuro entre sí, y dos cadenas ligeras unidas también mediante puentes disulfuro a cada una de las cadenas pesadas, y gracias al β -mercaptoetanol presente en el buffer, que reduce estos enlaces, se observa una banda correspondiente a las cadenas pesadas (flecha azul figura 1) y una banda más correspondiente a las cadenas ligeras (flecha naranja figura 1).

Tabla 1 concentración de proteínas en los inmunosueros.



Muestra	Proteína mg/ml
Anti-albúmina 2S	2.74
Anti-glicinina	2.76

Figura 1 SDS-PAGE de los inmunosueros utilizados.

Extracción de proteínas de interés de matrices alimentarias

En la tabla 2 se muestran las muestras que se utilizaron, y el contenido de proteína extraída de cada una de ellas. Se muestran las abreviaturas de las muestras, para su identificación a lo largo del documento.

También se utilizaron como controles la subunidad chica de la albúmina 2S de soya recombinante, la subunidad grande de la albúmina 2S de soya recombinante y la albúmina 2S de soya recombinante, obtenidas por el grupo de trabajo.

Las diferentes muestras se analizaron mediante SDS-PAGE, en la figura 2 se muestran los resultados.

Se puede observar a la subunidad ácida de la glicinina (Gly 30 k) en los carriles con las muestras Tex, Sem y Cho indicado con líneas amarillas. Para el caso de la fracción 2S, observamos las recombinantes en los carriles correspondientes a Chi-gde, Chi y Gde indicada círculo amarillo, en el caso de las matrices alimentarias es posible observar bandas alrededor de los 15 a los 30 kDa (zona de interés) en los carriles de las muestras Tex, Sem y Cho, indicado con círculo azul. Dicho esfuerzo de ubicar las bandas de interés funcionó como un primer acercamiento del reconocimiento de dichas bandas, pero, cabe mencionar que según Jedrychowski y Wichers (2010) mencionan que algunas familias proteicas específicamente de origen vegetal comparten la tendencia a formar grandes agregados inducidos térmicamente¹⁴, asociado a ello, cada matriz alimentaria exhibe procesos únicos

en su fabricación que influyen en esta y otras propiedades moleculares que podrían influir en su alergenicidad y al observar bandas por arriba del peso molecular esperado.

Tabla 2 Muestras de soya.

Muestra (matriz alimentaria)	Marca u observaciones	Abreviación	[] mg/ml proteína
Recombinante albúmina 2S de soya	29 kDa	Ch-gde	0.45
Recombinante subunidad chica de la albúmina 2S.	18 kDa	Chi	0.51
Recombinante subunidad grande de la albúmina 2S.	24 kDa	Gde	0.52
Soya texturizada.	Rancho Santa Angela	Tex	7.21
Frijol de soya.	Centro naturista soya vida	Sem	3.40
Chorizo.	Diferentes procedencias	Cho	1.23
Atún.	Ancla 20% soya	Atn	4.12

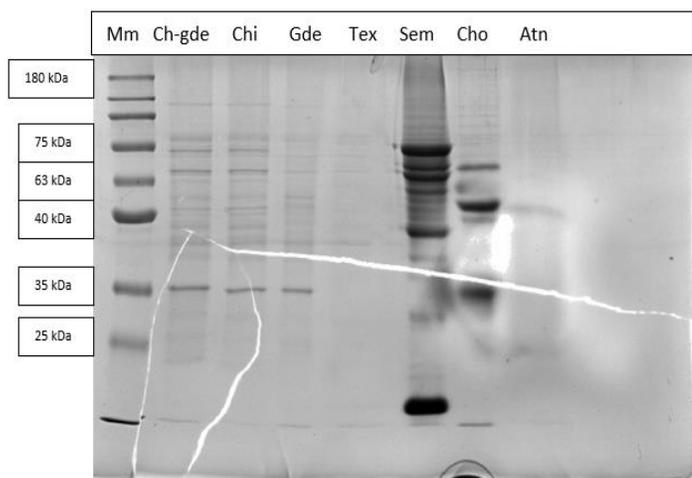


Figura 2 SDS-PAGE de muestras de soya.

Detección de las proteínas de la soya mediante Western blot.

El western blot de las muestras de soya, utilizando el anticuerpo anti-glicinina se muestra en la figura 3, podemos observar bandas alrededor de los 30 kDa, correspondiente a la subunidad ácida de la glicinina, en los carriles de la soya texturizada (Tex), proteína extraída de la semilla (Sem) y el chorizo (Cho) (denotadas con líneas azules). La importancia de Gly 30 K como alérgeno recae en sus características bioquímicas y biológicas entre las cuales se encuentra que poseen una estructura de barril beta, que es una característica común de las proteínas de la familia de las cupinas que exhiben

una notable estabilidad térmica y poseen una tendencia a formar grandes agregados inducidos térmicamente, tal vez, es por esto que se pueden observar bandas en pesos moleculares superiores¹⁴ en la muestra de chorizo. En la muestra de atún se observa una banda tenue alrededor de los 35kDa y los 60kDa, la bandade 60kDa puede corresponder a la glicinina de soya y la de 35 a algún hidrolizado de la misma, por el tratamiento térmico del atún.

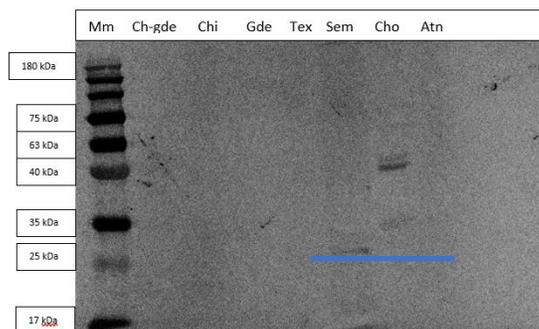


Figura 3 Análisis western blot. Detección de proteínas de la soya utilizando el anticuerpo anti-glicinina.

En la figura 4 se muestra el western blot de las muestras, utilizando el anticuerpo anti-albúmina 2S, se observan bandas de alrededor de 18 kDa y de alrededor de los 25 kDa (líneas azules) relacionadas a la albúmina 2S, pero, también observamos bandas con mayor peso molecular. Se ha demostrado que las albúminas 2S se unen o se asocian con los lípidos¹⁷, muchos alérgenos de alimentos vegetales también pueden asociarse con membranas celulares y otros tipos de estructuras lipídicas en los alimentos. Este es un método de acción comúnmente observado en las proteínas para proteger a las plantas contra microorganismos patógenos, a través de la desestabilización de membranas de bacterias u hongos que dan lugar a fugas¹⁵, tal vez es por esto que observamos bandas en pesos moleculares superiores. Las interacciones electrostáticas, además de la presencia de enlaces disulfuro, parecen desempeñar un papel importante en la estabilización de la estructura molecular de los alérgenos 2S¹⁶. A través del tracto gastrointestinal se sensibiliza la albúmina 2S de soya, esto sugiere que estas proteínas son capaces de resistir y mantenerse, a los duros escenarios como, pH ácido, efectos desnaturalizantes de los tensioactivos y actividades proteolíticas de las enzimas digestivas dentro del tracto gastrointestinal. Consecutivamente, estas proteínas podrían ser absorbidas en formas inmunológicamente activas por el intestino, lo que facilitaría la exhibición de estos alérgenos al sistema inmunitario para sensibilizar a un individuo y provocar una respuesta alérgica¹⁷.

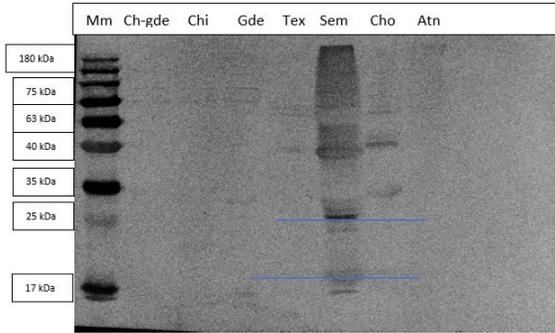


Figura 4 Análisis western blot. Detección de proteínas de la soya utilizando el anticuerpo anti-albúmina 2S.

Detección mediante el método ELISA

En la figura 6 se observa la identificación de las proteínas de soya utilizando el anticuerpo anti-albúmina 2S de soya.

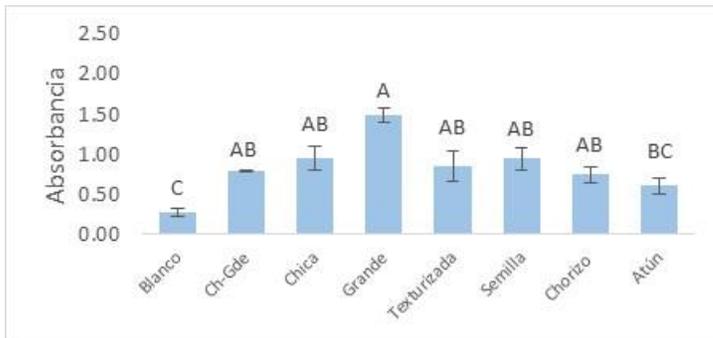


Figura 6. Identificación de proteínas de soya mediante la técnica de ELISA utilizando el anticuerpo anti-albúmina 2S de soya.

Se puede observar que con el anticuerpo se pueden identificar las diferentes proteínas de la soya, así se detectaron las proteínas recombinantes Ch-Gde que corresponde a la subunidad chica unida a la subunidad grande de la lunasina, péptido de la albúmina 2S de soya; la subunidad chica de la albúmina 2S y la subunidad grande de la albúmina 2S; se detectó también la albúmina 2S en la soya texturizada, la proteína extraída de la semilla, y también se detectó esta proteína en muestra de chorizo; aunque en atún también se obtuvo señal, al comparar con el blanco, no hubo diferencia significativa, por lo que no podemos decir que se haya detectado esta proteína en atún mediante esta técnica.

También se trabajó con el anticuerpo anti glicinina de soya, que es también un alérgeno.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos.

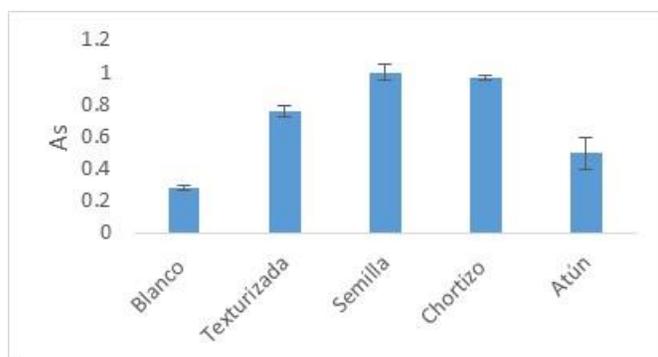


Figura 7. Identificación de proteínas de soya mediante la técnica de ELISA utilizando el anticuerpo anti glicinina de soya.

Se puede observar que se pudo identificar claramente la glicinina de soya en la semilla, en la soya texturizada, en chorizo y en atún. En este último alimento no se pudo identificar la albúmina 2S de la soya.

Anteriormente los esfuerzos por detectar estas proteínas alergénicas en diferentes matrices alimentarias han sido diversos, Planque M. *et al.*, (2016)¹⁸ desarrollaron un método sensible de detección de alérgenos cualitativos mediante el análisis de péptidos de alérgenos alimentarios por espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento, de las siguientes matrices alimentarias: salsa de tomate, galletas, chocolate y helado. En ese estudio pudieron detectar los siguientes alérgenos en dichas matrices: 0.5 mg/kg de proteínas de la leche para las caseínas, 5 mg/kg de proteínas de la leche para el suero, 3.4 mg/kg de proteínas de huevo para la clara de huevo, 30.8 mg/kg de proteínas de huevo para la yema de huevo, 2.5 mg/kg de proteínas de cacahuete y 5 mg/kg de proteínas de soya. Específicamente para la soya el alérgeno reportado es la glicina, mientras que para la yema de huevo el alérgeno reportado es la apovitellenina y para la clara fue la ovoalbúmina²⁰. El trabajo realizado también contribuye al conocimiento y una manera se poder detectar tanto alérgenos de la soya, así como posibles fraudes en alimentos, donde tal vez no reporten que se agregó soya al alimento procesado.

CONCLUSIÓN

Con los dos anticuerpos obtenidos se pudieron identificar proteínas alergénicas de la soya en la semilla, en soya texturizada y en el chorizo; en atún, sólo se pudo identificar la glicinina de soya.

BIBLIOGRAFÍA

1. Renz H, Allen KJ, Sicherer SH, et al. Food allergy. *Nat Rev Dis Prim.* 2018;4. doi:10.1038/nrdp.2017.98
2. Medina-hernández A, Huerta-hernández RE, Góngora-meléndez MA, Domínguez-silva MG, Mendoza-hernández DA, Romero-tapia SDJ. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes con sospecha de alergia alimentaria en México . Estudio Clinical-epidemiological profile of patients with suspicion of alimentary allergy in Mexico . Mexipreval Study. Published online 2015:28-40.
3. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunobiología de Janeway.* 7°. McGrawHill; 2009.
4. Sánchez J, Sánchez A. Epidemiology of food allergy in Latin America. *Allergol Immunopathol*

- (Madr). 2015;43(2):185-195. doi:10.1016/j.aller.2013.07.001
5. Aguilar-Jasso D, Valdez-López F, Valle-Leal JG, Aguilar-Jasso J, Hierro-Yepo JC Del, Lizola-Arvizu N. Clinical profile of pediatric patients diagnosed with food allergy in Northwestern Mexico. *Rev Alerg Mex*. 2018;65(3):153-161. doi:10.29262/ram.v65i3.355
 6. Amigo-Benavent M. Efecto de la desglucosilación enzimática en la antigenicidad del alérgeno beta-conglicina (7S globulina) de soja. Published online 2010. <https://digital.csic.es/handle/10261/21710>
 7. Barac M, Stanojevic S, Jovanovic S, Pesic M. Soy protein modification: A review. *Acta Period Technol*. 2004;280(35):3-16. doi:10.2298/apt0435003b
 8. Fukushima D. Soy proteins. *Handb Food Proteins*. Published online 2011:210-232. doi:10.1533/9780857093639.210
 9. Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-González S, et al. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem*. 2013;136(2):758-764. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.032
 10. Odintsova T, Rogozhin E, Sklyar I, et al. Antifungal Activity of Storage 2S Albumins from Seeds of the Invasive Weed Dandelion *Taraxacum officinale* Wigg. *Protein Pept Lett*. 2010;17(4):522-529. doi:10.2174/092986610790963591
 11. Tomar PPS, Nikhil K, Singh A, Selvakumar P, Roy P, Sharma AK. Characterization of anticancer, DNase and antifungal activity of pumpkin 2S albumin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;448(4):349-354. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.158
 12. Nava Cabrera AM. Análisis del gen que codifica para el péptido lunasina. Published online 2016.
 13. Jara Romero GJ. Expresión de los fragmentos que componen a la albúmina 2S en *Escherichia coli* y búsqueda de ortólogos del mismo gen en vegetales. *Occup Med (Chic Ill)*. 2017;(4).
 14. Jedrychowski L, Wichers HJ. *Chemical and Biological Properties of Food Allergens*. 2nd ed. CRC Press; 2010. doi:<https://doi.org/10.1201/9781420058574>
 15. Moreno FJ, Clemente A. 2S Albumin Storage Proteins: What Makes them Food Allergens? *Open Biochem J*. 2008;2:16-28. doi:10.2174/1874091x00802010016
 16. Breiteneder H, Radauer C. A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(5):821-830. doi:10.1016/j.jaci.2004.01.779
 17. Breiteneder H, Mills ENC. Molecular properties of food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(1):14-23. doi:10.1016/j.jaci.2004.10.022
 18. Planque M, Arnould T, Dieu M, Delahaut P, Renard P, Gillard N. Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs. *J Chromatogr A*. 2016;1464:115-123. doi:10.1016/j.chroma.2016.08.033