

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS
Programa de Posgrado en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Identificación de Proteínas Alergénicas del Músculo de la Jaiba Azul
(*Callinectes arcuatus*)

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

Q.B.C. Valdez Olmos Uriel Felipe

APROBACIÓN

Identificación de Proteínas Alergénicas del Músculo de la Jaiba Azul (*Callinectes arcuatus*)

Q.B.C Valdez Olmos Uriel Felipe



Dr. Alonso Alexis López Zavala
Director de la tesis



Dra. Oliviert Martínez Cruz
Co-Directora



Dr. Wilfrido Torres Arreola
Vocal



Dr. Enrique de la Re Vega
Vocal

Hermosillo, Sonora a 20 de Junio del 2022

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Identificación de proteínas alergénicas del músculo de la jaiba azul (*Callinectes arcuatus*)**, en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestro en Ciencias de los Alimentos**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

A T E N T A M E N T E



Q.B.C. Valdez Olmos Uriel Felipe



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓI
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico durante el proceso y realización de mi tesis de maestría.

A la universidad de Sonora y al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos por prestarnos sus instalaciones y brindarnos todo lo que se necesitó durante este proyecto de investigación. Así mismo, a todos los profesores que nos regalaron sus conocimientos y experiencia.

A los proyectos: CONACYT Ciencia-Frontera-2019-263986 y de la UNISON-DCBS-2022-USO313007854 por el financiamientos otorgado; y al programa de intercambio academico UNAM-CIC-UNISON-2018 y 2019; por la obtención de los péptidos para la identificación de proteínas.

A mi director de tesis, Dr. Alonso Alexis López Zavala, por su paciencia, enfoque, dedicación, entusiasmo, por su tiempo, su experiencia, su guía. Sobre todo, Dr., gracias por estar al pie del cañón y nunca dejar de motivarme, mil gracias.

A la Dra. Oliviert Martinez Cruz, por su tiempo y apoyarme en los momentos difíciles, gracias. Así como al Dr. de la Re Vega y al Dr. Wilfrido Torres Arreola, por el apoyo, tiempo y disponibilidad para la culminación de esta investigación, mil gracias.

A mis compañeros de generación, mis amigos. El buen Fredy, Fernanda y Carlos, grandes ejemplos de dedicación, perseverancia e inteligencia, muchas gracias por todo. A pepe y Ana, por soportarme en las últimas etapas del proyecto.

A mi familia, los amo con todo mi corazón. Soportaron otro proceso de los muchos que me faltan. Gracias por siempre apoyarme en mis buenas y malas decisiones. Padre y Madre, siempre serán el principal pilar en mi vida y mis ejemplos a seguir. Carlos, hermano, tus habilidades te harán llegar lejos, pero tu corazón te hará pasar fronteras. Paty, hermana, nunca dejo de extrañarte, sigue brillando y siendo la persona que eres.

A mi Gina, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos. Gracias por pasarme de tu paz en mis tiempos de ira, gracias por ser tú. Este proceso no hubiera sido lo mismo sin ti.

DEDICATORIA

A Felipe, Karina, Paty y Carlos. Si la primera no bastó, va el segundo intento.

Los amo.

RESUMEN

Las alergias alimentarias han incrementado con el paso de los años y a nivel mundial se ha considerado ya un problema de salud pública. Los productos de origen marino, en especial los crustáceos, son alimentos que pueden desencadenar reacciones alérgicas leves generando comezón o enrojecimiento de la piel, hasta reacciones más fuertes causando anafilaxias sistémicas que podría llevar a la muerte. En México, hasta el 10 % de la población adulta presenta reacciones alérgicas a algún crustáceo, por ejemplo, al camarón, así como a los cangrejos o jaibas. En estos últimos se desconocen cuáles son los alérgenos que se encuentran presentes en el músculo. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar las proteínas alergénicas presentes en el músculo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Para esto, se realizó la extracción proteica a partir de las quelas (pinzas) de la jaiba azul y fueron sometidas a un procesamiento electroforético en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) así como una electroforesis bidimensional. Se realizó un ensayo de inmunodetección (*western blot*) utilizando un *pool* de sueros de pacientes alérgicos a los crustáceos. Las proteínas inmunoreactivas fueron identificadas por espectroscopía de masas. En la electroforesis se observaron bandas desde 6 hasta 200 kDa, las cuales se distribuyeron en un rango de punto isoeléctrico (pI) desde 4.4 a 7. El análisis de secuencias obtenidas mostró que los péptidos encontrados en las bandas inmunoreactivas de la jaiba azul presentan alta identidad y cobertura respecto a proteínas alergénicas reportadas en otros crustáceos. Se identificaron 3 proteínas potencialmente alergénicas en el músculo de la jaiba azul: la hemocianina con un peso molecular de 70 kDa y pI de 5.61, la α -actina con 40 kDa y pI de 5.32, así como la triosa fosfato isomerasa con 21 kDa y pI de 5.9. Los sueros de pacientes alérgicos a crustáceos presentaron inmunoreactividad mediada por IgE frente a las proteínas

de la jaiba azul. Por lo tanto, *C. arcuatus* tiene proteínas (hemocianina, la α -actina y triosa fosfato isomerasa) que podrían desencadenar reacciones alérgicas en personas inmunosensibles a este tipo de alimentos.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Alergias Alimentarias.....	3
Prevalencia de las Alergias Alimentarias.....	4
Respuesta del Sistema Inmune en Alergias Mediada por IgE.....	5
Epítopes Alergénicos.....	8
Alergenicidad en el Consumo de Productos Marinos.....	9
Proteínas Alergénicas en Alimentos de Origen Marino.....	10
Identificación de proteínas alergénicas.....	13
Importancia de la Captura y Consumo de Jaiba.....	14
Jaiba Azul (<i>Callinectes arcuatus</i>).....	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
METODOLOGÍA	20
Recolección de organismos.....	20
Identificación del Grupo de Personas de Estudio y Obtención del Suero Sanguíneo.....	20
Obtención del Extracto Proteico del Músculo de la Jaiba Azul (<i>Callinectes arcuatus</i>).....	21
Separación Proteica por Electroforesis Bidimensional.....	21
Evaluación de inmunoreactividad a IgE.....	22
Identificación de Proteínas Inmunoreactivas Mediada por IgE por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS).....	23
Análisis Estadístico.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIONES	24

Obtención del Extracto Proteico de la Jaiba Azul.....	24
Análisis de la Separación Proteica por Electroforesis Bidimensional.....	25
Inmunodetección de la SDS-PAGE y la Electroforesis Bidimensional del Clarificado Crudo de la Jaiba Azul (<i>C. arcuatus</i>).....	27
Proteínas Identificadas por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas(LC-MS/MS).....	31
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
ANEXOS	46
REFERENCIAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Clasificación de reacciones adversas a alimentos.....	4
2 Esquema representativo de una reacción alérgica mediada por IgE.....	6
3 Participación de la producción de jaiba en las principales entidades.....	16
4 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE 12 %) del clarificado crudo de la jaiba azul.....	24
5 Diagrama de la distribución de pH en cada pocillo según la tira de gradiente de pH inmovilizado.....	25
6 Electroforesis bidimensional del clarificado crudo de la jaiba azul (<i>C. arcuatus</i>)....	27
7 Inminodetección de la SDS-PAGE del clarificado crudo de la jaiba azul (<i>C. arcuatus</i>).....	29
8 Inmunodetección del clarificado crudo de la jaiba azul (<i>C. arcuatus</i>).....	31
9 Gel bidimensional (2D) del clarificado de la jaiba azul (<i>C. arcuatus</i>).....	32
10 Alineamiento de la α -actina en diferentes organismos marinos.....	36
11 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la hemocianina en diferentes crustáceos.....	39
12 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la triosa fosfato isomerasa en diferentes crustáceos	42
13 Interconversión del fosfato de dihidroxiacetona y el D-glicaraldehído-3-fosfato por la triosa fosfato.....	43

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Principales proteínas alergénicas identificadas en crustáceos.....	12
2 Producción de la jaiba en México en toneladas.....	15
3 Proteínas alergénicas identificadas en la jaiba azul (<i>C. arcuatus</i>).....	33

ANEXOS

Anexo	Página
1 Cuestionario para la selección del grupo de estudio.....	45

INTRODUCCIÓN

Una alergia alimentaria se define como una reacción adversa de hipersensibilidad en la cual engloba una serie de reacciones del sistema inmune involucrando células de la inmunidad innata y adaptativa. Estas reacciones ocurren una vez que el cuerpo ha ingerido, inhalado o estado en contacto con un producto potencialmente alérgico desencadenando problemas de salud; las cuales van desde una rinitis alérgica, urticarias leves hasta descompensaciones de órganos completos o choques anafilácticos (Cruz *et al.*, 2018). Las alergias alimentarias causadas por crustáceos son muy similares a las alergias alimentarias en general. Estas montan una respuesta muy fuerte del sistema inmune mediada por anticuerpos del isotipo IgE causando la hipersensibilidad (Leung *et al.*, 1998).

Las proteínas de los crustáceos son las principales alérgenos y causantes de los problemas como el síndrome de la alergia oral, problemas en la boca y la garganta hasta anafilaxia potencialmente mortal, estos problemas se presentan en el consumo del crustáceo, en su cocción o bien, con el simple hecho de oler o tocar el alimento (Khora, 2016). Dentro de los crustáceos con mayor registro alergénico es el camarón. Con técnicas como SDS-PAGE-Immunoblot, clonación de DNA y espectroscopía de masas (MALDI-ToF/ESI, LC-MS/MS), se han identificado proteínas alergénicas como la tropomiosina, arginina cinasa (AK), cadena ligera de miosina, hemocianina y troponina (Chen *et al.*, 2013; Kalyanasundaram y Santiago, 2015; Kumjim *et al.*, 2016; Wu *et al.* 2019). También se ha reportado la α -actina como alérgeno en algunos mariscos y crustáceos, además del péptido LVSAVNEIEK como un importante marcador en la identificación de la AK en los crustáceos (Rahaman *et al.*, 2012).

Por otro lado, en México la captura y comercialización de crustáceos forman parte muy importante en la economía. De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2017), se reportó una producción total de jaiba en general de 48,602 toneladas; donde Sinaloa se encuentra en primer lugar de producción y Sonora en el segundo con un total de 10,348 toneladas. Según la Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (CONAPESCA), en el periodo del 2012 al 2017 se generó una ganancia de 540.81 millones de pesos. Además, el Diario Oficial de la Federación (DOF) (2019) con información del Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA) muestra a la jaiba azul (*C. arcuatus*) en el segundo lugar de captura en el

Océano Pacífico de México representando el 24 % en la producción total. Así, en la presente investigación la jaiba azul (*Callinectes arcuatus*) es el sujeto de estudio, siendo los Estados de Sonora y Sinaloa los principales productores a nivel nacional de este crustáceo (DOF, 2018).

Es de importancia destacar que no se han reportado estudios enfocados en la identificación de las proteínas alergénicas en la jaiba azul. Sin embargo, se han identificado en otras especies de cangrejos de las cuales destacan la troponina, triosa fosfato isomerasa, AK, la hemocianina, actina y la proteína de unión a Ca^{2+} sarcoplasmática (Leung *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2013; Abramovitch *et al.*, 2013). A pesar de la importancia de la jaiba azul no se dispone de información sobre las proteínas inmunoreactivas a IgE. Es decir, aquellas proteínas presentes en el músculo de la jaiba azul con capacidad de desencadenar una respuesta inmunológica relacionada con alergias en humanos. Es así que, en el presente estudio se busca identificar las principales proteínas alergénicas de este crustáceo para contribuir en el conocimiento de las proteínas implicadas en problemas de salud como son las alergias, además de abrir las puertas a nuevas investigaciones en relación a esto.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Alergias Alimentarias

La mayoría de las personas pueden consumir sin problemas los alimentos que más prefieren y gustan, sin embargo, una sección de individuos tiene el gran problema de presentar alergias a los productos alimentarios, ya sea durante el consumo o después del mismo (FAO, 2019). Las alergias alimentarias se definen como una reacción mediada inmunológicamente principalmente por anticuerpos IgE, se considera como una reacción adversa al alimento y se presenta en cualquier edad (Carrard *et al.*, 2015; Anagnostou *et al.*, 2015), así bien, de los alimentos que generan estas reacciones son el huevo, nueces, maní, peces y crustáceos (MINSAL, 2012). Las alergias en general son muy complejas además de ser extremadamente heterogéneas y pueden estar mediadas por mecanismos inmunes con anticuerpos IgE; así como en ausencia de estos, como la intolerancia alimentaria o alguna reacción adversa tóxica (Smaldini *et al.*, 2016). Así mismo, la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI, por sus siglas en inglés) tiene una clasificación para las reacciones adversas a los alimentos donde engloba la hipersensibilidad, las tóxicas, etc. (Cruz *et al.*, 2018; Fig. 1).

El problema que existe con las alergias alimentarias es tal que en 1999 la *Codex Alimentarius* hizo público un listado de los alérgenos más importantes y con más prevalencias. De esta manera, y con ayuda de EAACI entre otras organizaciones, divulgaron y promovieron un correcto etiquetado en los alimentos donde se exprese los ingredientes alérgicos que contiene el producto (Gendel, 2012). Asimismo, es importante mencionar la cantidad de alérgeno para desencadenar una reacción alérgica. Sin embargo, estos niveles son muy complicados de establecer y se han reportado niveles que van desde 1 hasta 100 mg Kg⁻¹ (Taylor *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2018). El problema es que en ocasiones las cantidades necesarias para producir alguna reacción alérgica son muy pequeñas, están en el umbral de los microgramos (desde 30 hasta 0.003 µg) en algunos alimentos como el huevo, avellanas o cacahuates produciendo en individuos sensibles reacciones anafilácticas muy graves (Cochrane *et al.*, 2012).

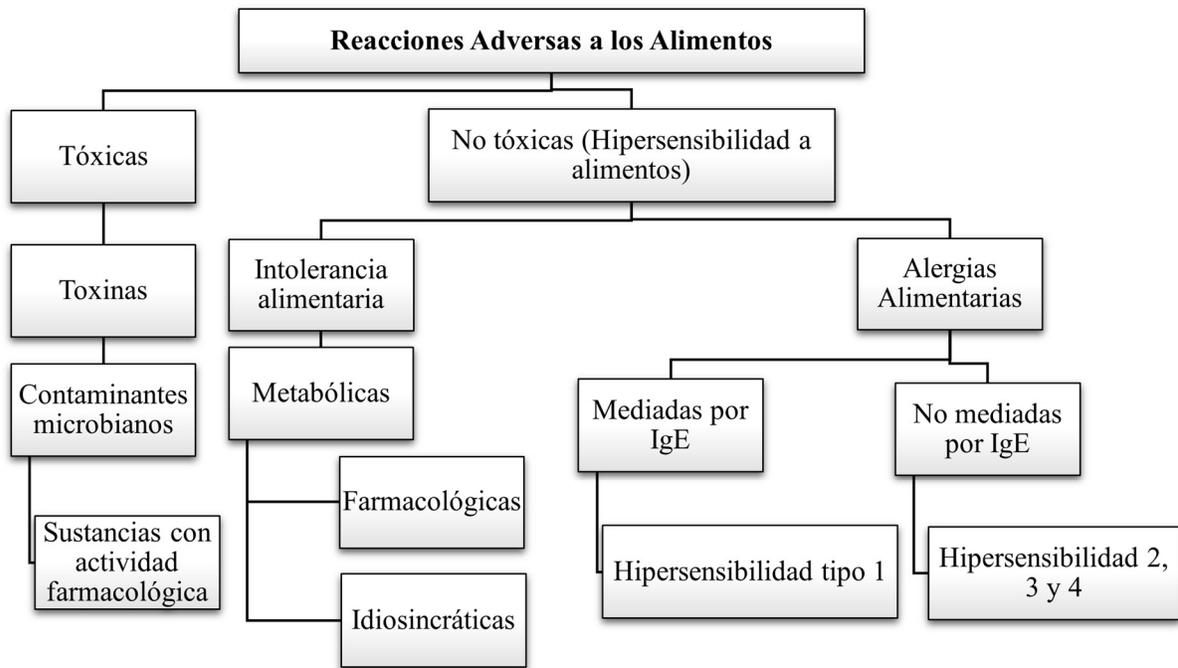


Figura 1. Clasificación de reacciones adversas a alimentos (tomado de: Cruz *et al.*, 2018).

Prevalencia de las Alergias Alimentarias

El problema de las alergias causadas por alimentos se ha convertido en un problema de salud que se ha extendido a nivel mundial (López, 2018). En el caso de América Latina los estudios de la prevalencia de estas alergias son muy limitadas. Algunos países que han trabajado en esto principalmente son Argentina, Brasil, México (Castañón *et al.*, 2002; Bozzola *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2015); sin embargo, estos datos no son suficientes como para asegurar la prevalencia de las alergias alimentarias. Como se mencionó anteriormente, las alergias alimentarias se han extendido globalmente y se ha reportado una prevalencia de las mismas en niños y adultos que está en un intervalo desde el 3 al 35 % sin olvidar que estas cifras están en escala mundial (Rona *et al.*, 2007).

En México se han llevado a cabo estudios para determinar la prevalencia de alergias, es el caso de Ontiveros *et al.* (2016) donde se realizó una investigación poblacional para determinar la prevalencia de alergias alimentarias en niños en etapa escolar. Se encontró que en general, más del 40 % de las reacciones adversas a los alimentos eran reacciones alérgicas y dentro de

estas, la que tuvo mayor fuerza clínicamente fue por el consumo de crustáceos (aún mayor que el consumo de huevo, leche y maní) causando anafilaxia. Se concluyó que en la población mexicana existe un 10 % de prevalencia en alergias alimentarias destacando los crustáceos como uno de los principales efectores de este problema. Por otra parte, Pulido *et al.* (2019) realizaron uno de los primeros estudios en la prevalencia de las alergias alimentarias. Los autores encontraron en los adolescentes una prevalencia de alergias alimentarias de más del 10 % coincidiendo con el estudio en niños escolarizados de Ontiveros *et al.* (2016). Así mismo, se demostró que los crustáceos son de los principales causantes de este problema en México. Es importante mencionar que los estudios de prevalencia en México caen dentro de una región geográfica en particular lo que pudiera sesgar los datos reportados dado que puede variar mucho según los hábitos alimenticios de cada población, la disponibilidad del potencial alimento alergénico o bien, según sus costumbres culturales (Pulido *et al.*, 2019).

Respuesta del Sistema Inmune en Alergias Mediada por IgE

Las reacciones alérgicas comienzan al momento en que el alérgeno está presente en el organismo de la persona sensibilizada, generalmente estos alérgenos son capturados por células dendríticas del epitelio, así mismo, estas células se encargan de transportar el antígeno a los ganglios linfáticos donde este se procesa y las células especializadas comienzan a presentar únicamente los péptidos responsables de generar la hipersensibilidad mediada por IgE (Murphy y Weaver, 2016; Fig. 2). La producción de IgE en individuos susceptibles con problemas de alergias es muy elevada, además, la cantidad de inmunoglobulina E liberada dependerá mucho de la propensión que tenga la persona ante a un alérgeno en específico. (Acosta y Paguay, 2019).

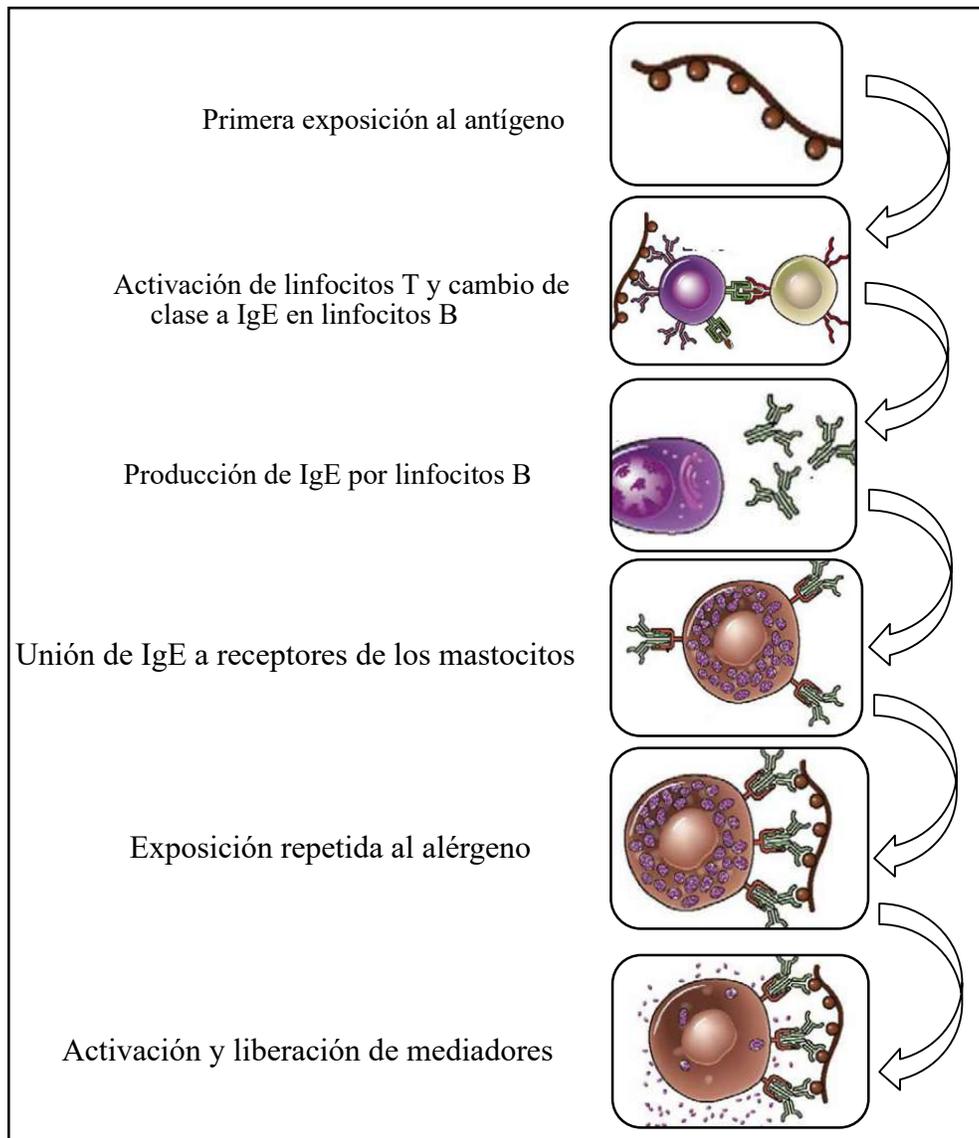


Figura 2. Esquema representativo de una reacción alérgica mediada por IgE (Tomado de: Abbas *et al.*, 2015).

El problema de los alérgenos es que no se conoce por qué algunos generan reacciones más fuertes que otros. Sin embargo, se le atribuye esta fuerza de reactividad a ciertas características de la molécula como podría ser el peso molecular muy bajo, la alta solubilidad en los líquidos del cuerpo o bien el grado de glicosilación, esta última característica está presente en algunos alimentos (Abbas *et al.*, 2015). El sistema inmunológico puede reaccionar frente a los

alérgenos, ya que para presentar una reacción alérgica es necesario estar en presencia de esa molécula en repetidas ocasiones, es decir, al consumir algún producto el cuerpo aún no está sensibilizado por lo que no ha producido anticuerpos IgE específicos para esa molécula, lo cual, en un segundo contacto con ese alimento puede desencadenar problemas de salud muy graves, incluso la muerte (Abbas *et al.*, 2015).

Por otra parte, también es posible que se presenten reacciones cruzadas al consumir o estar en contacto con otros productos alimenticios o alergénicos (Xu *et al.*, 2020). Esto se basa en la similitud de alérgenos, por lo que los anticuerpos se unen sin especificar el tipo de alimento o sustancia con el cual se esté en contacto, es posible también que epítopes en las proteínas con funciones similares estén compartidos y los anticuerpos, principalmente IgE, tengan reactividad a estas (Werfel *et al.*, 2015). Se ha reportado una variedad de proteínas que causan una respuesta inmunológica mediada por IgE en ciertos insectos como es el caso de *Tenebrio molitor* conocido como gusano de la harina, dentro de las cuales se encuentra la arginina cinasa (AK), tropomiosina y cadena ligera de miosina (Broekman *et al.*, 2017). Se ha visto también que los sujetos con alergia al gusano de seda (*Bombyx mori*) son sensibilizados con AK principalmente (Zhao *et al.*, 2015). En el caso de otros insectos como la cucaracha (*Blattella germanica*), también se han encontrado como principales proteínas alergénicas a la AK y a la tropomiosina, así como la troponina, la enolasa y la hemocianina (de Gier y Verhoeckx, 2018). En estudios realizados por Van Broekhoven *et al.* (2016) mostraron la reactividad cruzada que tienen individuos alérgicos a crustáceos con el gusano de la harina, donde las IgE se unieron a la proteína tropomiosina.

Pacientes con un historial de hipersensibilidad al camarón han mostrado reactividad con otro tipo de alimentos marinos como las ostras, almejas, mejillón y algunos otros moluscos cefalópodos como el pulpo y el calamar (Leung *et al.*, 1996). Por otra parte, estos alimentos suelen consumirse crudos (frescos) o cocinados. En estudios realizados por Rolland *et al.* (2018) mostraron que en ambas preparaciones la reactividad de la IgE permanecía, sin embargo, en algunos moluscos la reactividad aumentaba en el alimento ya cocido. Así mismo, se han reportado reactividad cruzada de la tropomiosina del camarón con algunos cangrejos y langostas (Yong *et al.*, 2006).

Epítopes Alergénicos

Un epítope es aquella región de una macromolécula o antígeno la cual es reconocida por algún receptor o por algún anticuerpo (IgE) (Liu y Sath, 2018). Estos se pueden dividir dependiendo del tipo de reconocimiento que se presente, por ejemplo, si reconoce aminoácidos consecutivos lineales, o bien, reconoce aminoácidos separados con base a la conformación de la proteína (Matsuo *et al.*, 2015). Un epítope lineal se define como una secuencia de aminoácidos de una proteína en su estructura primaria, dando lugar a la formación de péptidos que después serán expuestos para así montar la respuesta alérgica mediada por IgE (Mohapatra y Lockey, 2001). El otro tipo de epítope es el conformacional, el cual varía principalmente en la continuidad de los aminoácidos de una proteína de tal manera que al momento de que la molécula se pliegue, estos aminoácidos quedan cerca y son reconocidos por los anticuerpos. Para producir una reacción alérgica es necesario que la proteína esté completa y bien estructurada porque algún cambio en esta puede generar la pérdida del epítope de interés (Harrer *et al.*, 2010). Los epítopes se pueden dividir a su vez por el tipo de célula que será capaz de reconocerlo. es decir, las células T del linaje Th2 reconocen epítopes esencialmente lineales que va de 12 a 26 aminoácidos, en este reconocimiento de antígeno se da la liberación de interleucinas encargadas de desencadenar las reacciones alérgicas (Murphy y Weaver, 2016). En cambio, los reconocimientos por linfocitos B se da en epítopes tanto lineales como no lineales y también epítopes con modificaciones con carbohidratos en su estructura (Aalberse, 2000).

Es preciso mencionar que los anticuerpos reconocen estructuras complejas de casi cualquier naturaleza, ya sea que el antígeno se haya degradado o no (Abbas *et al.*, 2015). Sin embargo, en otro tipo de receptores como los de los linfocitos T, es necesario que el antígeno sea degradado y procesado para que con ayuda de células especializadas sea reconocido por el linfocito T interactuando con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de la célula (Liu y Sathe, 2018).

Alergenicidad en el Consumo de Productos Marinos

No se debe confundir una alergia causada por alimentos marinos con la intolerancia al alimento, aunque puede presentar síntomas similares tienen mecanismos de acción diferentes, por ejemplo, la presencia de ciertas neurotoxinas etc., en cambio una reacción alérgica es producida por ciertas proteínas intrínsecas en el alimento o bien por proteínas de algún otro organismo que esté presente en el mismo alimento (Baird *et al.*, 2014; Friedman *et al.*, 2017). El efecto que tienen las proteínas alergénicas varía mucho, va desde rinitis alérgica hasta choques anafilácticos y es muy difícil predecir la respuesta que tendrá cada individuo frente a estas proteínas dado a que las interacciones que se tienen con el sistema inmunológico son muy complejas (Russell *et al.*, 2000). Por otra parte, según datos proporcionados por la Federación Mexicana de la Diabetes (FMD) y el Instituto Mexicano del Seguro Social (2018), el 25 % de la población presenta algún problema alérgico incluyendo las alimentarias, donde alrededor del 4.2 % de los individuos están dentro de los 3 a 5 años y menos del 4 % de 18 años o menos.

El consumo de mariscos tiene un valor nutricional muy importante, ya que estos son portadores de altas cantidades de proteína, sin embargo, los crustáceos como el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) son considerados alimentos alergénicos, ya que se ha visto que proteínas como la arginina cinasa tiene inmunoreactividad a IgE en sueros de pacientes alérgicos al camarón (García-Orozco *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2018). Las reacciones alérgicas no solo se dan al consumir este tipo de alimento, sino que también al momento de la cocción o por el contacto con la piel. Por otra parte, la alergenidad que se presenta por consumo de crustáceos se manifiesta de por vida (Ruethers *et al.*, 2018). El consumo del pescado también tiene un valor nutricional muy alto gracias a los ácidos grasos insaturados que se encuentran presentes, así como las altas concentraciones de proteínas (Van Hecke *et al.*, 2019), lo cual lo hace candidato al consumo humano. Estas ventajas traen consigo otro tipo de problemas, por ejemplo, al aumentar la demanda del pescado se necesitan más trabajadores y se ha reportado que la manipulación de este producto puede sensibilizar al individuo y desencadenar reacciones alérgicas (García *et al.*, 1997). También ocasiona alergia en el consumo y problemas en vías respiratorias (Sugita *et al.*, 2007), por ejemplo, la caballa

del Pacífico (*Scomber japonicus*) es capaz de montar respuesta inmune al ser ingerido como alimento en personas con hipersensibilidad (Yoshida *et al.*, 2008).

No sólo los crustáceos o los peces generan alergenicidad. Se ha reportado que la proteína más alergénica en alimentos marinos (la tropomiosina) está presente en los moluscos y producen alergias, dentro de estas están: Ostras (*Crassostrea gigas*), mejillón (*Mytilus edulis*), abulón (*Haliotis discus hannai*) y almeja (*Ruditapes philippinarum*) (Suh *et al.*, 2020). También se sabe que en el músculo del pulpo (*Octopus vulgaris*) la tropomiosina es la responsable de alergenicidad (Ishikawa *et al.*, 2001).

Proteínas Alergénicas en Alimentos de Origen Marino

Los alérgenos que se han reportado en productos como los peces, moluscos y crustáceos, son altamente solubles en agua, además, se han descrito proteínas alergénicas de crustáceos como la tropomiosina, la actina, aldolasa A, arginina quinasa, hemocianina y la triosa fosfato isomerasa (García-Orozco *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2011; Gamez *et al.*, 2011; Kamath *et al.*, 2014). Estos alérgenos se encuentran principalmente en el tejido muscular (Ruethers *et al.*, 2018). La tropomiosina es considerada uno de los alérgenos más comunes presentes en los mariscos, en crustáceos, pero también en moluscos. Se ha reportado que la tropomiosina presenta homología de más del 90 % con crustáceos con algunos camarones y cangrejos (Motoyama *et al.*, 2007). La estructura secundaria y terciaria de esta proteína le da estabilidad, lo que la hace muy resistente a tratamientos con calor y presión. La tropomiosina al estar presente en crustáceos comestibles, a pesar de que este se cocine, seguirá manteniendo su característica de alergenicidad (Kamath *et al.*, 2014).

Después de la tropomiosina, la arginina cinasa (AK) es la más frecuente aislada en crustáceos y que presenta reactividad a IgE (Pascal *et al.*, 2015). Esta proteína está involucrada en el metabolismo energético de los organismos regulando los niveles de ATP (Ruethers *et al.*, 2018). La AK al contrario de la tropomiosina, es una proteína termolábil y en estudios realizados se ha descrito que bajo un tratamiento de calor la alergenicidad de esta proteína comienza a reducirse, así mismo, tiene más del 50 % de homología en otro tipo de organismos como los moluscos, sin embargo, no solamente se encuentra en alimentos marinos, sino que

también se ha identificado en los ácaros de polvo en donde AK también tiene un papel alérgico (Rahman *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2012; Kamath *et al.*, 2014).

Se han descrito también ciertas proteínas que son capaces de generar una respuesta alérgica (Tabla 1) como las cadenas ligeras de miosina y la troponina, ambas moléculas están involucradas en la contracción muscular mediante uniones de Ca^{2+} , así mismo, al igual que otras proteínas, son termoestables y resistentes a cambios de pH, además de tener la característica de presentar alta reactividad frente a IgE (Pascal *et al.*, 2015). También la actina, proteína involucrada en la contracción muscular, ha sido considerada como un importante alérgeno (Rahaman *et al.*, 2012). Por otra parte, también se han reportado proteínas de alto peso molecular como la hemocianina, esta proteína se encuentra en la hemolinfa y es la encargada del transporte de oxígeno en los crustáceos (Olianas *et al.*, 2006). Esta molécula está constituida por varias subunidades las cuales pueden desencadenar reacciones alérgicas en individuos susceptibles (Piboonpocanun *et al.*, 2011). De las proteínas mencionadas anteriormente, la tropomiosina y la AK son las más aisladas en crustáceos, por ejemplo en camarones como: *L. vannamei* (camarón blanco), *Penaeus monodon* (camarón tigre) y *Fenneropenaeus chinensis* (camarón chino), entre otros (Yu *et al.*, 2003; Bauermeister *et al.*, 2011). Así mismo, la información que existe de las proteínas con potencial función alérgica de la jaiba es prácticamente nula, sin embargo, se han aislado proteínas alérgicas de algunas variedades de cangrejo, por ejemplo: del cangrejo de barro (*Scylla serrata*), cangrejo rojo (*Charybdis feriatus*) y el cangrejo de las nieves (*Chionoecetes opilio*) se han reportado la tropomiosina, la AK y además de una molécula llamada proteína de unión sarcoplasmática (Leung *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2011; Rahaman *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales proteínas alergénicas identificadas en crustáceos.

Especie	Proteína	Técnica utilizada para la identificación proteica	Referencia
Cangrejo de las nieves (<i>Chionoecetes opilio</i>)	Arginina cinasa Proteína de unión a calcio sarcoplasmática Troponina Actina	Espectroscopía de masas (MALDI-ToF, LC-MS/MS)	Rahaman <i>et. al.</i> , 2011
Camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Arginina cinasa	Clonación de DNA y espectroscopía de masas	García-Orozco <i>et al.</i> , 2007
Camarón del mar del norte (<i>Crangon crangon</i>)	Tropomiosina Arginina cinasa Triosafosfato isomerasa Cadena ligera de la miosina	Espectroscopía de masas (MALDI-Tof)	Bauermeister <i>et al.</i> , 2011
Cangrejo del barro (<i>Scylla serrata</i>)	Arginina cinasa	Espectroscopía de masas (MALDI)	Shen <i>et al.</i> , 2011
Cangrejo rojo (<i>Charybdis feriatius</i>)	Tropomiosina	Clonación de DNA	Leung <i>et al.</i> , 1998
Cangrejo de Shanghai (<i>Riocheir sinensis</i>)	Hemocianina	Clonación de DNA	Zhang <i>et al.</i> , 2016

Identificación de proteínas alergénicas.

A lo largo del presente trabajo se ha hablado de las proteínas alergénicas que se encuentran más comúnmente en crustáceos, por ejemplo, la tropomiosina y la AK. En estas proteínas se han realizado estudios para intentar predecir los epítopes responsables de la alergenicidad y se ha encontrado características similares en ambas como la alta hidrofilia, además, con análisis de accesibilidad y flexibilidad se encontró que estas proteínas pudieran tener regiones flexibles, estiradas y fácilmente expuestas lo cual son características muy importantes en las proteínas altamente alergénicas (Fu *et al.*, 2018). Dentro de los crustáceos y productos de origen marino, los péptidos causantes de alergenicidad son muy conservados entre especies (Cheng *et al.*, 2008). En el estudio realizado en *Penaeus chinensis* y, comparando con otras especies, se encontró que tanto la tropomiosina y la AK tienen aminoácidos críticos para la generación de alergenicidad los cuales son: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E) y leucina (L). Esto se realizó con técnicas bioinformáticas determinando la conservación de los aminoácidos (Fu *et al.*, 2018).

En estudios realizados por Rahman *et al.* (2011) analizaron un extracto crudo a partir del cangrejo de las nieves (*Chionoecetes opilio*) donde encontraron alergenicidad por IgE con sueros sanguíneos humanos. En este estudio los autores hicieron uso de una serie de análisis con espectroscopía de masas acoplado a cromatografía líquida para encontrar los péptidos presentes en la muestra encontrando 6 proteínas principales causantes de alergia, como la proteína de unión a calcio sarcoplasmática, troponina, tropomiosina, arginina cinasa, α -actina y el retículo endoplasmático liso ATPasa, sin embargo, la AK fue la más activa. Varios estudios demuestran que utilizar electroforesis bidimensional seguido de técnicas inmunológicas como el *western blot* además de la espectroscopía de masas con tratamiento previo de digestión proteica mediada por enzimas, son muy funcionales y eficientes para separar proteínas e identificarlas posteriormente (Shriver *et al.*, 2011; Misnan *et al.*, 2012)

Importancia de la Captura y Consumo de jaiba

Los crustáceos en general son y han sido de mucha importancia a niveles económicos y alimentarios, ya que son recursos que para las naciones aportan grandes cantidades en millones de pesos, además de ser reguladores ecológicos puesto que son parte de la dieta de otro tipo de organismos (Miranda *et al.*, 2006). Así bien, los crustáceos son decápodos ya que estos tienen una cabeza y un cuerpo segmentado donde las diferencias entre ellos se encuentran principalmente en las variaciones del tórax y abdomen (Edgecombe, 2010). Álvarez *et al.* (2014) mencionan que: “El total de 1, 775 especies de decápodos se distribuye de la siguiente manera: marinas 1, 597 (89.9 %) y 178 dulceacuícolas (10.1 %); en aguas del Pacífico 866 (48.6 %); y Golfo de México 21 (1.3 %)”.

México es uno de los principales productores de peces, moluscos, así como de crustáceos (FAO, 2017). Las jaibas son de las especies con mayor producción a nivel nacional, se ha reportado un aumento de producción del más del 50 % en los años 2012 a 2016 y económicamente representa una derrama de 684 millones de pesos (CONAPESCA, 2018). A nivel estatal, Sonora está presente como un importante generador de productos marinos como el camarón, calamar, almeja y la jaiba (CONAPESCA, 2015).

Ahora bien, según datos del Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca del 2017 la producción total de la jaiba en México es de 48, 602 (Tabla 2) donde Sinaloa representa el primer lugar con el 39 % y Sonora el segundo lugar con el 21 % seguido por Campeche y Veracruz (Fig 3). Por otra parte, la exportación de la jaiba a países como Estados Unidos, Japón, China, Hong Kong, entre otros, ha reportado en el 2017 un valor de 46, 985 dólares. Así mismo, ya se han reportado datos preliminares del año 2018 donde se muestra un aumento en la producción total con un valor de 50, 272.48 toneladas y Sonora también aumentó su producción con un valor total de 10, 742.66 toneladas (SIAP, 2018). La jaiba en México se comercializa principalmente en dos presentaciones: en pulpa y entera con un valor en pesos por kilogramo de 150 y 49 respectivamente (valores hasta el 2017). Dentro del gran total de la producción de las jaibas en México, tanto Sonora como Sinaloa siguen representando los primeros lugares de producción de la jaiba azul con aproximadamente el 35 % de la totalidad de producción de este crustáceo a nivel nacional (DOF 2018).

Tabla 2. Producción de la Jaiba en México en toneladas (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2017).

Entidad	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Total	28,064	20,605	22,817	20,262	21,536	26,878	34,468	42,108	51,132	48,602
Sinaloa	13,071	6,499	6,226	6,107	8,222	1,361	13,601	18,768	24,495	18,969
Sonora	3,921	4,766	4,052	4,073	3,587	4,644	6,985	5,769	6,621	10,348
Campeche	1,642	1,594	2,180	1,534	2,198	2,718	3,862	5,642	6,470	6,308
Veracruz	3,756	2,797	3,558	3,511	3,275	4,104	4,530	2,842	3,987	5,178
Tamaulipas	3,026	2,493	4,516	3,282	2,094	1,724	3,233	5,555	6,356	4,033
Tabasco	1,253	986	1,342	1,155	1,397	1,274	778	1,093	1,083	1,476
Baja California Sur	600	813	562	271	441	488	823	1,849	1,520	1,277
Chiapas	571	453	131	117	144	313	300	230	148	337
Yucatán	51	53	39	23	3	11	36	34	7	225
Otras	174	151	151	190	175	240	319	326	445	452

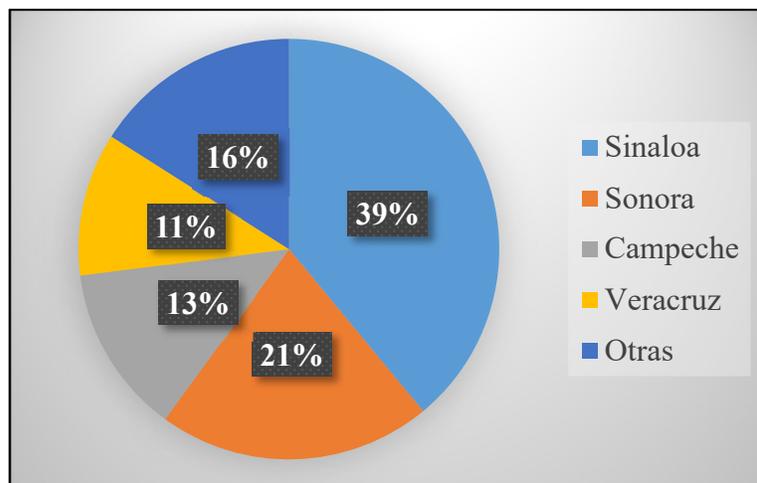


Figura 3. Participación de la producción de jaiba en las principales entidades (Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca, 2017).

Jaiba Azul (*Callinectes arcuatus*)

Las jaibas son crustáceos de la superfamilia *Portunoidea* y del género *Callinectes*. En el Pacífico mexicano se encuentran principalmente *C. arcuatus* (jaiba azul), *C. bellicosus* (jaiba café) y *C. toxotes* (jaiba negra), la captura de estas especies representa una gran importancia económica directa para la zona (Ramírez *et al.*, 2003). *C. arcuatus* habita en las aguas marinas del Golfo de California y se distribuye desde California hasta Perú y es sabido que las lagunas costeras son consideradas altamente importante como hábitat de este crustáceo dado a las características alimentarias que existen en estos lugares que ayuda también en etapas de migración (Arciniega y Romero, 2013). *C. arcuatus* tiene la capacidad de soportar niveles de salinidad hasta 65 ‰ y su desarrollo se da a una temperatura que va desde los 17.5 °C a los 34 °C a no más de 40 m de profundidad, así mismo se ha descrito que la temporada reproductiva de esta se da en los periodos de verano y primavera, en contraste, en otoño es la abundancia más baja del año (Paul, 1982; Lizárraga *et al.*, 2003).

En el Océano Pacífico dentro del territorio mexicano, la jaiba azul se encuentra en el segundo lugar de producción (DOF, 2019). Así mismo, según el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2017) el consumo de crustáceos (excluyendo el camarón) en México fue aproximadamente de 72 mil toneladas para consumo humano.

Por lo anteriormente presentado, resulta de interés estudios sobre la alergenicidad por consumo de especies marinas de interés comercial como la jaiba azul. Así mismo, es de relevancia identificar las proteínas presentes en el músculo de este crustáceo, para establecer las bases de posibles estrategias para disminuir o contrarrestar dicha respuesta inmunológica.

HIPÓTESIS

La jaiba azul (*Callinectes arcuatus*) tiene en su músculo al menos tres proteínas capaces de desencadenar una respuesta alérgica mediada por anticuerpos IgE.

OBJETIVO

Identificar proteínas del músculo de la jaiba azul (*Callinectes arcuatus*) con potencial alergénico para humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener suero sanguíneo de sujetos con y sin antecedentes de alergia al consumo de crustáceos.
- Separar las fracciones proteicas del músculo de la jaiba azul por técnicas electroforéticas.
- Evaluar *in vitro* la inmunoreactividad de IgE de las fracciones proteicas utilizando sueros de los sujetos de estudio.
- Identificar las proteínas inmunoreactivas a IgE mediante secuenciación.

METODOLOGÍA

Recolección de Organismos

La jaiba azul *C. arcuatus* se obtuvo en la zona costera de Bahía de Kino en el Estado de Sonora, esto con ayuda de pescadores locales dedicados a la captura de estos crustáceos. Se identificaron morfológicamente y se transportaron al Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Universidad de Sonora y se almacenaron a - 80 °C hasta su uso.

Identificación del Grupo de Personas de Estudio y Obtención del Suero Sanguíneo

La selección de sujetos se realizó mediante la aplicación de cuestionarios según Montalvo (2016) con algunas modificaciones para identificar individuos con historial de alergenidad al consumo de jaiba y otros crustáceos e individuos que no presentan este tipo de problema (Anexo 1). Se seleccionaron a 4 personas voluntarias dentro de las cuales, tres aseguraron presentar alergia al consumo/contacto a la jaiba y/o crustáceos. Dos más de ellos, no presentaban alergias alimentarias. Estos últimos fueron utilizadas como controles negativos en los ensayos inmunológicos. Para la recolección de las muestras sanguíneas se aplicó la técnica de venopunción periférica utilizando tubos BD Vacutainer® de 6 mL con activador de coagulación. Para recuperar el suero sanguíneo la muestra se centrifugó por 5 min a 1.4 x g. Con los sueros recolectados se realizó un *pool* utilizando los tres sueros de las personas alérgicas. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Todos los procedimientos para la obtención tanto de los tejidos como de los sueros fueron aprobados por el comité de ética en investigación de la Universidad de Sonora (#CEI-UNISON 15/2022).

Obtención del Extracto Proteico del Músculo de la Jaiba Azul (*Callinectes arcuatus*)

Se tomaron 5 g del músculo de la jaiba azul el cual fue resuspendido en buffer lisis (Tris 25 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 25 μ M a pH 8) (García-Orozco *et al.*, 2007). Este se homogenizó en tres intervalos de 15 segundos hasta obtener una solución uniforme. El homogenado se mantuvo en agitación constante durante la noche a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 4 °C por 20 min a 18,000 x g; se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Para esto se mezclaron 45 μ L de agua tridestilada con 5 μ L de la muestra en 250 μ L del reactivo de Bradford. Se incubó durante 5 min a 25 °C y se le midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) (Bradford, 1976). Las mediciones se realizaron por triplicado y para el blanco se utilizó el buffer de lisis. Se utilizaron diluciones seriadas de albúmina (1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL) para la construcción de la curva estándar para la cuantificación proteica. El clarificado obtenido a partir de la extracción proteica fue sometido a la SDS-PAGE cargando 32 μ g de proteína al 12 % de acrilamida en condiciones de 15 mA y 25 mA por 1 h y 20 min. Esto para obtener el patrón electroforético de la muestra.

Separación Proteica por Electroforesis Bidimensional

La electroforesis bidimensional se realizó en dos etapas. Separación por isoelectroenfoque o punto isoeléctrico (pI) y separación por peso molecular (SDS-PAGE) (Misnan *et al.*, 2008). La separación por pI se realizó utilizando el fraccionador 3100 OFFGEL (Agilent Technologies, Monthey, Suiza) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizados (IPG) las cuales tienen un rango de pH de 3 a 10 de 24 cm de largo con recolección de muestra de 24 pocillos. Se cargó en total 1.6 mg de proteína en solución *stock* OFFGEL 1.25X (Urea 8.4 M, Tiurea 2.3 M, DTT 0.07 M, anfolito) y se enfocó a 64 kV/h, corriente máxima de 50 μ A, voltaje máximo 4,500 V por 52 h a 22 °C. Se recolectaron las 24 muestras y fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso. Por otra parte, la segunda etapa (separación por peso molecular), se realizó mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y reductoras (Laemmli, 1970). Se agregaron 12 μ L de muestra de los

pocillos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 del isoelectroenfoco con puntos isoeléctricos de 4.45, 4.47, 5.03, 5.32, 5.61, 5.9, 6.19, 6.48 y 6.77, respectivamente. Estos se corrieron en gel de poliacrilamida al 5 % gel *stocking* y 12 % gel separador a 15 mA por 15 min y 25 mA por 40 min. El gel obtenido durante este proceso se utilizó para realizar la electrotransferencia para los ensayos de inmunoreactividad.

Evaluación de Inmunoreactividad a IgE

Esta se realizó siguiendo la técnica de inmunotransferencia descrita por García-Orozco *et al.*, (2007) con ligeras modificaciones. Brevemente, los geles obtenidos a partir de la electroforesis bidimensional se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada con metanol al 99 % por 1 min. La transferencia se realizó a 200 mA por 1 h y 45 min en búffer Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20 %); posteriormente la membrana fue bloqueada con leche desgrasada al 5 % en buffer de bloqueo TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.5 %) durante 2 h a temperatura ambiente (Towbin *et al.*, 1979). La membrana se lavó tres veces por 5 min cada uno con buffer de lavado TTBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05 %). Después, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (*pool* de sueros de pacientes alérgicos), dilución 1:50 en buffer de lavado con agitación constante durante toda la noche a temperatura ambiente. Se lavó la membrana tres veces por 5 min con buffer de lavado y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti human IgE-HRP*) dilución 1:8000 durante 1 h. Se lavó la membrana dos veces por 5 min con buffer de lavado y una vez con buffer TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM). Las bandas fueron reveladas utilizando 3,3'-diaminobencidina (DAB) y H₂O₂ entre 5 y 10 min. Los sueros de los pacientes alérgicos fueron evaluados individualmente bajo las mismas condiciones de ensayo descritas anteriormente. Se utilizaron los sueros de los pacientes sin alergias a crustáceos como control negativo.

Identificación de Proteínas Inmunoreactivas Mediada por IgE por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

Las bandas de las proteínas alergénicas detectadas en la inmunodetección se compararon con un gel SDS-PAGE réplica corrido bajo las mismas condiciones y teñido con azul de Coomassie. Se seleccionaron las bandas que coincidieron con el pI y el peso molecular de la inmunodetección. Estas bandas fueron recortadas directamente del gel réplica y se mantuvieron en tubos separados con 50 μ L de agua Milli-Q a 4 °C para su identificación. Esta se realizó mediante servicio en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Brevemente, las muestras se redujeron utilizando ditioneitol (DTT) y se alquilaron con iodoacetamida. Además, las muestras fueron digeridas *in gel* utilizando como enzima proteolítica a la tripsina y se incubaron por 18 h a 37 °C. Para la obtención de la secuencia parcial de las proteínas se llevó a cabo una cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos con ionización nano-electrospray (ESI). La identificación de proteínas se realizó mediante el alineamiento de péptidos (BLAST) en la base de datos UniprotKB/Swiss-Prot (McCormack *et al.*, 1997).

Análisis Estadístico

De acuerdo con las características de esta investigación, el proyecto fue descriptivo por lo que no requirió de un análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Obtención del Extracto Proteico de la Jaiba Azul

A partir de las quelas de la jaiba azul se obtuvieron 5.1 ± 0.1 g de músculo en promedio. Así mismo, se obtuvo en promedio 9.9 ± 1.8 mg/mL de proteína. En la Figura 4 se muestra el patrón electroforético por SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se pueden observar una variedad de bandas proteicas. Ha *et al.* (2019) reportaron alrededor de 38 bandas en un rango de 200 a 11 kDa en el cangrejo morado (*Scylla tranquebarica*), así mismo Wu *et al.* (2019) encontraron en el extracto crudo del cangrejo crucifijo (*Charybdis feriata*) aproximadamente 22 bandas de 100 a 15 kDa. En la presente investigación a partir de los 5 g crudos del músculo de la jaiba azul, se detectaron 25 bandas en un rango de 100 a 6 kDa. Lo cual nos indica un patrón electroforético consistente con los reportado en otras especies.

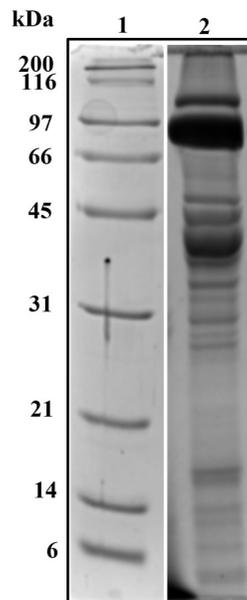


Figura 4. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE 12 %) del clarificado crudo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Carril 1, marcado de peso molecular de amplio rango (Biorad®); Carril 2, clarificado de la jaiba azul. SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. El gel se tiñió con azul del Commasie al 0.01%.

Análisis de la Separación Proteica por Electroforesis Bidimensional

El desarrollo de esta técnica se realizó en dos etapas: por separación por pI y por peso molecular. Para la primera etapa se utilizó el equipo 3100 OFFGEL (Agilent Technologies, Monthey, Suiza) donde se cargaron 1.6 mg de proteína para la separación por pI. En la Figura 5 se puede observar un esquema de la distribución de la muestra al momento de terminar el análisis. Se obtuvieron 24 fracciones líquidas del clarificado separadas por su punto isoeléctrico en un rango de pH de 3 a 10. El volumen de cada pocillo recolectado varió según el pH, en promedio se recuperaron 100 μ L por pocillo. Las muestras obtenidas se resguardaron y posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE). Para esto se seleccionaron las fracciones proteicas recolectadas en la primera etapa (separación por pI) en un rango de pH específico. Se partió del pI de 4.45 hasta 8.51. Se ha visto que la mayoría de las proteínas presentes en el músculo de origen marino como los peces y mariscos presentan un pI dentro del rango seleccionado (Ochiai y Ozawa, 2020). Además, también se encuentran las proteínas mayormente alergénicas en crustáceos como la AK y la tropomiosina (Leung *et al.*, 1998, Shen *et al.*, 2011, Lopata *et al.*, 2016).

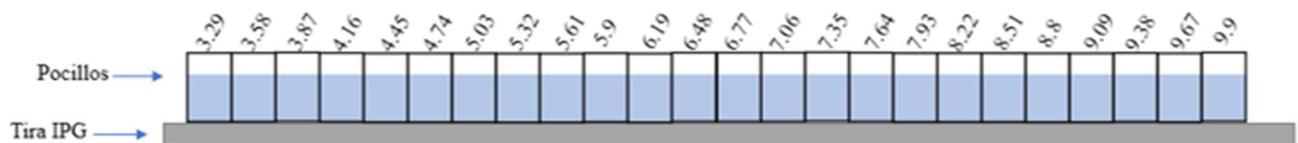


Figura 5. Diagrama de la distribución de pH en cada pocillo según la tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG).

Una variedad de proteínas alergénicas tanto en plantas, animales, como en alimentos, ha sido separadas y posteriormente identificadas gracias a la electroforesis bidimensional como la enolasa, aldehído deshidrogenasa mitocondrial, arginina cinasa, actina y la troponina (Martins *et al.*, 2017; Yadzir *et al.*, 2018; Huerta-Ocampo *et al.*, 2020). Específicamente en alimentos de origen marino como mariscos y crustáceos ha sido identificada la tropomiosina como el

principal alergeno, así como la paramiosina, la actina, también la parvalbúmina y la mioglobina, estas en rangos de 15 a 100 kDa (Rosmilah *et al.*, 2012; Ochiai y Ozawa, 2020). En la Figura 6 se puede observar los geles SDS-PAGE obtenidos a partir de las fracciones recolectadas en la primera dimensión. En el eje de las X se muestran los valores de los puntos isoeléctricos donde cada carril representa las fracciones recolectadas en la primera dimensión. Así mismo, en el eje de las Y se muestra la escala del peso molecular evaluada. Se pueden observar una variedad de bandas desde los 90 kDa hasta 6 kDa aproximadamente. Así mismo, la mayor concentración de bandas proteicas se encuentra en un rango de pI desde 4.45 hasta 6.77. Ha *et al.* (2019) reportaron una banda persistente a los 34-38 kDa en extractos proteicos del cangrejo de barro morado (*Scylla tranquebarica*), sugiriendo a la proteína tropomiosina como una molécula alergénica. También se han reportado proteínas como la cadena ligera de la miosina, la proteína sarcoplasmática de unión a calcio, la troponina, así como la triosa fosfato isomerasa, con pesos moleculares de: 17-20, 20.25, 20-21 y 28 kDa, respectivamente (Lopata *et al.*, 2016). Por otra parte, Piboonpocanun *et al.* (2011), encontraron una proteína inmunoreactiva a IgE en pacientes alérgicos a crustáceos, esta molécula fue reportada con un peso molecular de 75 kDa aproximadamente y fue identificada en el camarón gigante de malacia (*Macrobrachium rosenbergii*) como hemocianina. Además, en otros productos de origen marino como el pez del Nilo (*Lates niloticus*) o en cangrejos (*C. opilio*), se ha encontrado a la actina, una proteína altamente conservada, como un alérgeno importante (Rosmilah *et al.*, 2012; Tomm *et al.*, 2013).

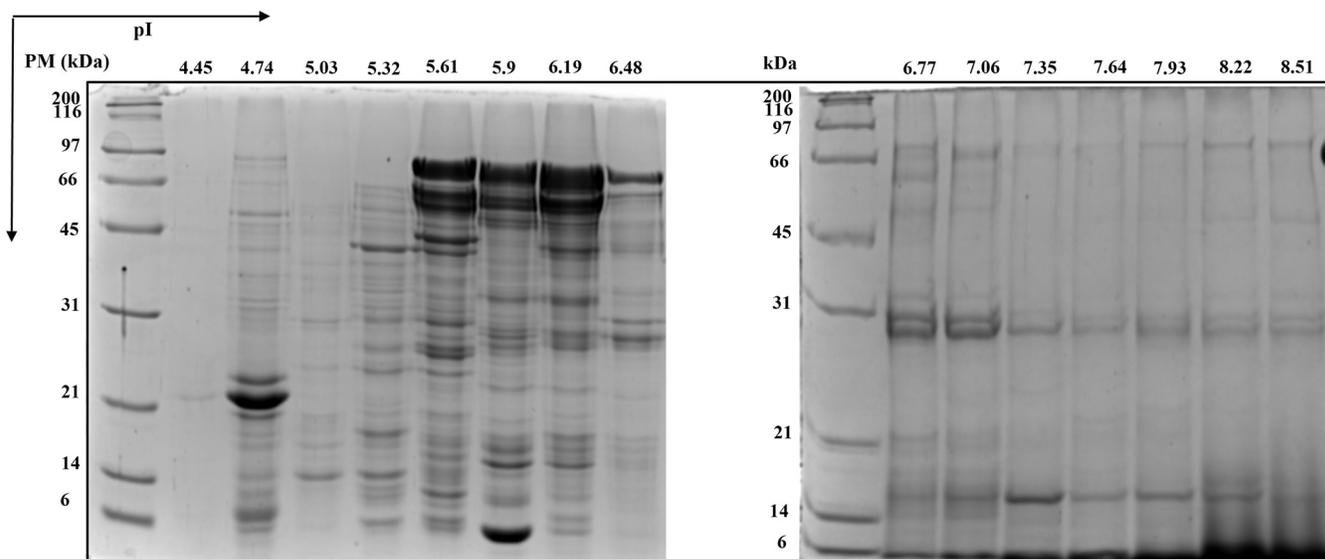


Figura 6. Electroforesis bidimensional de clarificado crudo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Separación proteica por punto isoeléctrico (eje X). Separación proteica por peso molecular (eje Y).

Inmunodetección de la SDS-PAGE y la Electroforesis Bidimensional del Clarificado Crudo de la Jaiba Azul (*C. arcuatus*)

Las proteínas del clarificado crudo de la jaiba se separaron por SDS-PAGE y electroforesis bidimensional. En ambos casos se inmunodetectaron las posibles proteínas reactivas contra IgE de los sueros de pacientes alérgico al consumo de la jaiba. En la Figura 7 se muestra la inmunodetección a partir de la SDS-PAGE, se utilizaron 3 sueros de pacientes alérgicos a crustáceos, incluyendo a jaibas (Fig. 7, carriles 3-5). Mientras que en la línea 6 se encuentra el suero de un paciente no alérgico a crustáceos. El carril 7 solo fue expuesto al anticuerpo secundario, es decir, sin sueros alérgicos o no alérgicos (control negativo). Como se puede observar, se encuentran algunas bandas inmunoreactivas en los pacientes alérgicos a crustáceos. Se detectan bandas a los 65-70 kDa, 31 a 45 kDa, así como algunas en el intervalo de 21 a 30 kDa. Se observó que la intensidad de las bandas varió entre cada paciente alérgico. Lo cual podría estar relacionado a que no todas las personas tienen la misma sensibilidad al organismo o bien, a sus proteínas (du Toit *et al.*, 2016). Por otra parte, en el carril número 6

(suero de paciente no alérgico) no se observan bandas inmunoreactivas, así como tampoco se observan bandas en el control negativo de la inmunodetección (carril 7).

Wu *et al.* (2019) trabajaron con el cangrejo crucifijo (*Charybdis feriatus*) y reportaron 12 proteínas alergénicas en un intervalo desde 18 kDa hasta los 200 kDa. Dentro de las proteínas identificadas se encontró la cadena ligera de la miosina (200 kDa), la hemocianina (75 kDa), la arginina cinasa (38 kDa), la troponina (24 kDa) y la triosa fosfato isomerasa (27 kDa). En el presente trabajo, y como se representa en la Figura 7, estas proteínas encontradas en el cangrejo crucifijo, probablemente se encuentren en la jaiba azul y sean las causantes de alergias en los pacientes. La banda de los 70 kDa en los carriles 3, 4 y 5, podría estar dada por la proteína hemocianina, así como la triosa fosfato isomerasa en bajos pesos moleculares. Por otra parte, también se han visto estas proteínas con pesos moleculares prácticamente iguales, en el camarón blanco (*L. vannamei*) así como también podrían estar presentes en otros cangrejos como el cangrejo de barro (*S. serrata*) (Ar *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018). Con esta información obtenida se procedió con la inmunodetección de las proteínas del clarificado crudo de la jaiba azul en dos dimensiones (peso molecular y por pI).

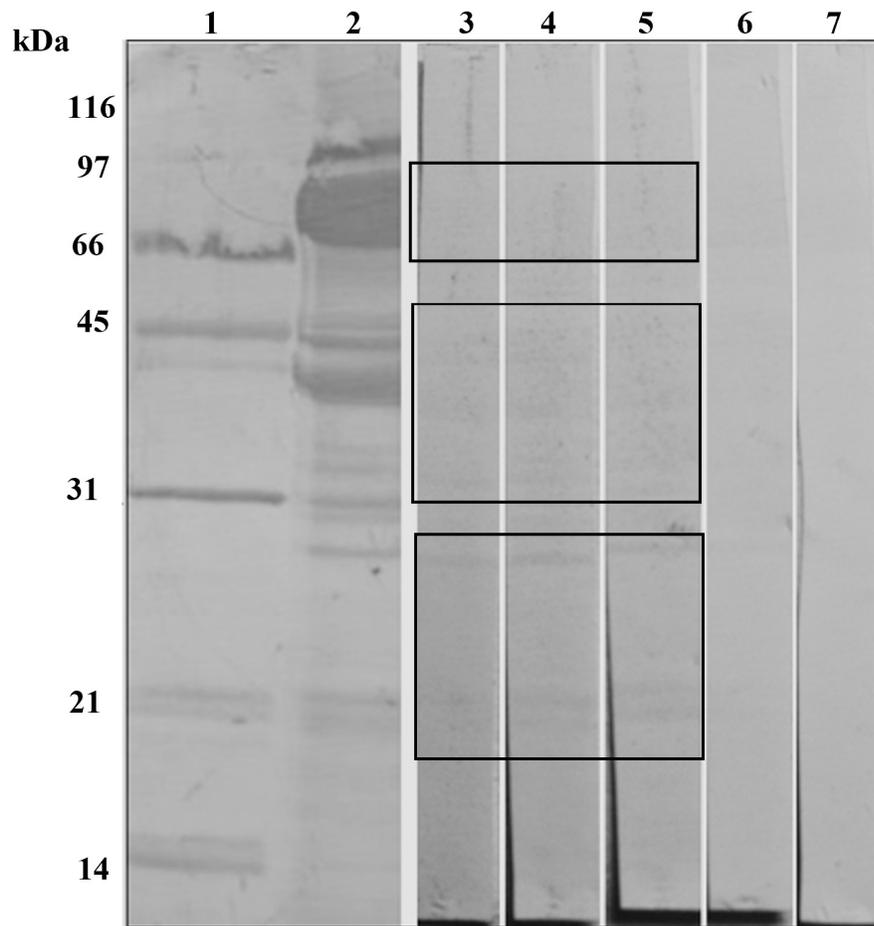


Figura 7. Inmunodetección de la SDS-PAGE del clarificado crudo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Carril 1) Marcador de peso molecular. Carril 2) Clarificado crudo del músculo de la jaiba azul. Carril 3, 4 y 5) Sueros de pacientes alérgicos. Carril 6) Suero de paciente no alérgico (control negativo). Carril 7) En presencia de anticuerpo secundario, sin sueros de pacientes alérgicos (control negativo).

En la Figura 8 se pueden observar bandas inmunoreactivas desde los 21 kDa hasta los 90 kDa aproximadamente; así como respectivos valores de pI desde 5.03 a 6.48 evaluados. Dentro de este intervalo se han reportado la mayoría de las proteínas alérgicas en crustáceos. Estudios realizados en crustáceos como el camarón de agua dulce (*Macrobrachium nipponense*) han demostrado que la hemocianina es un importante alérgeno termoestable de aproximadamente 75 kDa (Srinroch *et al.*, 2015). También se ha visto inmunoreactividad de pacientes alérgicos a

una proteína de 72-75 kDa en el camarón gigante de malasia (*Macrobrachium rosenbergii*) la cual fue identificada como hemocianina. Además, en el estudio de Wu *et al.* (2019), se reportó que la hemocianina como un alérgeno importante en el cangrejo crucifijo (*Charybdis feriata*); la cual tiene un peso molecular de 75 kDa. Brassea-Estardante *et al.* (2022) reportaron a la arginina cinasa como un alérgeno presente en el cangrejo café (*Callinectes bellicosus*), esta proteína se identificó con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa. Además, Rosmilah *et al.* (2012), también identificaron a la arginina cinasa como alérgeno en el cangrejo nadador azul (*Portunus pelagicus*) con peso molecular de 41 kDa y pI de aproximadamente 6.2. Los autores también identificaron a la tropomiosina como un fuerte alérgeno en este crustáceo, reportando un peso molecular de 36 kDa y pI de 4.7. También se ha visto que la troponina con peso molecular de aproximadamente 21 kDa es un importante alérgeno en crustáceos (Buermeister *et al.*, 2011). En la Figura 8 se observan varias bandas de proteínas inmunoreactivas, como la banda de ~ 40 kDa con pI de 5.03 (número 1), la banda de 70 kDa con pI de 5.61 (número 2), la banda de 25 kDa y pI de 5.9 (número 3), así como la banda de aproximadamente 50 kDa con pI de 6.19 (número 4). Estas proteínas inmunoreactivas de la jaiba azul (*C. arcuatus*) coinciden en sus pesos moleculares y pI con las ya reportadas, sugiriendo fuertemente, estar presente en este crustáceo, como la α -actina, la hemocianina y la triosa fosfato isomerasa, siendo así las principales proteínas alergénicas causantes de una respuesta inmune originada por alimentos (Yang *et al.*, 2017; Barre *et al.*, 2018; Jasim *et al.*, 2021).

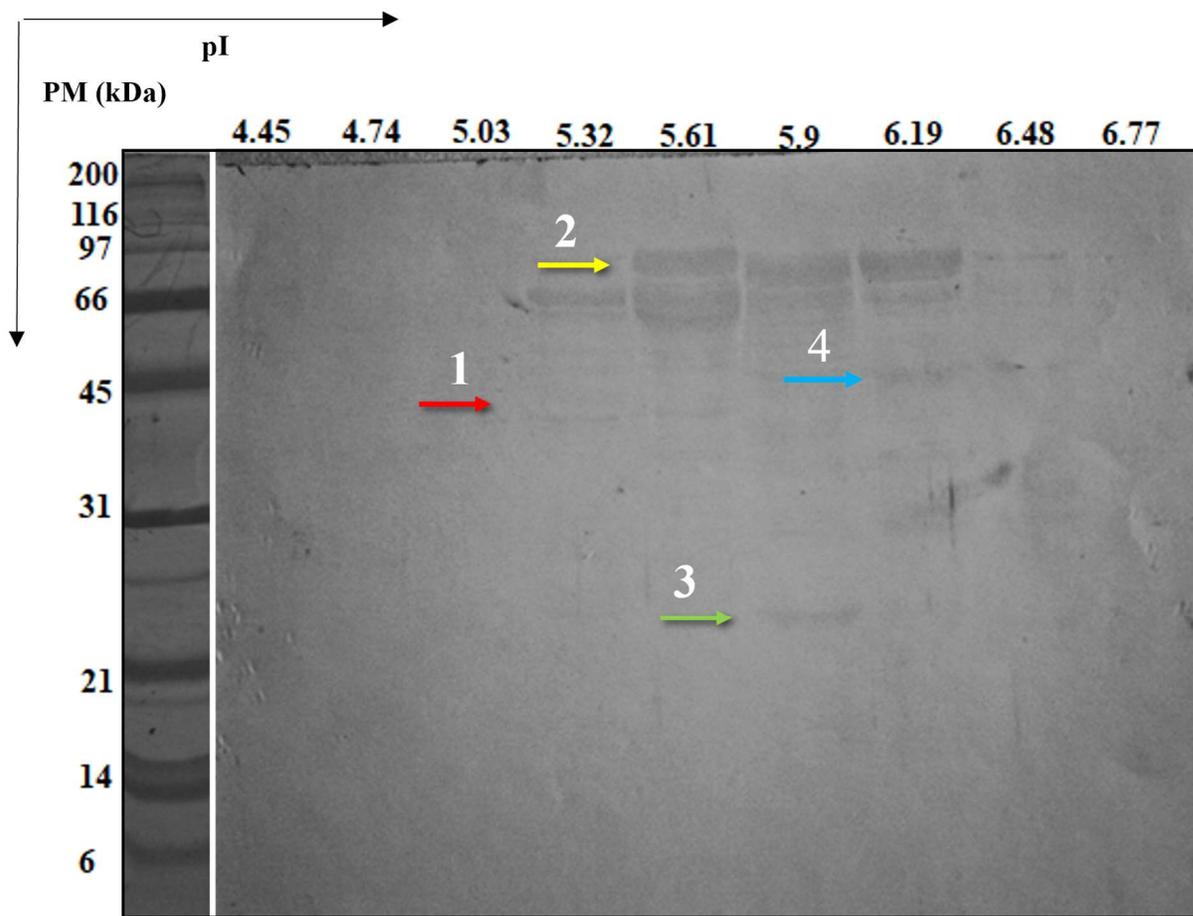


Figura 8. Inmunodetección del clarificado crudo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Eje X Separación proteica por pI. Eje Y separación proteica por peso molecular. Con flechas marcadas como 1, 2, 3 y 4 se representan las bandas seleccionadas para la secuenciación por LC-MS/MS.

Proteínas Identificadas por Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS)

La selección de estas bandas se hizo mediante un análisis previo, con base en una búsqueda bibliográfica de las proteínas inmunoreactivas a IgE en crustáceos, tomando como criterio de selección el peso molecular y pI; y por supuesto la inmunoreactividad. Al realizar la comparación entre la inmunodetección y el gel de la 2D réplica, las bandas seleccionadas tenían alta semejanza tanto en peso molecular y pI con las siguientes proteínas alergénicas: la

tropomiosina, troponina, hemocianina, arginina cinasa, actina y la triosa fosfato isomerasa (Mohamad *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019). Bajo esta primicia, las bandas recortadas y digeridas con tripsina, se analizaron por espectroscopía de masas para obtener la secuencia parcial de las proteínas y proceder a la identificación; y posteriormente, al análisis de comparación de secuencias con las bases de datos de alérgenos. Para esto las bandas se recortaron directamente de un gel 2D réplica como se muestra en la Figura 9.

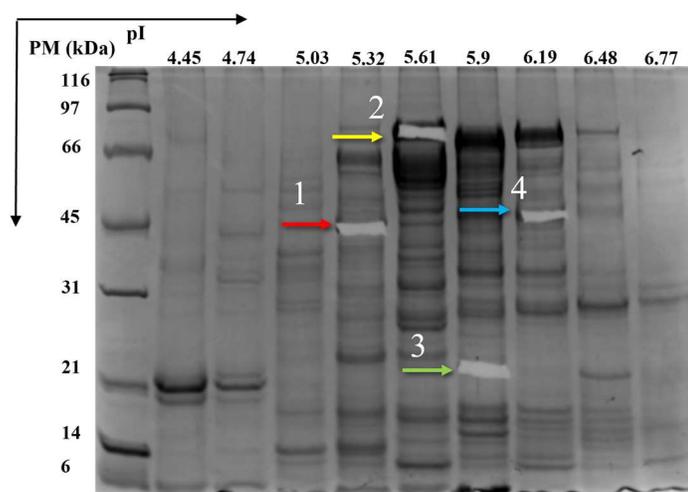


Figura 9. Gel bidimensional (2D) del clarificado crudo de la jaiba azul (*C. arcuatus*). Las flechas y los números marcados del 1 al 4 representan a las bandas seleccionadas y recortadas directamente del gel.

En la Tabla 3 se muestran las proteínas inmunoreactivas a IgE identificadas de la jaiba azul. En esta tabla se indican la secuencia de los péptidos obtenidos del servicio de identificación de proteínas. Además, la comparación de los datos de pI y PM obtenidos en este trabajo, así como los reportados para los alérgenos que se tomaron como referencias, el organismo en el que se identificó y el porcentaje de identidad de cada péptido. En primera instancia, los péptidos obtenidos fueron comparados con las bases de datos de alérgenos mediante el algoritmo BLASTp[®] de la plataforma Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). Dada la información recopilada, cada péptido presentó una

identidad del 100 % en dos de las proteínas de referencia; las cuales corresponden a: la α -actina y la triosa fosfato isomerasa. En el caso de la hemocianina, los péptidos variaron en su identidad desde el 50 hasta el 100 % (Tabla 3). Estas proteínas fueron reportadas como alérgenos en otros crustáceos como la langosta americana (*H. americanus*), el cangrejo de manglares (*S. serrata*) y el cangrejo de barro (*S. paramamosain*).

Tabla 3. Proteínas alergénicas identificadas en la jaiba azul (*C. arcuatus*).

Banda	PM/pI observado	PM/pI calculado	Proteína Identificada	Organismo referencia	*Péptidos Encontrados e Identidad
1	40 kDa/5.32	42 kDa/5.31	α -actina	<i>Homarus americanus</i>	SYELPDGQVITIGNER (100 %) AGFAGDDAPRAVFPISIVGRPR (100 %) TTGIVLDTGDGVTHTVPIYEGYcLPHAIL (100 %) GYSFTTTAER (100 %) EITALAPPTIK (100 %) DLTAYLTK (100 %) DAYVVGDEAQSK (100 %)
2	70 kDa/5.61	77 kDa/5.54	Hemocianina	<i>Scylla serrata</i>	YDNNHVEFSFNEGR (84 %) VYEEIRDPHLK ELSQSFDP LSGHYDDDGVA AK (93 %) YMDNIFR (100 %) HWFSLFNTR (89 %) IITGVSNEFK (100 %) VRDMLILESR (70 %) DALAHGYFTGR (100 %) KGESFFVWHHQLTVR (81 %) WNAIELAK (50 %) FALPPGVLEHFETATR (100 %)
3	21 kDa/5.9	16 kDa/5.31	Triosa fosfato isomerasa	<i>Scylla paramamosain</i>	GAFTGEISPAMIK (100 %) NVFGEPDQLISEK (100 %)

* El valor entre paréntesis indica el porcentaje de identidad de la secuencia respecto a la proteína del organismo de referencia

Adicionalmente, en la Figura 10 se muestra el multialineamiento de la α -actina de distintos organismos (peces y cangrejos) como el cangrejo azul (*Portunus trituberculatus*), la langosta americana (*Homarus americanus*), artemia (*Artemia franciscana*) y también del pez-arroz (*Oryzias latipes*). En sombreado gris están representados los 7 péptidos identificados en *C. arcuatus* (Tabla 3) correspondientes a la banda inmunoreactiva 1 (Figura 8). Donde se observa que los 7 péptidos son idénticos a la α -actina de la langosta americana (*H. americanus*). Además, los péptidos marcados con 1 y 6 tienen únicamente dos variaciones en los residuos en todos los organismos, seguido de los péptidos 2, 4, 5, 7 y 3. Por lo tanto, la proteína con inmunoreactividad de IgE obtenida de la jaiba azul corresponde al alérgeno α -actina. Cabe mencionar que Rahaman *et al.* (2012), estudiaron a *C. opilio* para determinar los posibles alérgenos presentes en el músculo de este crustáceo. Estos autores reportaron varias proteínas alergénicas como: la arginina cinasa, la tropomiosina, la proteína de unión a calcio sarcoplasmática, la troponina y la α -actina. Esta última fue identificada con espectroscopía de masas con un peso molecular de 42 kDa. Por otra parte, la α -actina ha sido reportada como un alérgeno importante no sólo en crustáceos, sino también en otros organismos de origen marino como la almeja (*Carpet clam*; Mohamad *et al.*, 2015). En esta investigación, la proteína fue reportada como alergénica, con peso molecular de 42 kDa, pI de 5.3. En este sentido, la proteína identificada en *C. arcuatus* coincide con su peso molecular de (aprox. 40 kDa) y punto isoeléctrico (5.3) con respecto a la α -actina de *H. americanus*, *C. opilio* y *Carpet clam*. En conjunto, la proteína con capacidad de interactuar con sueros de pacientes alérgicos (a través de IgE) y con el PM y pI obtenida de la jaiba azul (*C. arcuatus*) corresponde a la α -actina; la cual se ha demostrado que es capaz desencadenar reacciones alérgicas en humanos en otros crustáceos.

La actina es una proteína altamente abundante en las células eucariotas, así como conservada entre especies (Jung *et al.*, 2013). Esta molécula participa principalmente en la contracción muscular, además del movimiento interno de vesículas, fagocitosis, en la división celular, hasta en señalizaciones celulares (Cadoret *et al.*, 1999). Para lograr el movimiento del músculo, es necesario la intervención de otras proteínas como la tropomiosina, troponina y sobre todo la miosina (Lehman *et al.*, 2020). Esta última se une directamente con una serie de filamentos de actina (cabeza de la miosina-filamento de actina), y ATP. Esta unión prova la

disociación entre la actina y la miosina. Una vez sucedido esto, el ATP es hidrolizado y comienza una serie de cambios conformacionales en todo el complejo, generando ADP y P_i asociados a la miosina. Este proceso hace que la miosina se una nuevamente a la actina liberando el P_i . Esta liberación genera una fuerza mecánica por nuevamente un cambio conformacional produciendo el desplazamiento entre la actina y la miosina, lo cual se traduce a movimiento o contracción muscular (Lehninger *et al.*, 2009). Esta gran importancia que tiene la actina en los procesos celulares, principalmente en el músculo, hace que sea una proteína importante englobando hasta el 10 % del total de proteínas celulares (Jung *et al.*, 2013). Al estar presente en partes comestibles en organismo (músculo), por ejemplo, crustáceos como el cangrejo o bien otros animales marinos, podría ser más probable que un individuo susceptible, alérgicamente hablando, pueda desarrollar algún tipo de reacción adversa a este alimento (Jasim *et al.*, 2021). Así como se mostró en la presente investigación, en la jaiba azul y partir del músculo de esta, las IgE del suero de personas alérgicas a crustáceos reaccionaron en presencia la α -actina.

		1	2	
<i>P. trituberculatus</i>	MCDDDEDGVALVCDNGSGMVKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRARHQGVMVGMGQKDAYVVGDEA		60
<i>H. americanus</i>	MCDDDDVSPLVVDNGSGMVKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRPRHQGVMVGMGQKDAYVVGDEA		60
<i>A. franciscana</i>	MCGD-EVTALVIDNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEA		59
<i>O. latipes</i>	MCDEETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFP	SIVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEA		60
	.* :	** ***:	***** *****:*****	
<i>P. trituberculatus</i>	QAKRGILTLKYP	IEHGIIITNWDDMEKIWHHTFYNELRV	AAPEESPTMLTEAPLNPKANREK	120
<i>H. americanus</i>	QSKRGILTLKYP	IEHGIIITNWDDMEKIWHHSFYNELRIA	PEESPVLLTEAPLNPKANREK	120
<i>A. franciscana</i>	QSKRGILTLKYP	IEHGVVTNWDDMEKIWHHTFYNELRV	AAPEEHPVLLTEAPLNPKANREK	119
<i>O. latipes</i>	QSKRGILTLKYP	IEHGIIITNWDDMEKIWHHTFYNELRV	AAPEEHPTLLTEAPLNPKANREK	120
	*:*****:	*****:*****:*****	*:*****	
		3		
<i>P. trituberculatus</i>	MTQIMFESFSLPAMYVTIQAVLSLYASGR	TGQVCDSDGQVSHVVPVYEGYALPHAINRL		180
<i>H. americanus</i>	MTQIMFEIFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR	TGIVLDTGDGVTHTVPIYEGYCLPHAILRL		180
<i>A. franciscana</i>	MTQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR	TGIVLDSGDGVSHVPIYEGYALPHAILRL		179
<i>O. latipes</i>	MTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGR	TGIVLDAGDGVTHNVPVYEGYALPHAIMRL		180
	***** *	*****:***** *	*:***** *	
		4	5	
<i>P. trituberculatus</i>	DLAGRDLTAYLMKIMTERGYSFTTTAERE	IVRDIKEKLCYIALDFESEMNVAAASSSLDK		240
<i>H. americanus</i>	DLAGRDLTAYLTKIMTERGYSFTTTAERE	IVRDIKEKLCYVALDFENEMNIAASSSVEK		240
<i>A. franciscana</i>	DLAGRDLTDYLMKILTERGYFTTTAERE	IVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSTSLEK		239
<i>O. latipes</i>	DLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAERE	IVRDIKEKLCYVALDFENEMATAASSSLEK		240
	***** ** *	*****:***** *	***** ** *:***:*	
		6		
<i>P. trituberculatus</i>	SYELPDGQVITIGNERFRAPEALFQPSFL	GMESVGLHETVYSSIMRCDIDIRKDLFANIV		300
<i>H. americanus</i>	SYELPDGQVITIGNERFRCPESLFQPSFL	GMESVGIHETVYNSIMRCDIDIRKDLFANNV		300
<i>A. franciscana</i>	SYELPDGQIITIGNERFRCPALFQPSFL	GMETCGIHETAYNSIMKCDVIDIRKDLYANTV		299
<i>O. latipes</i>	SYELPDGQVITIGNERFRCPETLFQPSFI	GMESAGIHETAYNSIMKCDIDIRKDLYANNV		300
	*****:***** *	*****:***** *	*:***** *	
		7		
<i>P. trituberculatus</i>	MSGGTTMYPGIADRMQKEITSLAPSTL	KIKIVAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQAMWIT		360
<i>H. americanus</i>	LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPPTIK	IKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQTMWIT		360
<i>A. franciscana</i>	LSGGTTMYPGIADRMQKEITMLAPSSMK	IKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS		359
<i>O. latipes</i>	LSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTM	IKIIAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWIS		360
	:*****:***** **	:*****:***** **:		
<i>P. trituberculatus</i>	KEEYEESGPGIVHRKCF			377
<i>H. americanus</i>	KEEYDESGPGIVHRKCF			377
<i>A. franciscana</i>	KQEYDESGPSIVHRKCF			376
<i>O. latipes</i>	KQEYDEAGPSIVHRKCF			377
	*:***:***:*****			

Figura 10. Alineamiento de la α -actina en diferentes organismos marinos (peces y cangrejos). En sombreado gris se representa los péptidos resultantes en el análisis LC-MS/MS de la jaiaba azul (*C. arcuatus*). *Portunus trituberculatus* No. Acceso: XP_045108201.1, *Homarus americanus* No. Acceso: Q962V5, *Artemia franciscana* No. Acceso: Q9U612, *Oryzias latipes* No. Acceso: Q98972.

En sombreado gris están representados los 10 péptidos identificados en *C. arcuatus*. Donde se observa que estas moléculas son idénticas en la hemocianina del crustáceo *C. sapidus*. Además, los péptidos marcados con 3 y 5, también son idénticos en *M. magister* y en *S. paramamosain*. Los péptidos restantes (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10) tienen pequeñas variaciones en algunos residuos.

En este sentido, también se realizó el análisis de la secuencia de 10 péptidos encontrados para la banda inmunoreactiva 2 de 70 kDa y pI de 5.61 (Tabla 3 y figura 8) obtenida del músculo de *C. arcuatus* mediante al algoritmo BLASTp[®]. De estos péptidos se encontró que compartían, la mayoría, una identidad desde el 81 hasta el 100 % a la hemocianina de del cangrejo nadador (*Scylla serrata*) (Tabla 3). Además de coincidir con la proteína hemocianina de varios crustáceos como el cangrejo dungeness (*Metacarcinus magister*), el cangrejo azul del atlántico (*Callinectes sapidus*) como se muestra en el multialineamiento en la figura 11. En este sentido y sombreado gris, están representados los 10 péptidos identificados en *C. arcuatus*. Donde se observa que estas moléculas son idénticas en la hemocianina del crustáceo *C. sapidus*. Además, los péptidos marcados con 3 y 5, también son idénticos en *M. magister* y en *S. paramamosain*. Los péptidos restantes (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9 y 10) tienen pequeñas variaciones en algunos residuos. Estudios realizados en cangrejos del género *Scylla* han demostrado que existen moléculas causantes de alergias en humanos. Estas moléculas han sido identificadas como proteínas presentes en el músculo como lo reportó Jasim *et al.* (2021). En dicha investigación se reportaron como proteínas alergénicas: la arginina cinasa, la actina y la hemocianina en el cangrejo morado (*Scylla tranquebarica*). Los autores encontraron que la hemocianina es uno de los mayores alérgenos en este crustáceo con un peso molecular de 73 kDa y un punto isoeléctrico de 5.7. Estos datos concuerdan con la proteína identificada en *C. arcuatus* incluyendo el peso molecular, el punto isoeléctrico, así como la reactividad a IgE de personas alérgicas a crustáceos. Además, se ha visto que la hemocianina también es inmunoreactiva a IgE de pacientes alérgicos en otros crustáceos como el camarón de agua dulce (*Macrobrachium nipponense*), el camarón gigante de malasia y el cangrejo crucifijo (*Charybdis feriata*), todas con pesos moleculares de 72-75 kDa (Srinroch *et al.*, 2015; Wu *et al.* 2019) Por lo tanto, la proteína alergénica corresponde a la hemocianina.

Sin duda, la hemocianina es una de las proteínas más importantes para la supervivencia ya que es la principal encargada de transporte de oxígeno en la hemolinfa de moluscos y artrópodos. La unión del oxígeno (O_2) se da gracias a la coordinación entre iones de cobre (Cu^+) (Markl y Decker, 1992). La hemocianina se encuentra como hexámeros o bien, en múltiplos de los mismo, además, las subunidades se pligan en tres dominios dentro de los cuales se encuentra el sitio activo, es decir, la unión de (O_2) (Decker *et al.*, 2007). Un dato interesante es que, en comparación de la hemoglobina, la cual al ser oxigenada a través del hierro en el grupo hemo, la molécula toma un color rojo. Sin embargo, en los crustáceos, por ejemplo, la hemocianina se oxigena y debido al cambio de estado del CuI a CuII se torna de color azul (Coates y Nairn, 2014). También es importante mencionar que la hemocianina por evolución debió de adaptarse a los distintos cambios de temperatura, esto a que los organismos se encuentran en diferentes hábitats (temperatura, estrés, etc), lo que hace que esta proteína sea altamente resistente a los cambios como el congelamiento, descongelamiento y calentamiento (Coates y Costa-Paiva, 2020). En la presente investigación se encontró a la hemocianina como proteína inmunoreactiva a IgE a partir del musculo de la jaiba azul crudo, sin embargo, se ha visto que incluso con tratamientos ácidos y por cocimiento del crustáceo al vapor, sigue manteniendo estabilidad y reactividad a IgE (Rahman *et al.*, 2011; Jasim *et al.*, 2021).

		1	
<i>M. magister</i>	MKLLVLFALVAAAVWPSFGMMADSAG-APDAHKQHDVNSVLWKVYEDIRDPHLKELSQS		59
<i>C. sapidus</i>	MKLLLLCALVAGASAWPNFGMMADSPGGASNAQKQHDVNSILWKVYEEIRDPHLKELSQS		60
<i>S. paramosain</i>	MKVLVLCALVAAAVWPNFGMMADSLGGASDAQKQHDVNSILWKIYGEICDPHLKELSQT **:*.* ****.* .**.****** * * :*.******:***:* :* *****:		60
	2	3	
<i>M. magister</i>	FDPLSGHYDDDGVAAKRLMKELNENRLLLEQNHWFSLFNTRQRKEALMLYDVLEHSTDWST		119
<i>C. sapidus</i>	FDPLSGHYDDDGVAAKRLMKELNDRLLLEQKHWFSLFNTRQREALMLYDVLEHSTDWET		120
<i>S. paramosain</i>	FDPLSGHYDDGGVSARRLMKELNDERLLEQKHWFSLFNTRQRQEALMLYDVLEHSTDWDT *****.*:*.******:.******:*****:*****:*****:*****.*		120
<i>M. magister</i>	FAGNAAFFRVMNEGEFVYALYAAVIHSELTQHVVLPPLYEVTPHLFTNSEVIQAYKAK		179
<i>C. sapidus</i>	FAGNAAYFRVMNEGEFVYAIYAAVIHSPLTEHVVLPLLYEVTPHLFTNSEVIQAYKAK		180
<i>S. paramosain</i>	FAGNAAFFRVMNEGEFVYAIYAAVHSHLTEHVVLPLLYEVTPHLFTNSGVIQAYKAK *****.*:*.******:****.* **:******:***** ** *****		180
<i>M. magister</i>	MTQTAAKIESHFTGSKSNPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWDDAHENHHIERKG		239
<i>C. sapidus</i>	MTQTASKIKSHFTGSKSNPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWDDSHENHHINRKG		240
<i>S. paramosain</i>	MTQTAVTIKSQFTGSKSNPEQRVAYFGEDIGMNTHHVTWHLEFPFWDDAHEDHHIDRKG *****.*:*.******:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		240
	4		
<i>M. magister</i>	ESFFVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVDELHWDDVIHEGFAPHTMYKYGGFPSRPDVF		299
<i>C. sapidus</i>	ESFFVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVDELHWDDMIHEGFAPHTMYKYGGFPSRPDVF		300
<i>S. paramosain</i>	ESFFRVHHQLTVRFDAERLSNYLDPVNELEHWDDVIYEGFAPHTMYKYGGFPSRPDVF **** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		300
	5	6	
<i>M. magister</i>	EDVDGVARVRDMLILESRIADIAHGYVTGRDGSIIISISDSHGIDVLGDVIESSLYSPNP		359
<i>C. sapidus</i>	EDVDGVARVRDMLILESRIADIAHGYFTGRDGSVISIRDAHGIDILGDVIESSLYSPNP		360
<i>S. paramosain</i>	EDVDGVARVRDMLILESRIADIAHGYFTGRDGSVISIRDAHGIDILGDVIESSLYSPNP *****:*****:*****:*****:*****:*****:***** *****		360
	7	8	
<i>M. magister</i>	EYYGALHNTAHMMLGRQGDPHGKFDLPPGVLEHFETATRDPAFFRLHKYMDNIFREHKDS		419
<i>C. sapidus</i>	EYYGSLHNTAHVMLGRQGDPHGKFALPPGVLEHFETATRDPAFFRLHKYMDNIFREHKDS		420
<i>S. paramosain</i>	EYYGSLHNTAHVMLGRQGDPHGKFALPPGVLEHFETATRDPAFFRLHKYMDNIFREHKDS *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		420
<i>M. magister</i>	LTPYTKDELEFPGIEIDSFSLSNRLETYFEDFEYSLINAVDDTAEIADVPDISTVVKRLTH		479
<i>C. sapidus</i>	LTPYTKDDELEFSGISVDSLDSNRLETHFEDYEYSLINGVDDTVDVLDVPDISTVVSRLTH		480
<i>S. paramosain</i>	LTPYTKDELEFSGVSEGITFSNRLETHFEFEYSLVNAVDDTTEVADVPISAKVDRLTH *****:*** * :.:.: :*****:***:****.* *****: *****: * .****		480
	9		
<i>M. magister</i>	KSFTAKCVINNNNEHDVIATVRIFAWPKYDNNHVEFSFNDRWNAIEMDKYWTKLTPGPN		539
<i>C. sapidus</i>	NDFKVKIGITNSQNHEVLATVRIFAWPKYDNNHVEFSFNEGRWNAIELAKFWTKLNSGSN		540
<i>S. paramosain</i>	NDFTLKIDITNNNDHDVLTATVRIFAWPKYDNNHVEFSFNEGRWNAIEMDKFWVKLGGGSN :.*. * *.*.:*:*.******:*****:*****:*****:*****:*****:*****		540
<i>M. magister</i>	TITRSSMDSSVTPDVPSFLLTIEKTEEAUVSSGSELHLEDYVSGLGLPNRFLLSKGTTKG		599
<i>C. sapidus</i>	IIERSSKDFGVTVPDVPSFQLTMDMTDEALGSGSALHLEDYVSGLGLPDRFLLPKGKTEG		600
<i>S. paramosain</i>	HITRSSKLSAVTVPDVPSFHSLIEKAEALASGSELHLEEHSSLGLPNRFLLPKGKTEG * ** .***** :*.: :***.* ** * ** * * .*****:*** * .**.*		600
		10	
<i>M. magister</i>	MDFHVVVFSVDGAKDAAIDGLLENTSFNHYGAHSGKYPDKQPHGYPLDRRVDDKRIITGV		659
<i>C. sapidus</i>	MDFHVVVFSVDGAKDAAVDGLHESTTYNHYGCHDGTYPDNQPHGYPLDRRVDDERIITGV		660
<i>S. paramosain</i>	MDFHVVVFSVDGAKDGAVALHESTTFNHYGCEGKYPDKQPHGYPLDRRVDDERIISGV *****:*****:*. * *.*.:*****:*. * **.******:*****:*****:***		660
<i>M. magister</i>	TNFKGMDVKVYHVEEQ	675	
<i>C. sapidus</i>	SNFKAVDVKVYHVEDH	676	
<i>S. paramosain</i>	SNFFSTDVKVFHIEGQ :** . *****:*** :	676	

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la hemocianina en diferentes crustáceos. En sombreado gris se representa los péptidos resultantes en el análisis LC-MS/MS de la jaiba azul (*C. arcuatus*). *Metacarcinus magister* No. Acceso: Q5G2A5, *Callinectes sapidus* No. Acceso: Q9NGL5, *Scylla paramamosain* No. Acceso: AKC96433.1.

Por último, también se obtuvo la secuencia parcial de la banda reactiva a IgE 3 encontrada en *C. arcuatus* con un peso molecular aproximado de 21 kDa y un pI de 5.9. En este caso se obtuvieron dos péptidos (GAFTGEISPAMIK y NVFGEPDQLISEK) (Tabla 3 y figura 8). Al igual que las proteínas anteriormente identificadas, se analizaron los péptidos mediante el algoritmo BLASTp[®]. Se encontró que ambos péptidos (1 y 2) cuentan con el 100 % de identidad a la proteína triosa fosfato isomerasa del cangrejo de barro (*Scylla paramamosain*). En la Figura 12 se muestra el multialineamiento de la triosa fosfato isomerasa en distintos organismos como el cangrejo azul de Core del Sur (*Portunus trituberculatus*), el camarón gris (*Crangon crangon*), el cangrejo de barro (*S. paramamosain*), el cangrejo de barro anaranjado (*Scylla olivacea*), y los cangrejos de río (*Archaeopotamobius sibiricus* y *Procambarus clarkii*). Se destaca que, en todos estos organismos, los péptidos encontrados en la jaiba azul son idénticos. Además, la triosa fosfato isomerasa ha sido estudiada e identificada como alérgeno en *A. sibiricus* (alérgeno: Arc s8), *C. crangon* (alérgeno: Cra c 8) y *P. clarkii* (alérgeno: Pro c 8) (Bauermeister *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017; Barre *et al.*, 2018). Así mismo, en *S. paramamosain* (alérgeno: Scy p8) también fue identificada como una proteína inmunoreactiva a IgE (Yang *et al.*, 2019). Esto aporta información que coincide directamente con nuestros hallazgos dado que, como se mostró en la Figura 8, los sueros de los pacientes alérgicos a crustáceos reaccionaron a esta proteína. Cabe destacar que la Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas (International Union of Immunological Societies o IUIS) menciona que la triosa fosfato isomerasa es una proteína importante presente en los alimentos que tiene la característica de generar reacciones alérgicas en individuos susceptibles (Bauermeister *et al.*, 2011).

La triosa fosfato isomerasa (EC 5.3.1.1) es una proteína con función enzimática, se encarga de la interconversión entre el fosfato de dihidroxiacetona y el D-glicaraldehído-3-fosfato en la

glucólisis y en la gluconeogénesis (Figura 13). Para ello, utiliza el grupo carbonilo tanto del dihidroxiacetona como del D-glicaraldehído-3-fosfato. La enzima utiliza un mecanismo de transferencia de protones donde comienza por este grupo carbonilo para ser posible la reacción de isomerización (Wierenga *et al.*, 2010; Lopez-Zavala *et al.*, 2016). Esta proteína de gran importancia para el proceso energético en crustáceos se encuentra en el citoplasma de las células, además de estar distribuida ampliamente entre organismos; desde bacterias, hongos hasta plantas y animales. Esto conlleva a que los procesos alérgicos asociados a esta proteína se vean distribuidos en una amplia gama de alimentos (Yang *et al.*, 2017). Como es el caso de la jaiba azul, la cual hemos investigado y encontrado que la triosa fosfato isomerasa en este organismo, puede desencadenar respuestas alérgicas en individuos susceptible a este tipo de alimentos. Por otra parte, a pesar de que se lograron obtener dos péptidos de la banda que representa a la proteína de 21 kDa y un pI de 5.9, estos son muy importantes en los procesos del desarrollo de la respuesta alérgica al consumo de la jaiba en humanos (Yang *et al.* 2019). Así mismo, esta proteína se ha reportado con peso molecular cercano al que se encontró en el presente trabajo (An *et al.*, 2013; Barre *et al.*, 2018). Debido a esto, podemos sugerir que la proteína identificada en *C. arcuatus* es la triosa fosfato isomerasa. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios para mejorar la calidad de la muestra y obtener de esta manera, una mayor cantidad de secuencias de péptidos que permitan una identificación del alérgeno con mayor precisión.

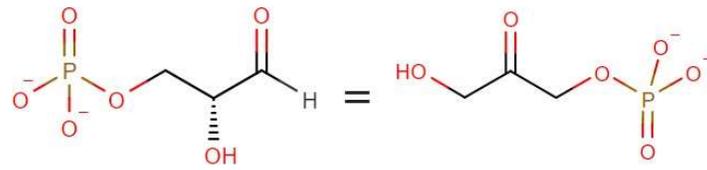


Figura 13. Interconversión del fosfato de dihidroxiacetona y el D-glicaraldehído-3-fosfato por la triosa fosfato isomerasa.

CONCLUSIONES

En presencia de sueros de individuos alérgicos a la jaiba y crustáceos, dentro de la complejidad de proteínas obtenidas en el clarificado del músculo de la jaiba azul (*C. arcuatus*), se identificaron tres proteínas inmunoreactivas a IgE utilizando sueros de pacientes alérgicos al consumo de este crustáceo: la hemocianina, la α -actina y la triosa fosfato isomerasa.

RECOMENDACIONES

Separar individualmente a las proteínas alergénicas identificadas en este trabajo ayudará a mejorar la reactividad a IgE. Además, se recomienda realizar estos estudios utilizando una mayor cantidad de sueros de pacientes alérgicos a la jaiba y/o a crustáceos. Así como obtener la secuencia completa de las proteínas alergénicas para posteriores análisis estructurales e identificar los posibles epítopes en cada una de estas moléculas.

ANEXO 1

CUESTIONARIO PARA LA SELECCIÓN DEL GRUPO DE ESTUDIO

Fecha:

Nombre: _____ **Edad:** _____ **Sexo:** _____

1- Dentro de sus familiares, ¿alguno presenta problemas de alergias? Si su respuesta es positiva indique qué tipo de alergias (a comida, polen, etc.).

2- ¿Usted ha tenido episodios alérgicos al consumir alguno de los siguientes alimentos? (Marque el o los alimentos por favor).

- | | |
|-------------------------------|---|
| <input type="radio"/> Jaiba | <input type="radio"/> Langosta |
| <input type="radio"/> Pescado | <input type="radio"/> Camarón |
| <input type="radio"/> Pulpo | <input type="radio"/> Otros (especifique) |

3- ¿La alergia se presenta al consumirlos, al contacto o en presencia del alimento?

4- ¿Qué síntomas manifestó después de la reacción alérgica?

- Shok anafiláctico (afectación de dos o más órganos)
- Rinitis alérgica (estornudos, congestión nasal, etc)
- Cutáneos (hinchazón, picazón)
- Gastrointestinales
- Otros (especifique)

5- ¿Su problema de alergia ha sido diagnosticado y confirmado por un profesional de la salud?

6- ¿Usted está dispuesto en ser participante de este estudio?

Firma

REFERENCIAS

- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), 228-238.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Cellular and molecular immunology (8th ed., pp. 417-421. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Abramovitch, J. B., Kamath, S., Varese, N., Zubrinich, C., Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Rolland, J. M. (2013). IgE reactivity of blue swimmer crab (*Portunus pelagicus*) tropomyosin, Por p 1, and other allergens; cross-reactivity with black tiger prawn and effects of heating. *PLoS One*, 8(6), e67487.
- Acosta, D. I. C., & Paguay, S. E. M. (2019). IgE: Utilidad en el diagnóstico de la enfermedad alérgica. *Recimundo*, 3(3), 297-313.
- Álvarez, F., Villalobos, J. L., Hendrickx, M. E., Escobar-Briones, E., Rodríguez-Almaraz, G., & Campos, E. (2014). Biodiversidad de crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 208-219.
- An, S., Chen, L., Long, C., Liu, X., Xu, X., Lu, X., Rong, M., Liu, Z., & Lai, R. (2013). *Dermatophagoides farinae* allergens diversity identification by proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(7), 1818-1828.
- Anagnostou, K., Stiefel, G., Brough, H., du Toit, G., Lack, G., & Fox, A. T. (2015). Active management of food allergy: an emerging concept. *Archives of Disease in Childhood*, 100(4), 386-390.
- Arciniega-Flores, J., & Mariscal-Romero, J. (2013). Estructura poblacional y crecimiento individual de *Callinectes arcuatus* en la Laguna Barra de Navidad, Jalisco. *Ciencia Pesquera* 21(1), 15-26.
- Arreola-Lizárraga, J. A., Hernández-Moreno, L. G., Hernández-Vázquez, S., Flores-Verdugo, F. J., Lechuga-Devezé, C., & Ortega-Rubio, A. (2003). Ecology of *Callinectes arcuatus* and *C. bellicosus* (Decapoda, Portunidae) in a coastal lagoon of Northwest Mexico. *Crustaceana*, 651-664.
- Baird, F. J., Gasser, R. B., Jabbar, A., & Lopata, A. L. (2014). Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes*, 28(4), 167-174.
- Barre, A., Simplicien, M., Cassan, G., Benoist, H., & Rougé, P. (2018). Food allergen families common to different arthropods (mites, insects, crustaceans), mollusks and nematods: Cross-reactivity and potential cross-allergenicity. *Revue Française d'Allergologie*, 58(8), 581-593.

- Bauermeister, K., Wangorsch, A., Garoffo, L. P., Reuter, A., Conti, A., Taylor, S. L., Lidholm, J., DeWitt, A. M., Enrique, E., Vieths, S., Holzhauser, T., Weber, B. & Reese, G. (2011). Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp *Crangon crangon*. *Molecular Immunology*, 48(15-16), 1983-1992.
- Bedolla-Pulido, T. R., Bedolla-Barajas, M., Morales-Romero, J., Bedolla-Pulido, T. I., Domínguez-García, M. V., Hernández-Colín, D. D., & Flores-Merino, M. V. (2019). Self-reported hypersensitivity and allergy to foods amongst Mexican adolescents: Prevalence and associated factors. *Allergologia et Immunopathologia*, 47(3), 246–253.
- Bozzola CM, Ivancevich JC, Arduoso L, Ghiani H, Marcipar A, Fantín S. (2007). Encuesta sobre percepción de salud, conocimiento de las defensas naturales y prevalencia de enfermedades alérgicas y patologías asociadas en argentina. Módulo alergia a alimentos. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica*; 38;3:134
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brassea-Estardante, H. A., Martínez-Cruz, O., Cárdenas-López, J. L., García-Orozco, K. D., Ochoa-Leyva, A., & López-Zavala, A. A. (2022). Identification of arginine kinase as an allergen of brown crab, *Callinectes bellicosus*, and in silico analysis of IgE-binding epitopes. *Molecular Immunology*, 143, 147-156.
- Broekman, H. C., Knulst, A. C., den Hartog Jager, C. F., van Bilsen, J. H., Raymakers, F. M., Kruizinga, A. G., Gaspari, M., Gabriele, C., Bruijnzeel, C.A., Houben, G. F., & Verhoeckx, K. C. (2017). Primary respiratory and food allergy to mealworm. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(2), 600-603.
- Cadoret, J. P., Debon, R., Cornudella, L., Lardans, V., Morvan, A., Roch, P., & Boulo, V. (1999). Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS letters*, 460(1), 81-85.
- Carrard, A., Rizzuti, D., & Sokollik, C. (2015). Update on food allergy. *Allergy*, 70(12), 1511-1520.
- Castañón, L. A., López, J. P., del Río Navarro, B. E., Vargas, M. A. R., Ortiz, L. L., & Monge, J. J. L. S. (2002). Hypersensitivity detected by skin tests to food in allergic patients in the Hospital Infantil de México Federico Gómez. *Revista Alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993)*, 49(3), 74-79.
- Coates, C. J., & Nairn, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1), 43-55

- Coates, C.J., Costa-Paiva, E.M. (2020). Multifunctional roles of hemocyanins. En: Hoeger, U., Harris, J. (eds) Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins. *Subcellular Biochemistry*, vol 94. Springer, Cham.
- Cochrane, S. A., Salt, L. J., Wantling, E., Rogers, A., Coutts, J., Ballmer-Weber, B. K., B. K., Fritsche, P., Fernández-Rivas, M., Reig, I., Knulst, A., Le, T.-M., Asero, R., Beyer, K., Golding, M., Crevel, R., Mills, E. N., & Mackie, A. R. (2012). Development of a standardized low-dose double-blind placebo-controlled challenge vehicle for the EuroPrevall project. *Allergy*, 67(1), 107-113.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2015. Recuperado de <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/disponibles-durante-todo-el-ano-mariscos-de-alto-valor-proteinico-sagarpa-21079>
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). 2018. Recuperado de <https://www.gob.mx/conapesca/articulos/jaiba-entre-los-diez-productos-pesqueros-de-mayor-volumen-y-valor-en-mexico?idiom=es>
- Cruz, S., Gonzalez, I., Garcia, T., & Martin, R. (2018). Food allergies: the importance of food allergen management. *Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria*, 38(1), 142-148.
- Chen, H. L., Mao, H. Y., Cao, M. J., Cai, Q. F., Su, W. J., Zhang, Y. X., & Liu, G. M. (2013). Purification, physicochemical and immunological characterization of arginine kinase, an allergen of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food and Chemical Toxicology*, 62, 475-484.
- Cheng, T. T., Tam, M. F., Chou, H., Tai, H. Y., & Shen, H. D. (2008). Lys89, Lys90, and Phe91 are critical core amino acid residues of the Pen ch 18 major fungal allergen recognized by human IgE antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(4), 671-674.
- De Gier, S., & Verhoeckx, K. (2018). Insect (food) allergy and allergens. *Molecular Immunology*, 100, 82-106.
- Decker, H., Hellmann, N., Jaenicke, E., Lieb, B., Meissner, U., & Markl, J. (2007). Minireview: Recent progress in hemocyanin research. *Integrative and Comparative Biology*, 47(4), 631-644.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2018. Recuperado: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5525712&fecha=11/06/2018
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2019. Recuperado: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5573266&fecha=24/09/2019&print=true
- du Toit, G., Tsakok, T., Lack, S., & Lack, G. (2016). Prevention of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(4), 998-1010.

- Faisal, M., Vasiljevic, T., & Donkor, O. N. (2019). Effects of selected processing treatments on antigenicity of banana prawn (*Fenneropenaeus merguensis*) tropomyosin. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(1), 183-193.
- FAO. 2019. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias Comité del Codex Sobre Etiquetado de los Alimentos 45.^a reunión.
- Fernandes, T. J., Costa, J., Oliveira, M. B. P., & Mafra, I. (2015). An overview on fish and shellfish allergens and current methods of detection. *Food and Agricultural Immunology*, *26*(6), 848-869.
- Fischer, S., & Wolff, M. (2006). Fisheries assessment of *Callinectes arcuatus* (Brachyura, *Portunidae*) in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Fisheries Research*, *77*(3), 301-311.
- Friedman, M. A., Fernandez, M., Backer, L. C., Dickey, R. W., Bernstein, J., Schrank, K., Kibler, S., Stephan, W., Gribble, M. O., Bienfang, P., Bowen, R. E., Degrasse, S., Flores-Quintana, H. A., Loeffler, C.R., Weisman, R., Blythe, D., Berdalet, E., Ayyar, R., Clarkson-Townsend, D., Swajian, K., Benner, R., Brewer, T., & Fleming, L. E. (2017). An updated review of ciguatera fish poisoning: clinical, epidemiological, environmental, and public health management. *Marine Drugs*, *15*(3), 72.
- Fu, L., Wang, J., Ni, S., Wang, C., & Wang, Y. (2018). Identification of allergenic epitopes and critical amino acids of major allergens in chinese shrimp (*Penaeus chinensis*) by immunoinformatics coupled with competitive-binding strategy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(11), 2944-2953.
- Gámez, C., Sánchez-García, S., Ibáñez, M. D., López, R., Aguado, E., López, E., Sastre, B., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2011). Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy*, *66*(10), 1375-1383.
- García-Abujeta, J., Rodríguez, F., Maquiera, E., Picans, I., Fernandez, L., & Sanchez, I. Martin-Gil, D., Jerez, J. (1997). Occupational protein contact dermatitis in a fishmonger. *Contact Dermatitis*, *36*(3), 163-164
- García-Orozco, K. D., Aispuro-Hernández, E., Yepiz-Plascencia, G., Calderón-de-la-Barca, A. M., & Sotelo-Mundo, R. R. (2007). Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Archives of Allergy and Immunology*, *144*(1), 23-28.
- Gendel, S. M. (2012). Comparison of international food allergen labeling regulations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *63*(2), 279–285.
- Guimarães, T.C., Gonçalves, L. C., Silva, R. M., & Segundo, G. R. (2015). Prevalence of parent-reported food allergy in infants and preschoolers in Brazil. *Allergologia et Immunopathologia*, 424-425.

- Ha, A., Rosmilah, M., Keong, B. P., & Ateshan, H. M. (2019). The effects of thermal and non-thermal treatments on protein profiles of *Scylla tranquebarica* (purple mud crab). *Plant Archives*, 19(2), 813-6.
- Harrer, A., Egger, M., Gadermaier, G., Erler, A., Hauser, M., Ferreira, F., & Himly, M. (2010). Characterization of plant food allergens: an overview on physicochemical and immunological techniques. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(1), 93-112.
- Huang, Z., Wang, Y., Sun, L., Wang, X., Lu, P., Liang, G., Pang, H., Wu, Q., Gooneratne, R., & Zhao, J. (2020). Effects of T-2 toxin on the muscle proteins of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) –a proteomics study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 119-128.
- Huerta-Ocampo, J. Á., Valenzuela-Corral, A., Robles-Burgueño, M. D. R., Guzmán-Partida, A. M., Hernández-Oñate, M. Á., Vázquez-Moreno, L., Pavón-Romero, G. F., & Terán, L. M. (2020). Proteomic identification of allergenic proteins in red oak (*Quercus rubra*) pollen. *World Allergy Organization Journal*, 13(3), 100111.
- Ishikawa, M., Suzuki, F., Ishida, M., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2001). Identification of tropomyosin as a major allergen in the octopus *Octopus vulgaris* and elucidation of its IgE binding epitopes. *Fisheries Science*, 67(5), 934-942.
- Jasim, H. A., Misnan, R., Yadzir, Z. H. M., Abdullah, N., Bakhtiar, F., Arip, M., Ateshan, H. M. & Keong, P. B. (2021). Identification of common and novel major crab allergens in *Scylla tranquebarica* and the allergen stability in untreated and vinegar-treated crab. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*, 20(1), 76-87.
- Jung, H., Lyons, R. E., Hurwood, D. A., & Mather, P. B. (2013). Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. *Reviews in Aquaculture*, 5(2), 77-110.
- Kalyanasundaram, A., & Santiago, T. C. (2015). Identification and characterization of new allergen troponin C (Pen m 6.0101) from Indian black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *European Food Research and Technology*, 240(3), 509-515.
- Kamath, S. D., Rahman, A. M. A., Voskamp, A., Komoda, T., Rolland, J. M., O'hehir, R. E., & Lopata, A. L. (2014). Effect of heat processing on antibody reactivity to allergen variants and fragments of black tiger prawn: A comprehensive allergenomic approach. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(5), 1144-1155.
- Khora, S. S. 2016. Seafood-associated shellfish allergy: A comprehensive review. *Immunological Investigations*, 45(6), 504–530.
- Kumjim S, Jirapongsananuruk O, Piboonpocanun S. (2016). Cloning and characterization of recombinant tropomyosin of giant freshwater shrimp *M. rosenbergii* to determine major

- allergens causing allergic reactions among shrimp-allergic children. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 34(3):229–235.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lee, C. H., Wu, C. C., Tyan, Y. C., Yu, W. T., Huang, E. S., & Yu, H. S. (2018). Identification of pyruvate kinase as a novel allergen in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by specific-IgE present in patients with shrimp allergy. *Food Chemistry*, 258, 359-365.
- Lehman, W., Rynkiewicz, M. J., & Moore, J. R. (2020). A new twist on tropomyosin binding to actin filaments: perspectives on thin filament function, assembly and biomechanics. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 41(1), 23-38.
- Lehninger, Albert L., Nelson, David L. Cox, Michael M. (5th edition)(2009). Principles of biochemistry. *W.H. Freeman and Company*. New York. (153-182).
- Leung, P. S., Chen, Y. C., Mykles, D. L., Chow, W. K., Li, C. P., & Chu, K. H. (1998). Molecular identification of the lobster muscle protein tropomyosin as a seafood allergen. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(1), 12-20.
- Leung, P. S., Chow, W. K., Duffey, S., Kwan, H. S., Gershwin, M. E., & Chu, K. H. (1996). IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98(5), 954-961.
- Leung, P.S., Chen, Y.C., Gershwin, M.E., Wong, S.H., Kwan, H.S. & Chu, K.H. (1998). Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(5), 847-852.
- Liu, C., & Sathe, S. K. (2018). Food allergen epitope mapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7238-7248.
- Lopata, A. L., Kleine-Tebbe, J., & Kamath, S. D. (2016). Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy. *Allergo Journal International*, 25(7), 24-32.
- López-Martínez, J., López-Herrera, L., Valdez-Holguín, J. E., & Rábago-Quiroz, C. H. (2014). Population dynamics of the swimming crabs *Callinectes* (*Portunidae*) components of shrimp bycatch in the eastern coast of the Gulf of California. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(1), 17-29.
- Lopez-Zavala, A. A., Carrasco-Miranda, J. S., Ramirez-Aguirre, C. D., López-Hidalgo, M., Benitez-Cardoza, C. G., Ochoa-Leyva, A., Cadona-Felix, C., Diaz-Quesada, C., Rudiño-Piñera, E., Sotelo-Mundo, R., & Brieba, L. G. (2016). Structural insights from a novel invertebrate triosephosphate isomerase from *Litopenaeus*

- vannamei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1864(12), 1696-1706.
- Mao, H. Y., Cao, M. J., Maleki, S. J., Cai, Q. F., Su, W. J., Yang, Y., & Liu, G. M. (2013). Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Molecular Immunology*, 56(4), 463-470.
- Markl, J., & Decker, H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. En: Blood and tissue oxygen carriers (325-376). *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Martins, L. M. L., Marques, A. G., Pereira, L. M. D. S., Semião-Santos, S. J., & Bento, O. P. (2017). Allergy to grass pollen: mapping of *Dactylis glomerata* and *Phleum pratense* allergens for dogs by two-dimensional immunoblotting. *Advances in Dermatology and Allergology*, 34(1), 60.
- Matsuo, H., Yokooji, T., & Taogoshi, T. (2015). Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International*, 64(4), 332-343.
- McCormack, A. L., Schieltz, D. M., Goode, B., Yang, S., Barnes, G., Drubin, D., & Yates, J. R. (1997). Direct analysis and identification of proteins in mixtures by LC/MS/MS and database searching at the low-femtomole level. *Analytical Chemistry*, 69(4), 767-776.
- MINSAL. Encuesta Nacional de Salud ENS Chile: 2009- 2010.
- Misnan, R., Murad, S., Yadzir, Z. H. M., & Abdullah, N. (2012). Identification of the major allergens of *Charybdis feriatus* (red crab) and its cross-reactivity with *Portunus pelagicus* (blue crab). *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 30(4), 285.
- Mohapatra, S.S., & Lockey, R.F. (2001). Molecular characterization of allergens. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 21(2-3), 203-213.
- Montalvo, M. (2006). Proteínas alergénicas de camarón (*Litopenaeus vannamei*): identificación, aislamiento y evaluación in vitro, de la respuesta humoral y celular de personas alérgicas (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Son, México.
- Motoyama, K., Suma, Y., Ishizaki, S., Nagashima, Y., & Shiomi, K. (2007). Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 985-991.
- Murphy, K., & Weaver, C. (9th edition) (2016). Janeway's immunobiology. New York, Garland science.
- Ochiai, Y., & Ozawa, H. (2020). Biochemical and physicochemical characteristics of the major muscle proteins from fish and shellfish. *Fisheries Science*, 86(5), 729-740.

- Olianas, A., Sanna, M. T., Messana, I., Castagnola, M., Masia, D., Manconi, B., Cau, A., Giardina, B., & Pellegrini, M. (2006). The hemocyanin of the shamefaced crab *Calappa granulata*: structural-functional characterization. *Journal of Biochemistry*, 139(6), 957-966.
- Ontiveros, N., Valdez-Meza, E. E., Vergara-Jiménez, M. J., Canizalez-Román, A., Borzutzky, A., & Cabrera-Chávez, F. (2016). Parent-reported prevalence of food allergy in mexican schoolchildren: A population-based study. *Allergologia et Immunopathologia*, 44(6), 563–570.
- Pascal, M., Grishina, G., Yang, A. C., Sánchez-García, S., Lin, J., Towle, D., Ibanez, M.D., Sastre, J., Sampson, H. A., & Ayuso, R. (2015). Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 3(4), 521-529.
- Paul, R.K.G. 1982. Observation on the ecology and distribution of swimming crabs of the genus *Callinectes* (Decapoda: *Brachyura*: *Portunidae*) in the Gulf of California, Mexico. *Crustaceana*. 96-100.
- Piboonpocanun, S., Jirapongsananuruk, O., Tipayanon, T., Boonchoo, S., & Goodman, R. E. (2011). Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(10), 1492-1498.
- Rahman, A. M. A., Kamath, S. D., Lopata, A. L., Robinson, J. J., & Helleur, R. J. (2011). Biomolecular characterization of allergenic proteins in snow crab (*Chionoecetes opilio*) and de novo sequencing of the second allergen arginine kinase using tandem mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 74(2), 231-241.
- Ramírez-Félix, E., Singh-Cabanillas, J., Gil-López, H.A., Sarmiento-Náfate, S., Salazar, I., Montemayor, L.G., García-Borbón, A., Rodríguez Dominguez, G., & Castañeda, N.. (2003). La pesquería de jaiba (*Callinectes spp.*) en el pacífico mexicano: Diagnóstico y propuesta de regulación. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) – Instituto Nacional de la Pesca, secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, 48 p.
- Rolland, J. M., Varese, N. P., Abramovitch, J. B., Anania, J., Nugraha, R., Kamath, S., Hazard, A., Lopata, A. L., & O’Hehir, R. E. (2018). Effect of heat processing on IgE reactivity and cross-reactivity of tropomyosin and other allergens of asia-pacific mollusc species: identification of novel sydney rock oyster tropomyosin Sac g 1. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(14), 1–12.
- Rona, R. J., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., Sigurdardottir, S. T., Lindner, T., Goldhahn, K., Dahlstrom, J., McBride, D., & Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: a meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(3), 638-646.

- Rosmilah, M., Shahnaz, M., Zailatul, H. M., Noormalin, A., & Normilah, I. (2012). Identification of tropomyosin and arginine kinase as major allergens of *Portunus pelagicus* (blue swimming crab). *Tropical Biomedicine*, 29(3), 467-78.
- Ruethers, T., Taki, A., Johnston, E., Nugraha, R., Le, T., Kalic, T., McLean, T.R., Kamath, S. D., & Lopata, A.L. (2018). Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Molecular Immunology*, 100, 28-57.
- Santamaría-Miranda, A., Saucedo-Lozano, M., Herrera-Moreno, M. N., & Apún-Molina, J. P. (2005). Hábitos alimenticios del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris* y del pargo rojo *Lutjanus colorado* (Pisces: *Lutjanidae*) en el norte de Sinaloa, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 40(1), 33-44.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Producción pesquera por especie.
- Shen, Y., Cao, M. J., Cai, Q. F., Su, W. J., Yu, H. L., Ruan, W. W., & Liu, G. M. (2011). Purification, cloning, expression and immunological analysis of *Scylla serrata* arginine kinase, the crab allergen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(7), 1326-1335.
- Shen, H. W., Cao, M. J., Cai, Q. F., Ruan, M. M., Mao, H. Y., Su, W. J., & Liu, G. M. (2012). Purification, cloning, and immunological characterization of arginine kinase, a novel allergen of *Octopus fangsiao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(9), 2190-2199.
- Shriver, S., Yang, W., Chung, S. Y., & Percival, S. (2011). Pulsed ultraviolet light reduces immunoglobulin E binding to Atlantic white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) extract. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(7), 2569-2583.
- Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., & Phiriyangkul, P. (2015). Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium spp.* allergens. *Food Chemistry*, 184, 160-166.
- Sugita, K., Kabashima, K., Nakashima, D., & Tokura, Y. (2007). Oral allergy syndrome caused by raw fish in a Japanese sushi bar worker. *Contact Dermatitis*, 56(6), 369-370.
- Suh, S. M., Kim, M. J., Kim, H. I., Kim, H. J., & Kim, H. Y. (2020). A multiplex PCR assay combined with capillary electrophoresis for the simultaneous detection of tropomyosin allergens from oyster, mussel, abalone, and clam mollusk species. *Food Chemistry*, 317, 126451.
- Taylor, S. L., Moneret-Vautrin, D. A., Crevel, R. W., Sheffield, D., Morisset, M., Dumont, P., Remington, B. C., & Baumert, J. L. (2010). Threshold dose for peanut: risk

characterization based upon diagnostic oral challenge of a series of 286 peanut-allergic individuals. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 814-819.

- Tomm JM, van Do T, Jende C, Simon JC, Treudler R, von Bergen M, & Averbeck, A. (2013) Identification of new potential allergens from Nile perch (*Lates niloticus*) and cod (*Gadus morhua*). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 23(3):159-67.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Van Broekhoven, S., Bastiaan-Net, S., de Jong, N., & Wichers, H. (2016). Influence of processing and in vitro digestion on the allergic cross-reactivity of three mealworm species. *Food Chemistry*, 196, 1075-1083.
- Van Hecke, T., Goethals, S., Vossen, E., & De Smet, S. (2019). Long-chain n-3 PUFA content and n-6/n-3 PUFA ratio in mammal, poultry, and fish muscles largely explain differential protein and lipid oxidation profiles following *in vitro* gastrointestinal digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(22), 1900404.
- Werfel, T., Asero, R., Ballmer-Weber, B. K., Beyer, K., Enrique, E., Knulst, A. C., Mari, A., Muraro, A., Ollert, M., Pulsen, L. K., Vieths, S., Worm, M., & Hoffmann-Sommergruber, K. (2015). Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy*, 70(9), 1079-1090.
- Wierenga, R. K., Kapetaniou, E. G., & Venkatesan, R. (2010). Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(23), 3961-3982.
- Wu, C. C., Lee, C. H., Tyan, Y. C., Huang, E. S., Yu, W. T., & Yu, H. S. (2019). Identification of pyruvate kinase 2 as a possible crab allergen and analysis of allergenic proteins in crabs consumed in Taiwan. *Food Chemistry*, 289, 413-418.
- Xu, L. L., Chen, J., Sun, L. R., Gao, X., Lin, H., Ahmed, I., Pramod, S. N. & Li, Z. X. (2020). Analysis of the allergenicity and B cell epitopes in tropomyosin of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and correlation to cross-reactivity based on epitopes with fish (*Larimichthys crocea*) and clam (*Ruditapes philippinarum*). *Food Chemistry*, 323, 126763.
- Yadzir, Z. H. M., Misnan, R., Bakhtiar, F., Samsudin, S., & Abdullah, N. (2018). Local bivalve allergens. *Allergo Journal International*, 27(7), 228-233.
- Yang, Y., Hu, M. J., Jin, T. C., Zhang, Y. X., Liu, G. Y., Li, Y. B., Zhang, M. L., Cao, M. J., Su, M. J., & Liu, G. M. (2019). A comprehensive analysis of the allergenicity and IgE epitopes of myosinogen allergens in *Scylla paramamosain*. *Clinical & Experimental Allergy*, 49(1), 108-119.

- Yang, Y., Zhang, Y. X., Liu, M., Maleki, S. J., Zhang, M. L., Liu, Q. M., Cao, M. J., Su, W. J. & Liu, G. M. (2017). Triosephosphate isomerase and filamin C share common epitopes as novel allergens of *Procambarus clarkii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 950-963.
- Yong Jeong, K., Hong, C. S., & Yong, T. S. (2006). Allergenic tropomyosins and their cross-reactivities. *Protein and Peptide Letters*, 13(8), 835-845.
- Yoshida, S., Ichimura, A., & Shiomi, K. (2008). Elucidation of a major IgE epitope of Pacific mackerel parvalbumin. *Food Chemistry*, 111(4), 857-861.
- Yu, C. J., Lin, Y. F., Chiang, B. L., & Chow, L. P. (2003). Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *The Journal of Immunology*, 170(1), 445-453.
- Zhang, Y., Zhu, L., Li, S., Zhang, J., She, T., Yan, J., Bian, Y., & Li, H. (2016). Identification of the major allergenic epitopes of *Eriocheir sinensis* roe hemocyanin: A novel tool for food allergy diagnoses. *Molecular Immunology*, 74, 125-132.
- Zhao, X., Li, L., Kuang, Z., Luo, G., & Li, B. (2015). Proteomic and immunological identification of two new allergens from silkworm (*Bombyx mori* L.) pupae. *Central-European Journal of Immunology*, 40(1), 30.