



Cuantificación de gliadinas en diferentes quesos rallados

Alumno: Anthony Luz

Grupo: 3 BG

Índice

Resumen	Pág. 1
Abstract	Pág. 1
Objetivo	Pág. 1
Marco teórico	Pág. 1
Gluten	Pág. 1
Celiaquía	Pág. 2
Gliadinas	Pág. 2
ELISA	Pág. 4
Reacción Antígeno-anticuerpo	Pág. 4
Antígeno	Pág. 5
Anticuerpo	Pág. 6
PBS (buffer)	Pág. 6
BSA (solución bloqueo)	Pág. 7
Tween-20 (detergente)	Pág. 8
Peroxidasa de rábano(enzima)	Pág. 8
TMB(cromógeno)	Pág. 9
Materiales sustancias/soluciones	Pág. 9
Procedimiento	Pág. 10
Resultado y tratamiento de datos	Pág. 11
Sensibilización de las placas microlon de greiner	Pág. 11
Bloqueo de las placas con BSA	Pág. 11
Preparación de las muestras	Pág. 12
Extracción de gliadinas	Pág. 13
Diluciones de las muestras y controles y diagrama de placa	Pág. 13
ELISA	Pág. 14
Espectrofotometría resultados	Pág. 16
Curva de calibración	Pág. 16
Cálculos de concentración	Pág. 18
Conclusión	Pág. 19
Bibliografías	Pág. 19

Resumen

En este proyecto se planteó identificar y cuantificar las α , γ y ω gliadinas presentes en diferentes quesos rallados de distintas marcas comerciales (El trébol, Conaprole, Lácteos Pando y Las Acacias) y en harina de trigo.

La identificación se llevó a cabo mediante el ensayo de ELISA sándwich directo utilizando inmunoglobulina G anti-gliadina de conejo policlonal luego se cuantifico por espectrofotometría. Se comprobó que todos los quesos rallados analizados tienen una cantidad de α , γ y ω gliadinas inferiores a la de 10 ng/mL, siendo todos aptos para el consumo por parte de los celíacos. Por otro lado se comprobó que cada 1,021 mg de harina de trigo hay $3,0756E^{-3}$ mg de α , γ y ω gliadinas.

Abstract

In this project it was proposed to identify and quantify the α , γ and ω gliadins present in different grated cheeses of different commercial brands (El trébol, Conaprole, Lácteos Pando and Las Acacias) and in wheat flour.

The identification was carried out by means of the direct sandwich ELISA assay using polyclonal anti-gliadin immunoglobulin G from rabbit, then it was quantified by spectrophotometry. It was verified that all the grated cheeses analyzed have an amount of α , γ and ω gliadins inferior to that of 10 ng/mL, all being apt for consumption by celiacs. In wheat flour it was found that every 1,021 mg there are $3,0756E^{-3}$ mg of α , γ and ω gliadins.

Objetivo:

1. Identificar y cuantificar la α , γ y ω gliadinas presentes en diferentes quesos rallados de distintas marcas y comprobar si son aptos para el consumo de celíacos.
2. Cuantificar la cantidad de α , γ y ω gliadinas presentes en harina de trigo

Hipótesis

Un queso rallado comercial indicaba en su etiqueta que no contenía gluten, este estaba aprobado por ACELU (asociación celiaca del Uruguay) y era apto para celíacos, por lo que se dedujo que algunas otras marcas de queso rallado más económicas que no lo indicaban podrían estar contaminadas con gluten y no ser aptas para celíacos.

¿Cómo varía la concentración de gliadina en distintos quesos rallados de diferentes marcas?

Marco teórico:

Gluten

El gluten es un compuesto formado por dos tipos de proteínas, las glutelinas y las prolaminas.

En este caso no centraremos en el gluten del trigo debido a que es el que posee las gliadinas el tipo de prolaminas que podemos detectar con anticuerpo utilizado en este caso, las glutelinas y las prolaminas del trigo representan aproximadamente un 85 % de la fracción proteica de la harina del trigo, a su vez las harinas de trigo contienen entre un 10 y 12 % de proteínas. (De la Vega 2009)

Las glutelinas del trigo reciben el nombre de gluteninas y las prolaminas reciben el nombre de las ya mencionadas gliadinas.

Tanto las gliadinas como las gluteninas le otorgan al gluten propiedades únicas que lo hacen imprescindible a la hora del amasado y producción de masa.

Las gliadinas al hidratarse forman una masa viscosa extensible, fluida pero poco elástica, son las responsables de la expansión de la masa durante la elaboración del pan. Las gluteninas al hidratarse producen una masa muy tenaz, elástica y cohesiva. (Badui 2006)

El gluten es rico en residuos de cisteína lo que le permite formar enlaces disulfuro intra e intermoleculares. Estos enlaces se forman durante el amasado, manual o mecánico, en el cual las gluteninas y las gliadinas se desnaturalizan y establecen enlaces disulfuro, y mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas permiten que estos polímeros se orienten longitudinalmente, el resultado de este proceso es la formación de una red elástica y cohesiva necesaria para el esponjamiento ocasionado por la generación del CO₂ de la fermentación, esta red elástica y cohesiva también atrapa gránulos de almidón, grasas, azúcares, agua, etc.(Badui 2006)

La gliadina es el componente que se analizara debido a su relación con la enfermedad celiaca, la gliadina es el componente tóxico del gluten para los celíacos.

Celiaquía

La enfermedad celíaca es una enfermedad inflamatoria de origen autoinmune que afecta la mucosa del intestino delgado en pacientes genéticamente susceptibles y cuyo desencadenante es la ingesta de gluten específicamente las ya mencionadas gliadinas que conforman al mismo. Como consecuencia, se establece un defecto de utilización de nutrientes a nivel del tracto digestivo causando mala nutrición, diarrea, pérdida de peso, hinchazón abdominal, etc. (Bai 2012)

La intolerancia de los celíacos al gluten es de carácter permanente, se mantiene a lo largo de toda la vida.

Un régimen estricto sin gluten conduce a la desaparición de los síntomas clínicos y de la alteración funcional, así como a la normalización de la mucosa intestinal.

Debido a esto hoy en muchos alimentos remarcan el hecho de que no contienen gluten o que lo contiene en trazas que no generan la respuesta autoinmune en los celíacos, para que un alimento sea apto para el consumo de los celíacos debe de tener una cantidad de gluten inferior a la de 20 ppm según la Comisión del Codex Alimentarius, como las gliadinas conforman aproximadamente un 50 % del gluten , el límite de α , γ y ω gliadinas establecido es de 10 ppm lo que es igual a 1 mg cada 100 g.

Gliadinas

Las gliadinas pertenecen al grupo de las prolaminas que son proteínas solubles en soluciones acuosas de etanol, las prolaminas son proteínas de almacenamiento presentes en el endospermo de algunos cereales como el trigo, la avena, la cebada y el centeno, las prolaminas son ricas en los aminoácidos prolina y glutamina.

Las gliadinas son proteínas de bajo valor nutricional y pobres en aminoácidos esenciales, esto hace que puedan ser suplantadas nutricionalmente de la dieta ya que el cuerpo puede sintetizar la mayor parte de lo proveniente de las gliadinas.

Las gliadinas se caracterizan por tener un dominio globular α -hélice con 6-8 residuos de cisteína y 3-4 puentes disulfuro, siendo altamente solubles en etanol 70 %.

El anticuerpo utilizado es específico hacia las gliadinas por lo que reconoce únicamente las prolaminas provenientes del trigo (α , γ y ω gliadinas) en especial la del trigo harinero (*triticum aestivum*), por lo que las prolaminas del centeno (secalina), cebada (hordeina) y avena (avenina) no serán reconocidas en este ensayo.

En esta práctica se detectan las alfa, gamma y omega gliadinas por igual ya que todas generan la respuesta autoinmune en las personas celíacas.

➤ Alfa gliadina (α -gliadina)

La alfa gliadina tiene una región N-terminal de 5 residuos, un dominio repetitivo de 110-130 residuos y una región C-terminal de 140-160 residuos. La región C-terminal se distingue por ser una región rica en cisteína, en total tiene 6 residuos de cisteína que conforman entre si 3 puentes disulfuro. Las alfa gliadinas son las gliadinas más abundantes en el gluten. Las alfa gliadinas varían en masa de 30000 a 34000 Dalton, y esta variación se atribuye a la variación en las longitudes del dominio repetitivo. (Urade 2017)

Estructura primaria de una α -gliadina

```
1  mkftlilall aivattatia vrvpvpqlqp qnpsqqqpqe qvplvqqqf pgqqqpfppq
61  qpyppppfp sqppylqlqp fpqqppysq pqpfrppqpy pqpqpqysqp qppisqqqqq
121 qqqqqqqqii qqilqqqlip cmdvllqqhn iahgrsqvlq qstyqllqgl ccqhpwqipe
181 qsqcqhnhv vhailhqqq kqqqqppssq vsfqqppqqy psgqgsfpps qqnpqaqgsl
241 qqqlppqfee irnlalqtlp amcnvyippy ctiapfgifg tn
```

➤ Gamma gliadina (γ -gliadina)

La gamma gliadina tiene una región N-terminal de 12 residuos, un dominio repetitivo de 80–160 residuos y una región C-terminal de 140–150 residuos. La región C-terminal se distingue por también ser una región rica en cisteína que contiene 6 residuos de cisteína en su inicio, un intermedio rico en glutamina, y al final de la región 2 residuos de cisteína. En total tiene 8 residuos de cisteína siendo la gliadina más rica en azufre, los 8 residuos de cisteína conformar 4 puentes disulfuro. La masa de la gamma gliadina ronda entre los 26000 y 36000 daltons. (Urade 2017)

Estructura primaria de una γ -gliadina

```
1  mniqvdpsq vpwppqqpfp qphqpfqqp qqtfppqqf fphqppqqfs qpqqppqqfi
61  qpqqpfpqqp qqtyprrqq pfpqtqqppq pfpqsqqppq pfpqpqqqfp qpqqppqsfp
121 qqqpsliqqq lqqqlnpckn flqqckpvs lvsslwsmil prsdcqvmrq qccqqlaqip
181 qqlqcaaihs ivhsiimqqe qqeqrgvqi lvplsqqqqv gqgtlvqggg iipppqaql
241 evirslvlqt latmenvyvp pycstirapf asivagiggq yr
```

➤ Omega gliadina (ω -gliadina)

La omega gliadina es la que en menor cantidad se encuentra en el gluten, tiene una región N-terminal de 11 residuos, un dominio repetitivo de aproximadamente 238 residuos y una región C-terminal de 12 residuos, y no tienen residuos de cisteína por lo que no posee puentes disulfuro. (Urade 2017)

Estructura primaria de una ω -gliadina

1 mkphhdgyky tcsiivtfhy pnfkhqdqkh qfquesikhks kmktfiifvl lsmmpmsivia

61 arhlnpsdqe lqspqqqfle ktiisaatis tsifttiti shtptifpps tttisptpt

121 tnppttmti platptttt fspapttisl atttislap ttnspittt ipaatpettt

181 tippatrttn yastattisl ltatttppat pttilsattt tispaptiis patrttnsla

241 tpttippata ttippatrttn nspatattip papqqrpfht rqkfrnppnn hslcsthfp

301 aqqpfpqqpg qiipqqqqp lplqqqfp wqpeqrssq pqqpflqpq qpfs

Las alfa y gamma gliadinas son las que están en mayor cantidad.

ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) Sándwich Directo

El ELISA sándwich directo es el método por el cual se cuantificaran las α , γ y ω gliadinas, es un inmunoensayo que se basa en una inmunoreacción entre un anticuerpo (inmunoglobulina G anti-gliadina) y un antígeno (gliadina).

El ensayo de ELISA sándwich consiste en inmovilizar los anticuerpos (inmunoglobulina G anti-gliadina) en la placa de poliestireno para luego agregar las muestras con posibles antígenos (gliadinas), esos antígenos en las muestras deberán reaccionar muy específicamente con el anticuerpo que los reconoce que estará inmovilizado en la placa de poliestireno, luego se agrega un segundo anticuerpo unido a una enzima (inmunoglobulina G anti-gliadina conjugada a peroxidasa), se lava la solución para quitar los anticuerpos conjugados a la enzima que no reaccionaron con el antígeno ahora inmovilizado, por último se agrega el sustrato que hará visible la reacción antígeno-anticuerpo mediante la coloración de la solución. (Crowther 2009)

Este ELISA sándwich es llamado directo ya que el segundo anticuerpo ya está conjugado a la enzima directamente y no se necesita de un tercer anticuerpo. Por otro lado se le llama sándwich debido a que los dos anticuerpos “atrapan” por ambos lados al antígeno (gliadina).

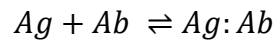
Reacción antígeno-anticuerpo

Una gran cantidad de fuerzas intermoleculares están involucradas en la reacción antígeno-anticuerpo. La unión de un antígeno hacia su anticuerpo se logra gracias a la formación de múltiples enlaces no covalentes entre el antígeno y la determinada secuencia de residuos de aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo (paratopo). Estas fuerzas de atracción pueden ser por puentes de hidrogeno, fuerzas electrostáticas (iónicas), van de Waals y hidrofóbicas que individualmente son muy débiles en comparación a un enlace covalente pero un gran número de estas atracciones puede generar un enlace considerable que le da una buena estabilidad al complejo antígeno-anticuerpo. (Deshpande 1996)

- Puentes de hidrogeno: los puentes de hidrógenos son las interacción de una átomo de hidrogeno con un par de electrones no compartidos de otro átomo electronegativo. Los grupos amino, carboxilo e hidroxilo son los mayores donadores de átomos de hidrógeno en la reacción antígeno-anticuerpo
- Electrostáticas (iónicas): estas fuerzas se dan cuando dos grupos con cargas opuestas en distintas cadenas se atraen, estas cargas opuestas están, una en la región determinante del antígeno (epítopo) y otra en la región de unión del anticuerpo (paratopo), son responsables de las primeras interacciones de la unión antígeno-anticuerpo.
- Fuerzas Van der Waals: las fuerzas de Van der Waals son generadas por la interacción de las nubes de electrones de dos grupos polares que inducen dipolos oscilantes

- **Interacciones hidrofóbicas:** Las interacciones hidrofóbicas se basan en la asociación de grupos no polares, grupos hidrófobos o cadenas laterales de aminoácidos (los aminoácidos pueden ser prolina, leucina, fenilalanina que no forman puentes de hidrógeno con el agua). Su estabilidad excepcional se debe a la alteración estructural del entorno acuoso cuando estos grupos se unen con la exclusión del agua. Las interacciones hidrofóbicas fortalecen los otros tipos de interacciones ya existentes. El remplazo de las interacciones antígeno-agua-anticuerpo a una interacción directa antígeno-anticuerpo por fuerzas hidrófobas aumenta en gran medida la energía de enlace, estabilizando así el complejo antígeno-anticuerpo. (Deshpande 1996)

Las reacciones antígeno (Ag)-anticuerpo (Ac) son reversibles, y pueden ser representadas como un equilibrio.



Antígeno

Un antígeno es una sustancia que al ingresar al organismo genera la formación de anticuerpos. Puede ser específicamente unida por un anticuerpo o por un receptor de célula T, pero no necesariamente genera una respuesta inmune.

En este caso los antígenos serán las gliadinas, tanto la α , la γ y la ω gliadinas,

Los antígenos son reconocidos por los anticuerpos por medio de sus epítopos, los epítopos son secuencias muy específicas únicas de cada antígeno, son las regiones en las que se da la unión del antígeno con el anticuerpo, La parte de un anticuerpo que reconoce el epítipo se llama paratopo.

Hay dos clases de epítopos:

- **Epítipo lineal:** Formado por secuencias de residuos aminoácidos continuos y contiguos.
- **Epítipo Conformacional:** está constituido por secuencias de residuos aminoácidos continuos o discontinuos y distantes, que se aproximan entre sí debido al plegamiento o conformación tridimensional del antígeno. (Crowther 2009).

Anticuerpo (inmunoglobulina G de conejo Anti-gliadina policlonal)

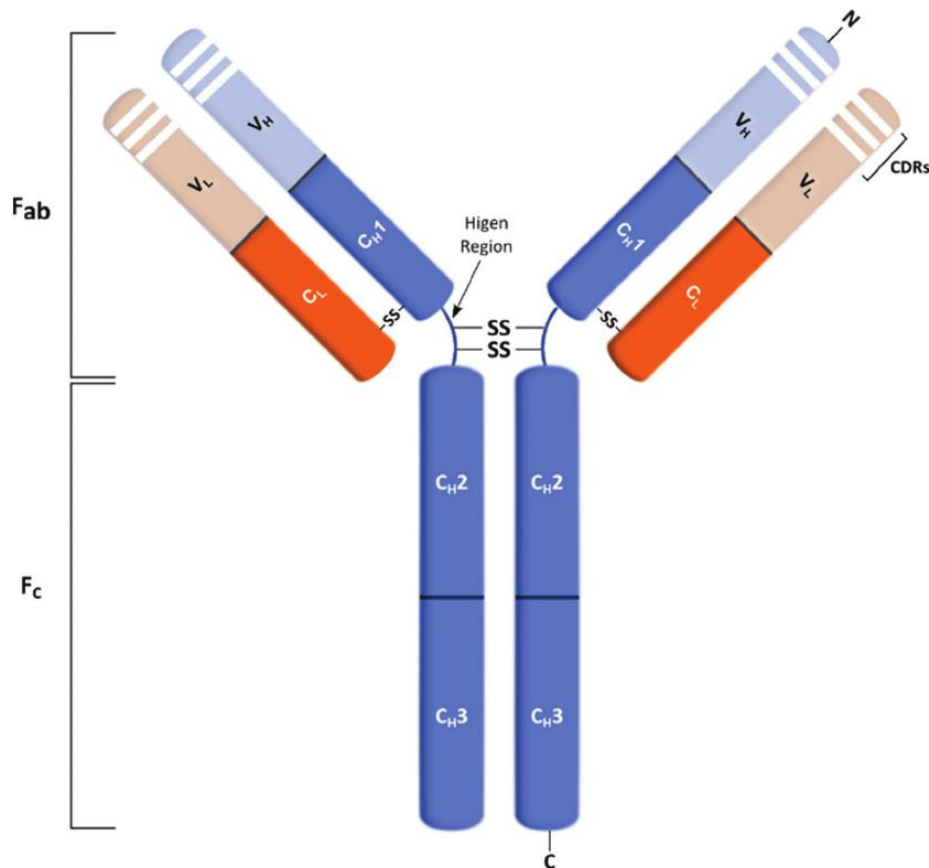


Figura 1. Representación de una inmunoglobulina G.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son productos de las células B, las células o leucocitos B dan origen a las células plasmáticas que producen los anticuerpos, estos anticuerpos son capaces de unirse de forma específica a un fragmento del antígeno (Sanabria 2007), en este caso se utiliza la inmunoglobulina G de conejo anti-gliadina que se une de forma específica a las gliadinas.

Las moléculas de Inmunoglobulina G están formadas por dos cadenas ligeras idénticas de masa molecular 23000 daltons (representadas con el color anaranjado) y dos cadenas pesadas idénticas de masa molecular 53000 daltons (representadas de color azul). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada. Por interacciones no covalentes, y también por un puente disulfuro covalente.

Para Inmunoglobulina G, cada par de cadenas ligeras y pesadas está vinculado al otro por puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. Es por eso que esta molécula es representada esquemáticamente en forma de Y, con el grupo amino (N-) terminal de la cadena ligera y pesada en los extremos de la parte superior de la Y y los dos grupos carboxilo (C-) terminal están en la parte inferior de la Y.

La fracción llamada Fab en la figura es la zona de unión del anticuerpo con el antígeno, la inmunoglobulina G tiene dos Fab por ende dos posibles sitios de unión con el antígeno, la fracción llamada Fc es la región constante.

Las zonas marcadas en la figura como C_L y C_H (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) son las zonas constantes que son idénticas en todas las inmunoglobulinas G mientras que las zonas marcadas con V_L y V_H son las zonas variables en las que se formara la unión con el antígeno, en este caso la gliadina.

Las líneas blancas en la figura representan los CDR (Región determinante de la complementariedad) hay 3 CDR por cada cadena ligera y 3 por cada cadena pesada, los CDR se encuentran en la zona variable de la Inmunoglobulina G y forman la parte hipervariable de la misma, los 3 CDR de la cadena ligera y los 3 CDR

de la cadena pesada al aproximarse conforman el paratopo del anticuerpo, son una secuencia de aminoácidos única que reconoce determinado epítipo del antígeno al cual están destinados.

El anticuerpo que se utilizara es policlonal, esto significa que el conejo del cual se extrajeron los anticuerpos anti-gliadina se le inyectó una mezcla con todos los tipos de gliadinas, tanto α , γ y ω gliadinas por lo tanto este desarrollo una mezcla de anticuerpos hacia todas las gliadinas. También a diferencia de los anticuerpos monoclonales que surgen todos de la misma célula madre por lo que todos tienen los mismos paratopos y reconocen el mismo epítipo del antígeno, los policlonales son una mezcla muy homogénea de anticuerpos producidos cada uno por una célula distinta por lo que si bien reconocen el mismo antígeno (gliadina) lo hacen por diferentes epítipos.

Buffer fosfato salino (PBS)

El PBS (por sus siglas en inglés phosphate buffered saline) es una solución buffer de pH 7,4 que contiene cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato disódico y fosfato monosódico en solución acuosa. El cloruro de sodio y cloruro de potasio aportan fuerza iónica a la solución que favorece las interacciones entre las proteínas y los grupos fosfato mantienen el pH constante. El PBS no genera interferencias en la reacción antígeno-anticuerpo y será utilizado como solución de lavado junto con el Tween 20.

Albúmina de suero bovino (BSA)

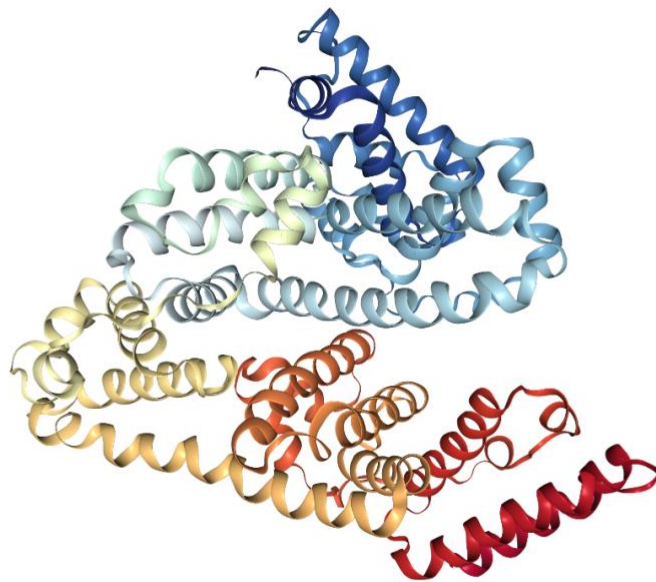


Figura 2. Estructura de la albúmina de suero bovino.

La solución de albúmina de suero bovino o BSA (por sus siglas en inglés bovine serum albumin) será utilizado como solución de bloqueo, es una de las soluciones de bloqueo más común y utilizadas en el ELISA, es una proteína que no interfiere ni con el anticuerpo ni con el antígeno y cubre los espacios que el primer anticuerpo no cubre en la placa de poliestireno durante la sensibilización, es fundamental durante el proceso ya que si no se utiliza el segundo anticuerpo conjugado a la enzima puede fijarse a la placa de poliestireno y no a la gliadina, dando así un falso positivo de gliadina.

Tween 20

El tween 20 es tensoactivo no iónico que se utilizara como detergente ya que no genera interferencias con la reacción antígeno-anticuerpo y se utiliza para prevenir interacciones de baja energía no específicas entre proteínas que podrían dar un falso positivo durante el ensayo de ELISA.

Peroxidasa de rábano (HRP)

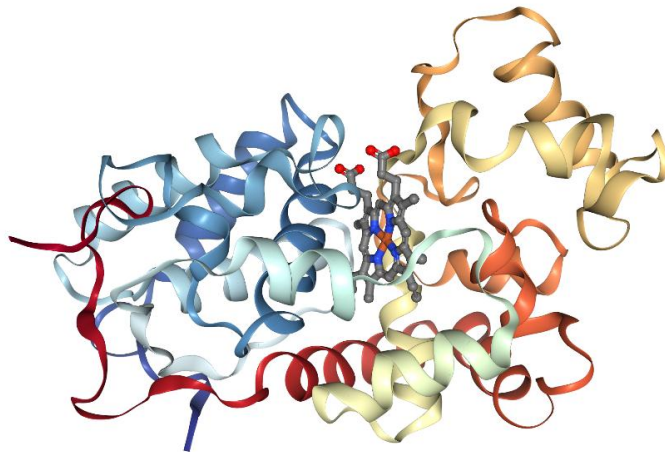


Figura 3. Estructura peroxidasa de rábano.

La peroxidasa de rábano HRP (por su siglas en inglés Horseradish peroxidase) con peróxido de hidrogeno como sustrato es ampliamente utilizada en el ensayo de ELISA, en este caso la peroxidasa de rábano (HRP) estará conjugada al segundo anticuerpo anti-gliadina.

La peroxidasa de rábano es un holoenzima con una masa molecular de aproximadamente 40200 dalton y contiene una ferriprotoproteína por molécula, que sea un haloenzima significa que tiene una apoenzima, la cual es la parte proteica, que necesita de un cofactor para poder llevar a cabo su reacción enzimática.

La apoenzima es una glicoproteína de 308 aminoácidos y ocho cadenas laterales de glúcidos unidas a través de residuos de asparagina. La cadena polipeptídica sola tiene una masa molecular de 33,890 dalton y tiene cuatro enlaces disulfuro. La estructura covalente consiste en dos dominios compactos que forman el grupo hemina. (Deshpande 1996)

El sustrato peróxido de hidrógeno también es un potente inhibidor, por lo que deben usarse concentraciones definidas, en esta caso se utiliza 5 µl de H₂O₂ al 60 %. La reducción del peróxido de hidrogeno por la enzima se logra observar gracias al cromógeno (en este caso el cromógeno será TMB) que genera un cambio de color en la solución.

3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)

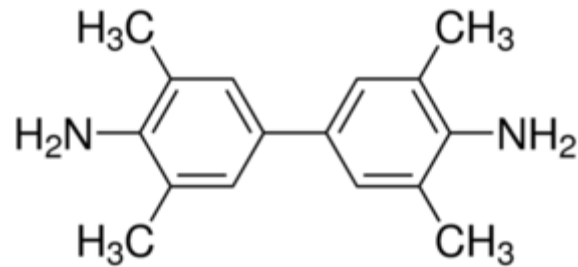


Figura 4. Estructura del TMB.

La tetrametilbenzidina (TMB) se utiliza como un cromógeno, un cromógeno es una sustancia que puede producir pigmentación, este se agrega junto al sustrato peróxido de hidrogeno y este puede percibir la reducción del peróxido de hidrogeno dada por la acción enzimática de la peroxidasa y mostrar un cambio de color , (si no hay acción enzimática no hay cambio de color) a azul que puede leerse en el espectrofotómetro a 650 nm, pero se le agregara ácido sulfúrico 2 mol/L para detener toda acción enzimática, la solución queda de un color amarillo que se puede leer a 450 nm en el espectrofotómetro.

Materiales y Sustancias/soluciones:

Materiales

Placas Microlon de Greiner

Incubador

Centrifugadora

Pipeta automática 2-20 μ L

Pipeta automática 20-100 μ L

Pipeta automática 100-1000 μ L

Vortex (agitador)

Espectrofotómetro de placas

Agitador orbital

Microtubos Pellets

Sustancias y soluciones

Cloroformo

Etanol 70 %

PBS (buffer fosfato salino)

Tween 20 (detergente)

BSA (albumina de suero bovino)

Quesos rallados (El trébol, El trébol en hebras, Conaprole, Lácteos Pando y Las Acacias)

Harina de trigo (control positivo)

Almidón de maíz (control negativo)

Inmunoglobulinas G de conejo Anti-gliadina policlonales

Inmunoglobulinas G de conejo Anti-gliadina policlonales conjugadas con peroxidasa

Peróxido de hidrogeno 60 %

TMB (cromógeno)

Procedimiento:

Preparación de las placas ELISA

1. Sensibilizar las placas con una solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ de inmunoglobulinas de conejo anti-gliadina en PBS 100 μL por pocillo. Incubar toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$, en cámara húmeda.
2. Desechar el contenido de la placa y golpearla contra una superficie absorbente para que no queden gotas en los pocillos.
3. Bloquear con una solución de PBS-BSA 1 % ,200 μL por pocilla. Incubar 2 horas, a temperatura 37 $^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda.
4. Guardar en la heladera hasta obtener las diluciones de las muestras
5. Antes de agregar las diluciones de la muestra problema lavar 3 veces, durante 2 minutos cada vez, con PBS-T20 0,05 % (PBS-T) 200 μL por pocillo.

Extracción de prolaminas

1. 100 mg de la muestra pulverizada + 1mL cloroformo
2. Agitar en vortex durante 5 minutos a potencia media
3. Centrifugar 5 min. A 10000 rpm en centrifuga
4. Guardar el pellet y desechar la fase clorofórmica
5. Añadir nuevamente 1 mL de cloroformo
6. Agitar en vortex por 5 minutos a potencia media
7. Guardar el pellet y desechar la fase clorofórmica
8. Agregar 1 mL de etanol 70 %
9. Agitar en vortex por 10 minutos
10. Centrifugar 5 minutos a 1000 rpm
11. Guardar solución sobrenadante de etanol 70 %

Diluciones de las muestras problema y ELISA

1. Diluir los extractos de los alimentos, el control positivo y el control negativo 1/50 en PBS-T-BSA 1 % (PBS-T-BSA).
Usar como estándar diluciones seriadas a partir de 250 ng/mL en PBS-T-BSA-etanol 70 al 2 % (realizar 9 diluciones).
Usar como blanco PBS-T-BSA-et 70 % al 2 %
Sembrar 100 μL por pocillo y por triplicado.
Incubar 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.
2. Lavar 3 veces ,durante 2 minutos cada vez, con PBS-T20 0,05 % (PBS-T) 200 μL por pocillo
3. Sembrar 100 μL por pocillo de inmunoglobulinas de conejo anti-gliadina conjugadas a peroxidasa, diluidas en PBS-T-BSA.

Incubar 1 horas a 37 °C en cámara húmeda

4. Lavar 3 veces, durante 2 minutos cada vez, con PBS-T20 0,05 % (PBS-T) 200 µL por pocillo
5. Lavar 1 vez durante 5 minutos con PBS, 200 µL
6. Revelar con solución de 12,5 mL de citrato-fosfato(buffer pH 5) 200 µL TMB con 5 µL de H₂O₂ al 60%
7. Agitas 25 minutos
8. Luego agregar 100 µL l por pocillo de H₂SO₄ 2 mol/L

Cuantificación mediante espectrofotometría

1. Medir absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro de placas

Resultados y tratamiento de datos:

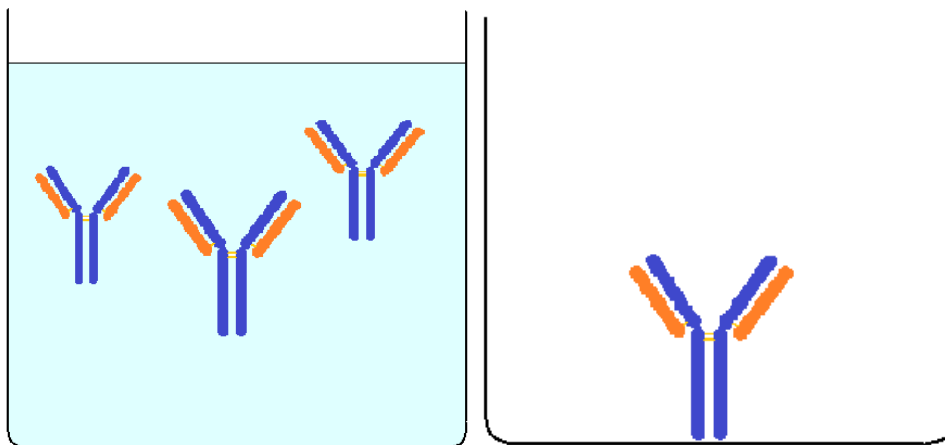
Sensibilización de las placas microlon de greiner para el ELISA

Se agrega la solución de 5 µg/mL de inmunoglobulina G Anti-gliadina de conejo para sensibilizar las placas, en esta faceta se inmovilizaran los anticuerpos anti-gliadina a la placa de poliestireno mediante interacciones hidrofóbicas.

El anticuerpo agregado está en un súper exceso a lo que pueden ser las concentraciones de α , γ y ω gliadinas presentes en las muestras que se agrega luego (que además están diluidas), aun así las afinidad de los anticuerpos con la placa de poliestireno no es tan buena por lo que no recubren toda la superficie de la placa.

Se deja toda la noche a 4 °C para que se den las interacciones hidrofóbicas y se fije el anticuerpo a la placa.

Luego se desecha el contenido de la placa que contiene los anticuerpos que no se fijaron y nos quedan únicamente los anticuerpos que se inmovilizaron en la placa.



Figuras 5 y 6. Representación de que sucede cuando se añaden los anticuerpos, se fijan algunos y los que no se fijan se quitan mediante el lavado.

Bloqueo de las placas con BSA (albumina de suero bovino)

Se agrega la solución de BSA (albumina de suero bovino) como solución de bloqueo, se encarga de cubrir los espacios donde no se fijaron anticuerpos. La solución de BSA no genera ninguna interferencia con el anticuerpo y además tiene una muy buena afinidad por la placa de poliestireno.

Se deja dos horas incubando a 37°C, a esta temperatura se favorece la velocidad con la que se dan las interacciones hidrofóbicas con las que se fija la albumina de suero bovino a la placa de poliestireno sin alterar los anticuerpos.

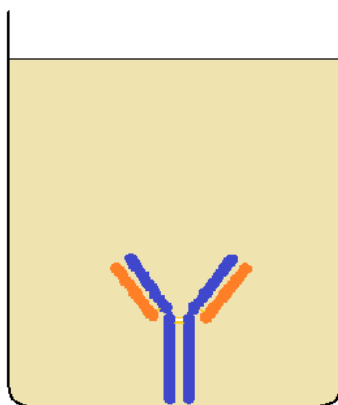


Figura 7. Se añade la solución bloqueo BSA.

Luego se descarta toda la solución de BSA que no se haya fijado a la placa y se lava con Tween-20 para eliminar posibles interacciones de proteína-proteína no deseadas.

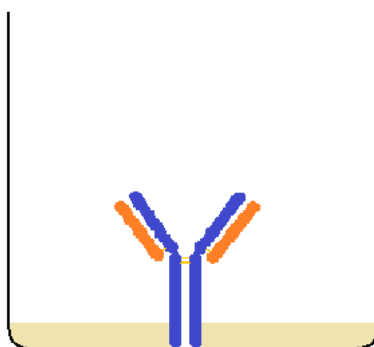


Figura 8. Representación de como al lavar solo queda la solución BSA que se adhirió a la placa cumpliendo así su función como solución de bloqueo.

Preparación de las muestras

A cada uno de los 5 quesos rallados utilizados se les asigno un código con el cual poder rotular los tubos pellet en los que se realice la extracción para identificarlos fácilmente. Se tomó aproximadamente 0,1 g de cada queso rallado y de los controles positivos y negativos (harina de trigo y almidón de maíz respectivamente).

En el caso de los quesos rallados en hebras se tuvo que usar el mortero para pulverizar las muestras.

La masa es tomada directamente en los microtubos pellet.

Queso rallado	código	Masa tomada (g)
El trébol	Q1	(0,0991±0,0001)
Conaprole	Q2	(0,0989±0,0001)
El trébol(en hebras)	Q3	(0,1022±0,0001)
Lácteos Pando	Q4	(0,0996±0,0001)
Las acacias	Q5	(0,1018±0,0001)
Harina de trigo	+	(0,1021±0,0001)
Almidón de maíz	-	(0,1050±0,0001)

Tabla 1. Quesos analizados, códigos asignados y sus respectivas masas.

Debido al gran contenido de lípidos en los quesos rallados, aproximadamente entre un 30 y 40% de la porción, se debe realizar un paso extra anterior a la extracción de las gliadinas, en este paso se procede a la deslipidizar las muestras con cloroformo.

Se agrega 1 mL de cloroformo a cada queso rallado para así lograr que los Lípidos que son insolubles en agua pero muy solubles en solventes orgánicos apolares como el cloroformo se disuelvan, se agita en vortex para disolver los lípidos en el cloroformo, luego se centrifuga y se desecha la fase clorofórmica que contiene a los lípidos. Se repite dos veces para asegurar la eliminación de los lípidos.

Extracción gliadinas

Se agrega 1 mL de etanol 70 % a las muestras de queso rallado y los controles (harina de trigo y almidón de maíz), se utiliza etanol 70 % ya que es donde son solubles las gliadinas (tanto las α , como las γ y las ω gliadinas), se utiliza el vortex para disolver, luego se centrifuga y se extrae el sobrenadante que será el etanol 70% con las gliadinas ya disueltas en el mismo. El sobrenadante extraído se pasa a otros microtubos pellet.

Diluciones de las muestras y controles y diagrama de placa

De las muestras de queso rallado se hicieron diluciones de 1:50 y también de 1:10, con los controles positivo y negativo solo se hicieron diluciones de 1:50. Se posición de la siguiente manera sobre la placa microlon de greiner.

Diagrama de placa microlon de greiner:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	30ng/ml	40ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	150ng/ml	250ng/ml	positivo	negativo
B	Blanco	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	30ng/ml	40ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	150ng/ml	250ng/ml	positivo	negativo
C	Blanco	10ng/ml	15ng/ml	20ng/ml	30ng/ml	40ng/ml	50ng/ml	100ng/ml	150ng/ml	250ng/ml	positivo	negativo
D	Blanco											
E	Blanco	Q1 1:50	Q2 1:50	Q3 1:50	Q4 1:50	Q5 1:50		Q1 1:10	Q2 1:10	Q3 1:10	Q4 1:10	Q5 1:10
F	Blanco	Q1 1:50	Q2 1:50	Q3 1:50	Q4 1:50	Q5 1:50		Q1 1:10	Q2 1:10	Q3 1:10	Q4 1:10	Q5 1:10
G	Blanco	Q1 1:50	Q2 1:50	Q3 1:50	Q4 1:50	Q5 1:50		Q1 1:10	Q2 1:10	Q3 1:10	Q4 1:10	Q5 1:10
H	Blanco											

Tabla 2. Diagrama de la placa.

En este diagrama se marcan en los 96 pocillos de la placa microlon de greiner como se posicionaran las muestras, los controles, los blancos y las soluciones con concentraciones conocidas de gliadina para hacer la curva de calibración.

En la primera columna se colocaron todos los blancos, que son los blancos de los valores que están en su fila.

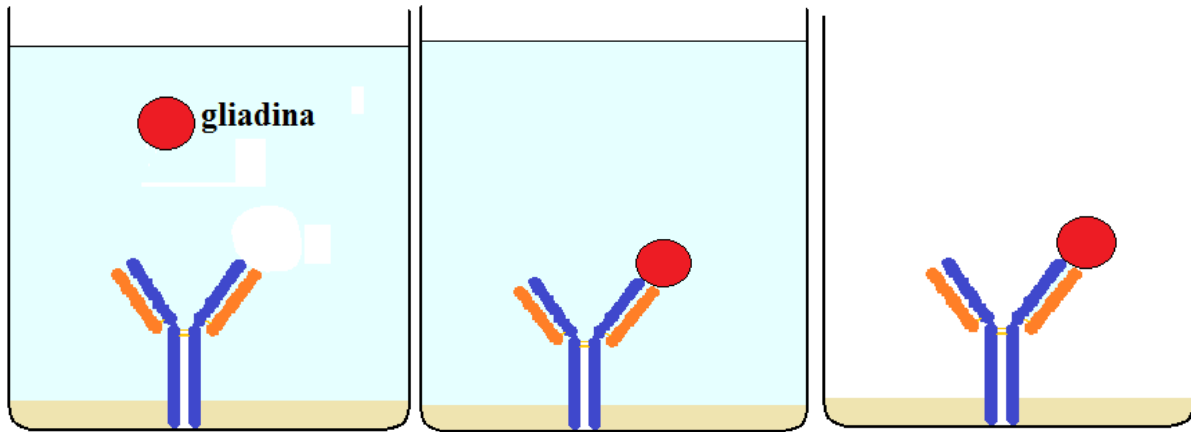
En color verde se marcaron las soluciones para la hacer la curva de calibración con sus respectivas concentraciones, en color rojo y gris se marcaron los controles positivos y negativos respectivamente, los controles están diluidos 1:50 ambos.

Los alimentos se marcaron con sus respectivos códigos ya asignados y a su lado tienen la dilución que les corresponde ya sea 1:50 o 1:10.

ELISA

Al agregarse las soluciones ya diluidas a la placa microlon de greiner con los anticuerpos inmovilizados anteriormente, si hay gliadinas presentes en las muestras estas se unirán al anticuerpo anti-gliadina inmovilizado en la placa.

Se deja incubar durante dos horas a 37°C para favorecer y acelerar la unión antígeno (gliadina)-anticuerpo (inmunoglobulina G anti-gliadina).



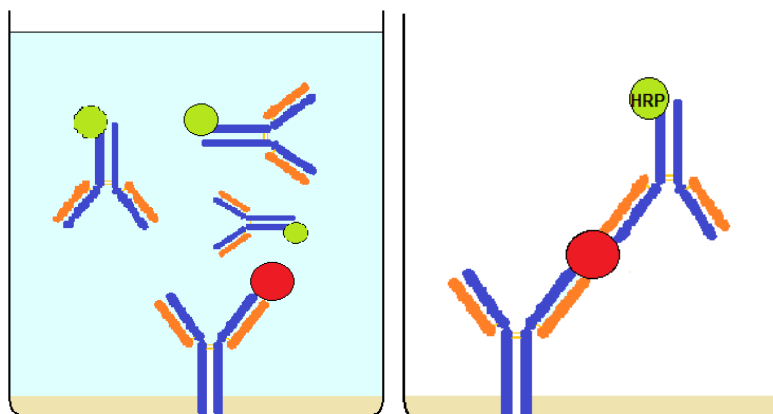
Figuras 9,10 y 11. Representación de cómo se une la gliadina al anticuerpo, se agrega la muestra, si tiene gliadinas estas se unen al anticuerpo, luego se desecha todo lo demás.

Se lava con la solución buffer PBS con tween-20 (detergente) para eliminar todo posible residuo no deseado, ya sean lípidos u otras proteínas que puedan generar una unión no deseada con el anticuerpo.

Siempre todas las diluciones están en el buffer PBS para evitar cambios de pH y además porque el PBS aporta una determinada fuerza iónica que favorece las interacciones entre el antígeno y el anticuerpo.

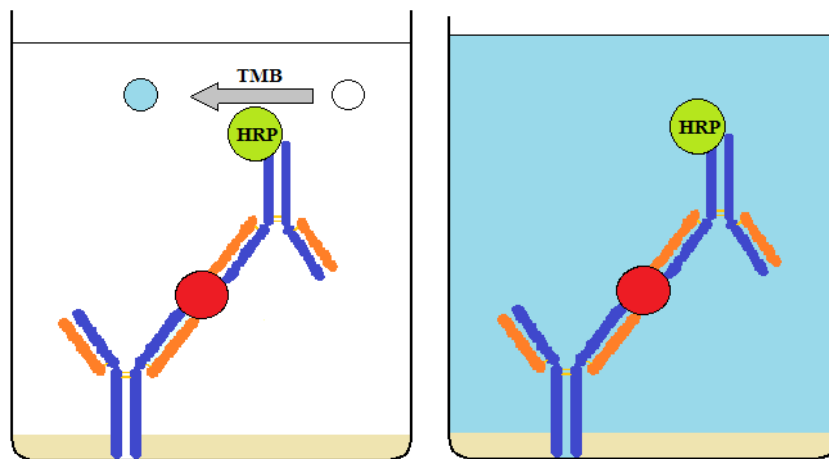
Luego se lava y se agrega el segundo anticuerpo anti-gliadina conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), este segundo anticuerpo anti-gliadina con la enzima conjugada reacciona con las gliadinas inmovilizadas en los primeros anticuerpos, la gliadina queda atrapada entre los dos anticuerpos como formando un sándwich.

Se lava nuevamente, esta vez es para quitar todas las anti-gliadinas conjugadas a la peroxidasa que no se unieron a ninguna gliadina, este paso es fundamental ya que si no se hace obviamente habrá coloración cuando se agrega el sustrato, es por eso que en esta parte se lava durante más tiempo para asegurar que no haya un falso positivo.



Figuras 11 y 12. Representación de cómo se une el segundo anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, se unen a la gliadina ya unida al primer anticuerpo formando un “sándwich”, los que no se unen se lavan.

Se agrega el sustrato peróxido de hidrogeno con el cromógeno tetrametilbenzidina (TMB), se debe ser cuidadoso con la cantidad de peróxido de hidrogeno, esta cantidad es de 5 μL H_2O_2 60% en de 12,7 mL de solución debido a que el peróxido de hidrogeno es un fuerte inhibidor enzimático.



Figuras 12 y 13. Representación de como el TMB percibe la acción de la enzima sobre el peróxido.

El tetrametilbenzidina (TMB) “percibe” la acción enzimática de la peroxidasa sobre el peróxido de hidrogeno y presenta un cambio de color de incoloro a azul. El cambio se debe a la oxidación del TMB debido a la acción del peróxido de hidrogeno como agente oxidante, esto solo sucede si la enzima conjugada al anticuerpo actúa sobre el peróxido de hidrogeno.

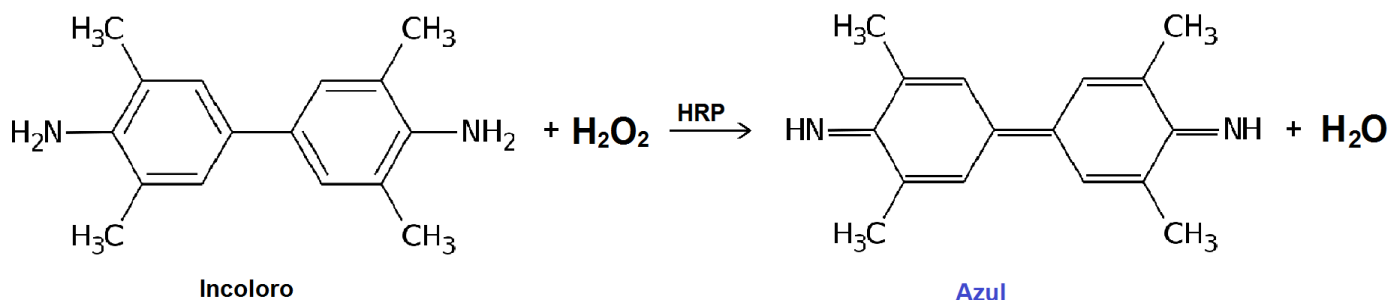


Figura 14. Oxidación del TMB.

Se deja agitando para que ocurra la acción enzimática y luego se utiliza H_2SO_4 2 mol/L para detener toda acción enzimática debido a que el cambio de pH inutiliza (desnaturaliza) la enzima y evita acción enzimática no deseada durante la espectrofotometría, la solución se vuelve color amarillo y se lee a 450 nm.

Espectrofotetría resultados

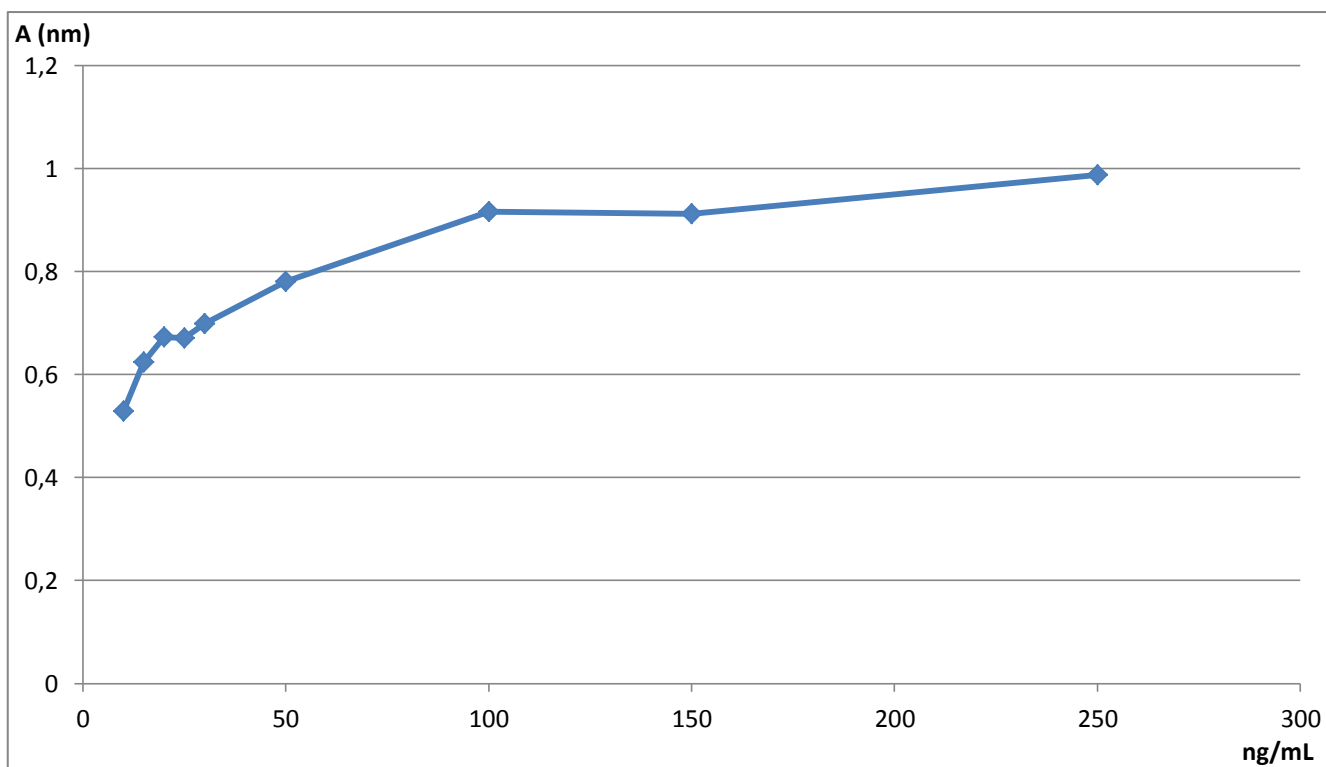
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,188	0,728	0,856	0,85	0,865	0,891	1,020	1,132	1,119	1,137	0,998	0,185
B	0,196	0,721	0,879	0,876	0,87	0,892	0,938	1,081	1,114	1,198	0,957	0,142
C	0,179	0,716	0,877	0,89	0,855	0,890	0,964	1,113	1,081	1,205	0,999	0,158
D	0,183											
E	0,18	0,145	0,157	0,162	0,19	0,146		0,131	0,125	0,125	0,142	0,115
F	0,179	0,158	0,191	0,167	0,165	0,131		0,129	0,141	0,241	0,107	0,104
G	0,194	0,162	0,162	0,165	0,157	0,133		0,296	0,127	0,118	0,114	0,134
H	0,192											

Tabla 3. Resultados de la espectrofotetría.

Curva de calibración

Concentración (ng/mL)	Absorbancia (nm)
10	0,529
15	0,624
20	0,673
25	0,671
30	0,698
50	0,780
100	0,916
150	0,912
250	0,987

Tabla 4. Concentraciones conocidas de gliadina con sus respectivas absorbancias.



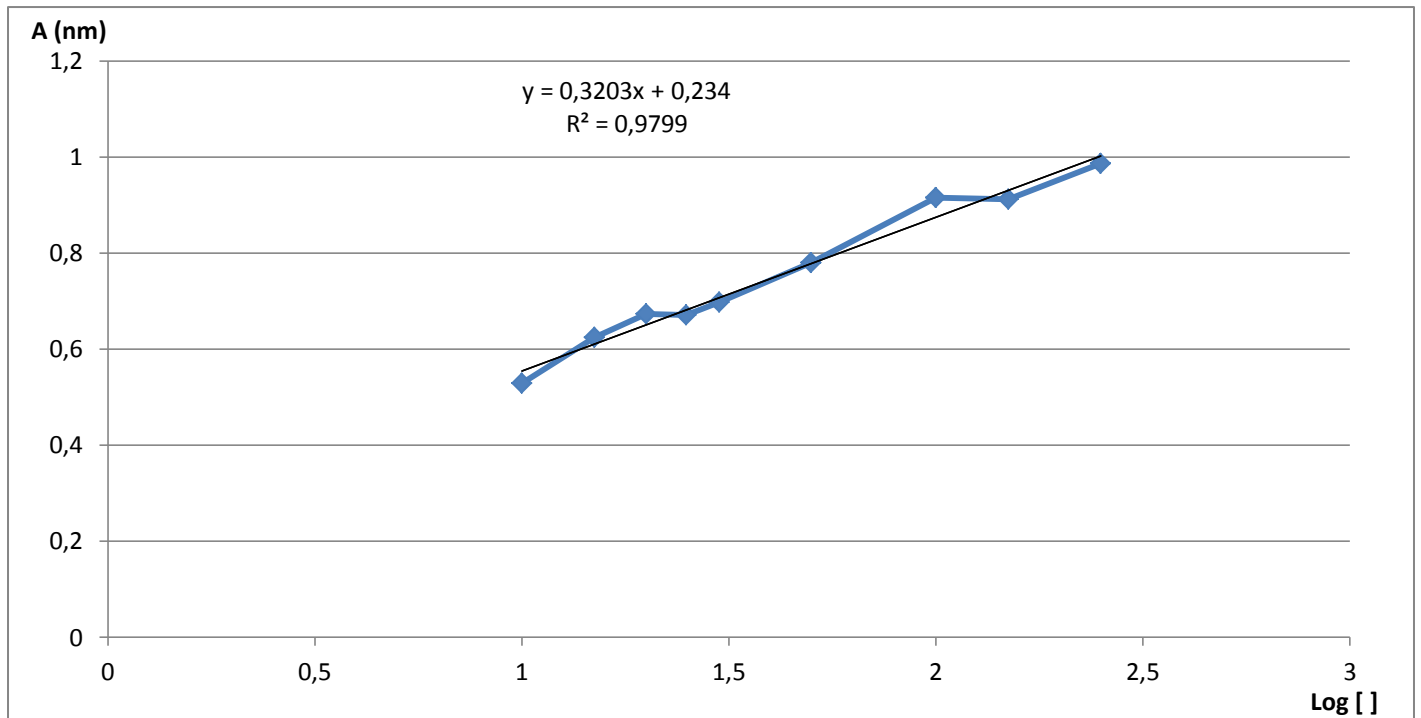
Gráfica 1. Gráfica de la tabla 4.

Durante los inmunoensayos normalmente las gráficas de las curvas de calibración de concentración en función de absorbancia no dan una línea recta, por lo que se debe hacer una interpolación para elaborar una

recta a partir de los datos obtenidos experimentalmente y así poder obtener la ecuación de la recta, en este caso es fácil solo hay que aplicar logaritmo en base 10 a la concentración.

Log concentración	Absorbancia (nm)
1,00000	0,529
1,17609	0,624
1,30103	0,673
1,39794	0,671
1,47712	0,698
1,69897	0,780
2,00000	0,916
2,17609	0,912
2,39794	0,987

Tabla 5.

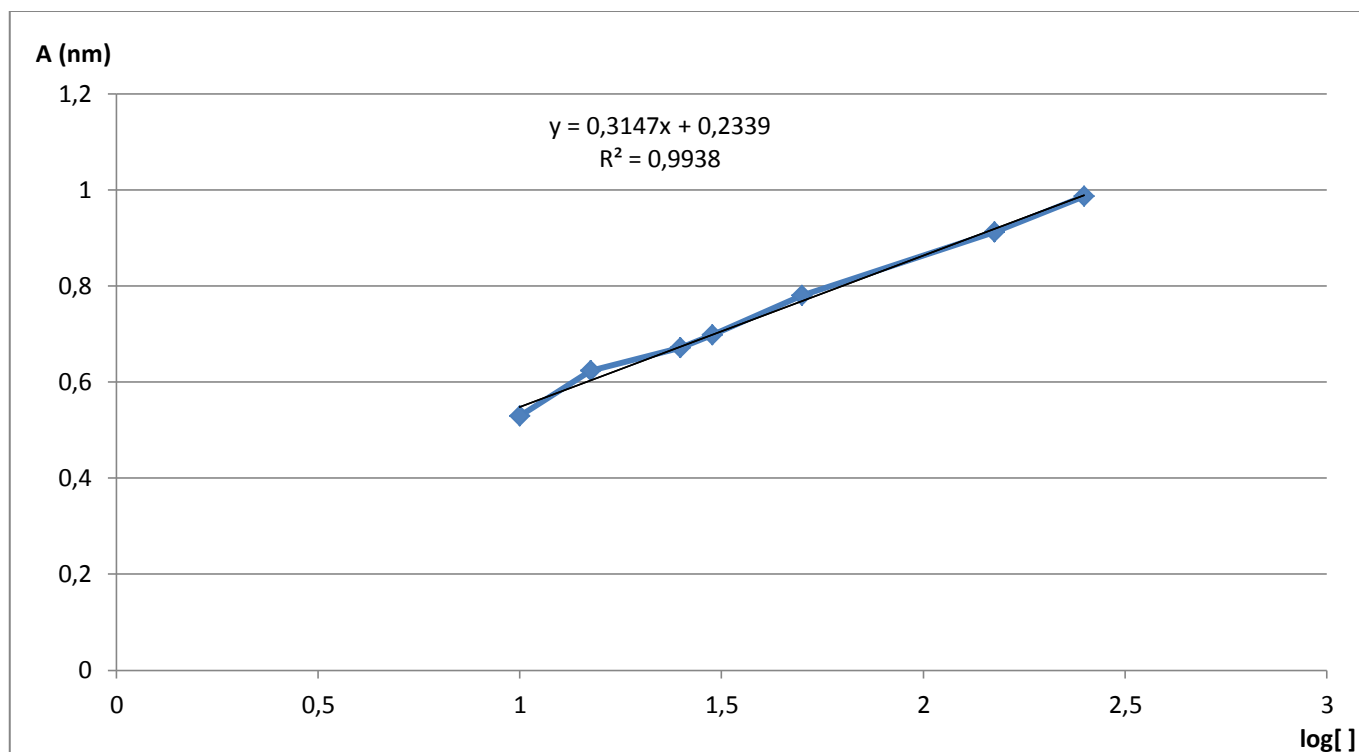


Gráfica 2. Gráfica de la tabla 5.

En la diluciones de 20 ng/mL y 100 ng/mL hay una clara variación incoherente en su absorbancia, posiblemente por el hecho que para realizar el sembrado en la placa de microlon de greiner se utilizó el mismo tip en la pipeta automática comenzando de las soluciones con menor cantidad a las de mayor para así ahorrar plástico, esto posiblemente genero el arrastre de gliadina hacia estas soluciones. Debido a esto se eliminaron de la curva de calibración.

Log concentración	Absorbancia (nm)
1,00000	0,529
1,17609	0,624
1,39794	0,671
1,47712	0,698
1,69897	0,780
2,17609	0,912
2,39794	0,987

Tabla 6.



Gráfica 3. Gráfica de la tabla 6.

Cálculos de concentración

Todos los quesos rallados dieron negativo a la presencia de α , γ y ω gliadinas, tanto las diluciones de 1:10 como las de 1:50, se puede asegurar que la presencia de gliadinas en los 5 quesos rallados analizados es menor a la de 10 ng/ml, la absorbancia de los mismos además de quedar muy por debajo del mínimo de la curva de calibración, al restársele el blanco la absorbancia da un valor negativo.

Se realizaron los cálculos para cuantificar las α , γ y ω gliadinas presentes en la harina de trigo (el control positivo), primero se le deben restar a las 3 réplicas sus respectivos blancos.

Blanco (nm)	Absorbancia (nm)	Absorbancia (nm) menos blanco
0,188	0,998	0,810
0,196	0,957	0,761
0,179	0,999	0,820

Tabla 7. Absorbancia de la harina de trigo.

Promedio de absorbancia de Harina de trigo=0,797

$$x = \frac{0,797 - 0,2339}{0,3147} = 1,789$$

Debido a que se tuvo que hacer logaritmo en base 10 para poder hacer la curva de calibración, ahora hay que aplicar la inversa para obtener el valor en ng/ml, el resultado obtenido es = 61,512 ng/mL

Esta concentración de obtenida de gliadina es la de la dilución de 1:50 de la muestra de harina de trigo, para obtener el valor real de gliadina en la muestra de trigo hay que multiplicar el valor por 50.

$$61,512 \text{ ng/mL} \cdot 50 = 3075,6 \text{ ng/mL}$$

Masa tomada anteriormente de harina de trigo= (0,1021±0,0001) g

Hay 3075,6 ng de gliadinas cada 0,1021 g de harina de trigo.

El límite establecido es de 1 mg de gliadinas cada 100 g lo que vendría siendo 10 ppm, a continuación se verá cuantas α , γ y ω gliadinas hay en 100 g de harina de trigo y por cuanto se supera el límite establecido.

0,1021 g _____ 3,0756 μ g

100,0 g _____ x= 3012,3 μ g =3,0123 mg

Hay 3,0123 mg de α , γ y ω gliadinas por cada 100 g de harina de trigo, la cantidad triplica el límite establecido de 1 mg cada 100 g.

Partes por millón de α , γ y ω gliadinas en 100 g de harina de trigo

$$ppm = \frac{mg \text{ soltu}(gliadina)}{kg \text{ solucion}(harina \text{ de } trigo)}$$
$$ppm = \frac{3,0123 \text{ mg}}{0,100 \text{ kg}} = 30,123 \text{ ppm}$$

Conclusión:

Se logró analizar con éxito los 5 quesos rallados y se pudo comprobar que estos contienen cantidades de α , γ y ω gliadinas muy inferiores a las de 10 ng/mL, por ende todos los quesos rallados analizados son aptos para los celíacos debió a que esta cantidad está por debajo del límite permitido de 1 mg por cada 100 g.

Se pudo identificar y cuantificar las α , γ y ω gliadinas presentes en la harina de trigo, se llegó a la conclusión de que hay $3,0756E^{-3}$ mg de α , γ y ω gliadinas por cada 1,021 mg total de harina de trigo.

Bibliografía:

Deshpande, S. (1996). *Enzyme immunoassays: from concept to product development*. New York: Chapman & Hall.

Crowther, J. (2009). *The ELISA guidebook*. New York, NY: Humana Press.

Urade.R (2017 Sep 29). *Gliadins from wheat grain: an overview, from primary structure to nanostructures of aggregates*. NCBI.

Hernández,E,N. (2015).*Importancia de las proteínas de almacenamiento en cereales (prolaminas)*.

Bai,C,J. (Abril de 2012). *Enfermedad celíaca*.

De la Vega, R, G.(2009). *Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales*.

Sanabria, A ,S.(2007). *Anticuerpos: sus propiedades, aplicaciones y perspectivas*.

Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (4ta edición). México: Pearson.

Estructura primaria de alfa gliadina (*triticum aestivum*) recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AFB35200.1>

Estructura primaria de gamma gliadina (*triticum aestivum*) recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAQ63860.1>

Estructura primaria de Omega gliadina (*triticum aestivum*) recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAT01617.1>

Figura 1. Recuperada de https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-an-immunoglobulin-G-IgG-mAb-structure-The-IgG-molecule-is_fig2_280879734

Figura 2. Estructura de albúmina de suero bovino recuperado de <https://www.rcsb.org/structure/3v03>

Figura 3. Estructura de peroxidasa de rábano recuperado de <https://www.rcsb.org/structure/1h58>