

Validación del método SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas en un extracto alergénico de soya

Validation of SDS-PAGE method for the proteins composition determination in an allergenic extract from soybean

Wendy Ramírez González (0000-0001-6349-1116)^a, Mayteé Mateo Morejón (0000-0003-2606-3416)^a, Raysa Cruz Jiménez (0000-0003-1580-3781)^a, Anette García Freijó (0000-0002-1813-7318)^{a,*}, Alexis Labrada Rosado (0000-0003-0956-7946)^a.

^a Centro Nacional de Biopreparados, Bejucal, Mayabeque, Cuba.

^{a,*} anette.garcia@biocen.cu

Recibido: 9 de noviembre de 2021;

Aceptado: 20 de diciembre de 2021;

RESUMEN

La soya es uno de los principales alérgenos alimentarios agrupados en el denominado grupo de los “grandes 8”. La validación de métodos analíticos evalúa su desempeño como control de calidad en la industria farmacéutica. El objetivo de este trabajo fue validar el método de SDS-PAGE para un extracto alergénico de soya. Se evaluó la Precisión (Repetibilidad y Precisión Intermedia) en la determinación del contenido relativo de las bandas principales. Como parámetro de Especificidad se determinó la posible interferencia del glicerol, comparando con la referencia liofilizada. Se determinó la Exactitud en la determinación del peso molecular y el Límite de Detección. Los componentes alergénicos fueron identificados comparando los patrones de electroforesis con las bandas identificadas por IgE mediante Western Blotting, además se determinaron las bandas reconocidas por los anticuerpos bloqueadores IgG4. Todos los criterios de aceptación establecidos se cumplieron. El coeficiente de variación fue menor de 5% en todos los casos. No hubo diferencias significativas entre diferentes analistas, (Fischer, $p > 0.05$). Se demostró la Exactitud en la determinación de pesos moleculares, no se evidenciaron diferencias significativas entre el valor medio hallado para las bandas principales y los valores teóricos de los alérgenos ($p > 0.05$). No existieron diferencias significativas entre los porcentajes de las bandas principales entre el extracto liofilizado y la formulación glicerinada ($p > 0.05$). El límite de detección de la técnica fue 0.5 µg de proteínas. En conclusión, la técnica SDS-PAGE quedó validada para un extracto alergénico de soya y puede emplearse en el control de la calidad del producto terminado.

Palabras claves: soya, validación, SDS-PAGE, extractos alergénicos.

ABSTRACT

Soybean is one of the foods that most frequently cause food allergies. Obtaining allergenic extracts makes possible the specific diagnosis of allergic sensitization through skin tests. Proteins composition is an essential quality requirement for allergenic extracts. Validation of analytical methods evaluates their performance for their use as quality control in the pharmaceutical industry. The aim of this work was to validate SDS-PAGE method for the proteins composition determination in an allergenic extract from soybean. Precision (Repeatability and Intermediate precision) was evaluated in determining the protein relative content of the main bands. The possible interference of glycerol (excipient of the finished product) was determined to evaluate the Specificity of the method. Were also analyzed the Accuracy and Limit of Detection of the method in the determination of the molecular weight of the extract main proteins. The bands of the main protein components were identified by comparing the electrophoresis patterns with the bands identified by IgE/IgG4 Immunoblotting. All pre-established acceptance criteria were met. The coefficient of variation was less than 5% in all cases. There were no significant differences between different analysts, within or between tests (Fischer, $p > 0.05$). Accuracy was demonstrated in the determination of molecular weights, there were no significant differences between the mean value found for the main bands and the theoretical values of the allergens ($p > 0.05$). There was no interference from glycerol in the formulation, there were no significant differences in the percentages of the main bands between the lyophilized extract and the glycerinated formulation ($p > 0.05$). The detection limit of the technique was 0.5 µg of proteins. In conclusion, the SDS-PAGE technique was validated for allergenic soybean extracts and can be used to control the quality of the finished product.

Keywords: Soybean, validation, SDS-PAGE, allergenic extracts.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas y la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, la alergia alimentaria (AA) se define como una “reacción adversa hacia determinados alimentos, que surge de una respuesta inmune específica, ya sea mediada por inmunoglobulina E (IgE), por células o por ambos”. La Organización Mundial de Alergia ha declarado que 2.5 % de la población en general padece algún tipo de AA, aunque los valores pueden variar de 1 a 10 % dependiendo de diferentes factores. La población infantil es la que resulta más afectada, con una prevalencia de 6 a 8 % (Reyes-Pavón et al., 2020).

Dentro del grupo de las alergias alimentarias, la mediada por IgE tiene una mayor repercusión desde el punto de vista clínico, ya que puede desembocar en la aparición de reacciones graves (De la Cruz et al., 2018). La IgG4 alérgica actúa como un anticuerpo bloqueador al competir con la IgE alérgica en la unión de alérgenos e inhibir la formación del complejo IgE-alérgico y es ampliamente considerado como un marcador de tolerancia a enfermedades alérgicas. El término respuesta Th2 modificada se ha utilizado para reflejar títulos altos de IgG4 alérgica que se presentan durante los estados de tolerancia (McGowan et al., 2019).

Los alérgenos alimentarios son proteínas o glucoproteínas de aproximadamente 5 a 100 kDa de peso molecular (PM) con capacidad de unirse específicamente a la IgE de pacientes alérgicos. Los principales alérgenos alimentarios agrupados en el denominado grupo de los “grandes 8” son: leche, huevo, maní, frutas secas, pescados, mariscos, soya, trigo y sus derivados. No obstante, la prevalencia de la AA a estos alimentos es variable en distintos países del mundo (Reyes-Pavón et al., 2020).

La soya (*Glycine max*) es una leguminosa comestible perteneciente a la familia Fabaceae. Los productos derivados de ella son ampliamente utilizados en la alimentación animal y humana, la industria farmacéutica y en diferentes manufacturas textiles. Por esta razón es considerada la leguminosa más importante del mundo (San Miguel et al., 2017). Alrededor de 28 proteínas de soya son reconocidas por IgE de pacientes alérgicos, sin embargo, sólo unas pocas han sido reconocidas como alérgenos. Entre ellas se encuentran: Gly m Bd 30K (~34 kDa), Gly m 4 (~17 kDa), Gly m TI (~21 kDa), Gly m 5, conformada por tres subunidades: α (~67 kDa), α' (~71 kDa) y β (~50 kDa) y Gly m 6, conformada por 5 subunidades: G1 (~53 kDa), G2 (~52,4 kDa), G3 (~52,2 kDa), G4 (~61,2 kDa) y G5 (~55,4 kDa) (allergen.org; allergome.org; Berneder et al., 2013; Mateo, 2014; Natarajan et al., 2018; Murakami et al., 2018; Pi et al., 2021).

Los extractos alérgicos son preparados que se emplean para el diagnóstico y la inmunoterapia específica de los individuos alérgicos. Se obtienen mediante la extracción de los componentes alérgicamente activos presentes en la materia prima (Molina-Sáenz et al., 2017). Su obtención hace posible el diagnóstico específico de la sensibilización alérgica mediante pruebas cutáneas. La utilización de preparados estandarizados permite una mayor precisión en el diagnóstico de enfermedades mediadas por IgE. Específicamente la composición de proteínas de los extractos alérgicos es un requisito de calidad muy importante. Para su producción es necesario contar con métodos para el control de la calidad validados permitiendo demostrar que los resultados obtenidos son confiables y reproducibles. Esto contribuye a asegurar la calidad del producto, así como la eficiencia productiva.

Tiene vital importancia la caracterización de los extractos según el perfil alérgico, pues este puede variar en dependencia de la región geográfica (Larsen y Dreborg, 2020). La técnica de electroforesis en geles de poliacridamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, siglas en inglés) es un método rápido, reproducible y de bajo costo. Es ampliamente utilizada para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Además, en su forma semipreparativa, constituye la técnica de entrada para la realización de Western Blotting, de manera que las proteínas se separan según su PM bajo la acción de un campo eléctrico y luego se transfieren a una membrana para estudios inmunológicos (Kendrick et al., 2019).

Según la GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del CECMED, la validación de los métodos analíticos desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos. Por todo lo planteado el objetivo de este trabajo fue validar el método de SDS-PAGE para un extracto alérgico de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de las muestras

Para la obtención del extracto alergénico se partió de semillas de soya suministradas por la Unidad Empresarial de Base de Semillas de San Antonio de los Baños, Artemisa. Se pesaron 200 g de semillas en balanza técnica (Sartorius, EUA). Luego se molieron en molino (*IKA WERK*, Alemania) y se trataron con éter dietílico a una proporción de 1:20 en un equipo *Soxhlet* (Alemania), para separar los lípidos. Para la extracción se le adicionó 2 L de tampón fosfato salino pH 7,4 (*sPBS*, siglas del inglés); NaCl 0,145 mol/L; Na₂HPO₄ 0,0085 mol/L; KH₂PO₄ 0,0044 mol/L. Seguidamente se extrajeron los componentes solubles, para ello se agitó la mezcla con la ayuda de un agitador de hélice (*IKA WERK*, Alemania) a una temperatura entre 4-8°C durante 6 h. Luego se centrifugó a 1792 g durante 60 minutos, seguido de una filtración por membrana de 0,8 µm en cápsulas SARTOBRAN (EUA), a una presión de 2 Bar en un sistema Sartorius (EUA). Se realizó un proceso de diafiltración-concentración utilizando un sistema Amicon CH2 (EUA) de 2 L de capacidad, con tres cartuchos de fibra hueca H10P10, y un diámetro de 10 kDa. Primero, se concentró hasta un volumen de 1 L, luego se diafiltró con 5 L de *sPBS* y finalmente se concentró hasta 0,5 L. Este volumen se esterilizó por filtración con membranas de 0,2 µm en cápsulas SARTOBRAN, (EUA) en un sistema Sartorius (EUA) en Gabinete de Seguridad Biológico clase A, acorde a las Buenas Prácticas de Manufactura, para la obtención del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA). A continuación, en condiciones asépticas utilizando Gabinete de Seguridad Biológica clase A, se prepararon diluciones del IFA en *sPBS*, a una concentración final de proteínas de y 2 mg/mL. Luego se procedió al llenado aséptico de una mitad del IFA obtenido, en bulbos 2R (1mL/bulbo), para su posterior liofilización y su empleo como material de Referencia Interna (RI) para pruebas *in vitro*. A la otra mitad del IFA se le adicionó 50% de glicerol (v/v), previamente esterilizado en autoclave GETINGE (Alemania) a 120°C por 30 minutos, para obtener una concentración final de proteínas de 1 mg/mL. Los extractos se conservaron hasta su uso; las variantes liofilizadas se almacenaron a -20°C y los glicerizados, entre 4 y 8°C.

Método analítico. SDS-PAGE

El sistema consta de una cámara de electroforesis acoplada a una fuente de corriente alterna. La técnica se realizó teniendo en cuenta que para la preparación de las muestras al extracto liofilizado se le realizó una dilución 1/8 y al glicerizado una dilución 1/4 en H₂O destilada. A partir de estas diluciones se tomaron 20 µL, se le adicionó igual cantidad de tampón reductor, se calentaron 5 minutos y se aplicaron posteriormente 10 µL. Se utilizó un Patrón de Bajo Peso Molecular de 14-97 kDa (Pharmacia). La corrida del gel se realizó bajo las condiciones: 25 mA de corriente y voltaje abierto. Una vez terminada la corrida, se tiñó 1 hora en la zaranda a temperatura ambiente y destiñó cambiando la solución de destinción 2 ó 3 veces para lograr una completa visualización de las bandas. Se realizó el análisis densitométrico mediante el sistema ImageMaster v4.0 (Amersham Pharmacia) y se determinaron el PM de las bandas detectadas y el área bajo la curva expresada en porcentaje del total (A%) de las bandas contenidas en los rangos seleccionados.

Western Blotting IgE /IgG4

Para definir las bandas principales a identificar en el extracto de soya, se realizó la técnica de SDS-PAGE como se describe anteriormente hasta concluir la corrida del gel, seguida de inmunotransferencia para evaluar la reactividad sérica de anticuerpos IgE e IgG4 a las proteínas del extracto. Se utilizaron los sueros de 30 pacientes (5 niños y 25 adultos, seleccionados por su sintomatología alérgica y prueba de punción cutánea positiva al extracto alergénico). El método analítico de inmunotransferencia se realizó de acuerdo con lo descrito por Mateo et al. en el año 2017.

Para la identificación de proteínas de unión a IgE e IgG4, se realizó la transferencia electroforética de los geles a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm, durante 2 h en el equipo de transferencia semisecco (Pharmacia). Luego se bloquearon los sitios inespecíficos con solución de bloqueo (leche descremada al 5%, PBS-Tween 20 al 0,1%), durante 1h a 37°C. Este paso se realizó con agitación en zaranda, condición que se mantuvo hasta el final del ensayo. Después las membranas fueron incubadas con los sueros de los pacientes (1 mL de suero diluido 1:2 en BSA al 0,5% PBS-Tween 20 al 0,1%), durante 12 horas a 4°C. Luego se aplicó el conjugado anti-Fc IgE humana-Peroxidasa (Sigma, Alemania), dilución 1:2000 en BSA al 0,5% PBS-Tween 20 al 0,1%, para la determinación de IgE; o anti-Fc4 IgG4 humana-biotina (Sigma,

Alemania), dilución 1:5000 en BSA 0,5% PBS-Tween20 al 0,1%, para la detección de IgG4. Posteriormente, para el caso de la determinación de IgG4, la membrana se incubó durante 30 min a 37°C, con 1 mL del conjugado Estreptavidina-Peroxidasa (Sigma, Alemania), dilución 1:10000 en BSA 0,5% PBS-Tween20 al 0,1%. Entre cada etapa de incubación se realizaron tres pasos de lavado de 10 minutos cada uno, con solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0,1%). Para el revelado, las membranas se incubaron durante 10 min a 20°C y protegidas de la luz, con sustrato cromogénico Diaminobencidina (DAB), catalizador de cobalto y urea (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Alemania), tabletas reconstituidas en agua destilada, a razón de (1 tableta de DAB + 1 tableta de urea) en 5 mL de agua destilada. La reacción se detuvo con agua destilada (tres lavados) durante 10 min a 20°C y luego se secaron sobre papel de filtro. Para el procesamiento se utilizó el equipo SHARP JX-300 (Reino Unido) y se realizó un análisis densitómetro con ayuda del programa Imagen Master 1D versión 3.0 (Amersham-Pharmacia, Reino Unido).

Método de Validación

El método de validación fue diseñado de acuerdo con lo expresado en la GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del CECMED. Está compuesto por los ensayos de precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, especificidad y límite de detección. Las muestras empleadas fueron la RI liofilizada de Soya, lote: H101 y el extracto alergénico glicerinado de Soya, lote: HH10101, obtenidas según se describe en el acápite 2.1.

Para evaluar la **repetibilidad** de la técnica, fue realizado por un mismo analista un ensayo (como se describe en el acápite 2.2) para cada muestra aplicando 6 réplicas en cada caso. El análisis densitométrico del gel correspondiente a la RI se realizó por triplicado. Se determinaron, mediante una hoja de cálculo de Excel, la media de la suma de los valores de PM y de A%, de las bandas contenidas en los rangos seleccionados y la desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%) de la suma de los valores de A%. Se tuvieron como criterios de aceptación: que el CV% de A% entre réplicas de un mismo ensayo y entre diferentes análisis densitométricos fueran menor que el 5%, para cada suma.

El ensayo de **precisión intermedia** fue realizado por dos analistas en cuatro días diferentes para las muestras de producto final glicerinado por triplicado. Se determinaron la media, DE y CV% de la suma de los valores de A% de las bandas contenidas en los rangos seleccionados, para cada analista por separado y el total. Se tuvieron como criterios de aceptación que CV% entre diferentes días por un analista y el CV% total para cada rango sea menor que el 5% y además que no existieran diferencias significativas entre CV% de los analistas según la prueba de Fisher ($p > 0,05$).

La **exactitud** se evaluó comparando los resultados del PM de bandas principales de la RI obtenidos en el ensayo de repetibilidad con los valores de PM registrados en la literatura (17, 21, 34, 53, 55.4, 61, 67 y 71 kDa). Para ello se utilizó una prueba *t* de Student y se tuvieron como criterios de aceptación la no existencia de diferencias significativas entre los valores comparados ($p > 0,05$). Para determinar la especificidad se evaluó la posible interferencia del glicerol, excipiente del producto terminado, comparando con la referencia liofilizada. Se tomaron los resultados obtenidos en el estudio de repetibilidad. Criterio de aceptación: CV < 5% para los porcentajes de las bandas principales obtenidos entre los extractos alergénicos glicerinados y liofilizados.

El **límite de detección** fue determinado por un solo analista en un ensayo. Se utilizaron como muestras la RI liofilizada de soya preparada a diferentes concentraciones (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg/ml), siendo 1 µg/ml la concentración del extracto liofilizado en el resto de los ensayos de la validación.

RESULTADOS

Inmunorreactividad de anticuerpos IgG4 e IgE a las proteínas del extracto de soya

La inmunorreactividad a las proteínas del extracto de semillas de soya se estudió en el suero de 30 pacientes (5 niños, 25 adultos). En la Fig. I se muestran los resultados de este ensayo empleando la técnica de Western Blotting. Como se puede observar la banda cercana a los 34 kDa fue la más representada, siendo reconocida por la IgE de 23 sueros de pacientes (4 niños y 19 adultos) para un 76,6% de reconocimiento. Además, fue reconocida por la IgG4 de todos los sueros analizados.

Por otra parte, fueron reconocidas por la IgE las bandas entre 50-85 kDa en los sueros de 14 pacientes (4 niños y 10 adultos) para un 46,6% de reconocimiento. Además, por los Ac IgG4 de 22 sueros (17 y los 5

niños), para un 73,3% de reconocimiento. Se encontraron también dos bandas cercanas a **17 kDa** y a **21 kDa**, reconocidas la IgG4 de 40 y 33,3%, respectivamente, de los pacientes estudiados. Sin embargo, estas bandas no fueron reconocidas por la IgE de los pacientes incluidos en el estudio.

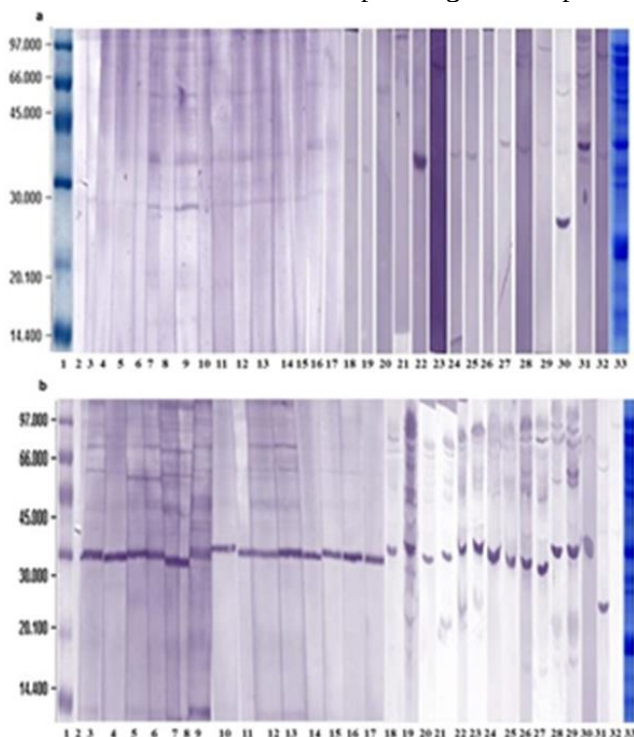


Fig. 1. Western Blotting de extracto de semillas de soja: a: perfil de unión a IgE, b: perfil de unión a IgG4. Carriles 1: Patrón de bajo peso molecular de 14-97 kDa (Pharmacia, Reino Unido); 2: Albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5% como control negativo; de 3-17 y 18-32: Proteínas del extracto incubadas con los sueros de los pacientes del estudio; 3, 18, 20 y 23: niños alérgicos; 4 al 17, 19, 21 y 22, 25 al 32: adultos alérgicos; 33: proteínas del extracto de semillas de soja separadas por SDS-PAGE.

Desempeño del método analítico

En la tabla I se muestran los resultados de los ensayos de Repetibilidad y Especificidad. Como se puede observar los valores del CV% determinados en todos los casos fueron menores que 5%, por lo que quedó demostrada la precisión intraensayo del método y su especificidad para las muestras analizadas.

Tabla 1. Resultados de la determinación de la repetibilidad y especificidad

	Parámetros determinados	Σ (A%) 15 – 23 kDa	Σ (A%) 34 – 43 kDa	Σ (A%) 50 – 85 kDa
e/ réplicas				
RI liofilizada	Media	41,173	19,582	39,260
	CV%	1,433	2,565	1,849
e/ análisis densitométricos				
	Media	40,918	19,616	39,474
	CV%	0,54	0,26	0,47
e/ réplicas				
Extracto glicerinado	Media	41,115	19,937	38,933
	CV %	1,72	2,70	1,26
	Media e/ RI y Gli	41,0	19,8	39,2
Especificidad	DE e/ RI y Gli	0,070	0,113	0,191
	CV% e/ RI y Gli	0,17	0,57	0,49

En el caso de la precisión intermedia, como se observa en la tabla II, los CV% calculados en cada caso fueron menores que el 5% y se demostró a través de la prueba de Fisher la no existencia de diferencias significativas entre los CV% de los analistas, pues los valores de p fueron mayores que 0,05. De esta forma se cumplieron los criterios de aceptación del ensayo y quedó demostrada la precisión interensayo de la técnica de SDS-PAGE para las muestras analizadas.

Tabla 2. Resultados de la determinación de la precisión intermedia

	Días	Σ (A%) 15 – 23 kD	Σ (A%) 34 - 43 kD	Σ (A%) 50 -85 kD
Analista 1	1	41,05	19,31	39,64
	2	40,77	19,22	40,01
	3	40,89	19,42	39,70
	4	40,60	19,29	40,09
Media		40,828	19,312	39,859
CV% e/ días		0,46	0,44	0,56
Analista 2	1	40,80	19,35	39,84
	2	40,49	19,48	39,79
	3	40,98	19,51	39,50
	4	40,45	19,61	39,93
Media		40,68	19,49	39,77
CV% e/ días		0,62	0,56	0,47
CV% total		0,54	0,67	0,50
Prueba Fisher (Valores de p)		0,64	0,68	0,78

La exactitud del método fue demostrada, pues, como se observa en la figura II, no hubo diferencias significativas (t Student, $p > 0.05$) entre los pesos moleculares determinados por la técnica de SDS-PAGE con las condiciones establecidas y los valores de referencia reportados en la literatura.

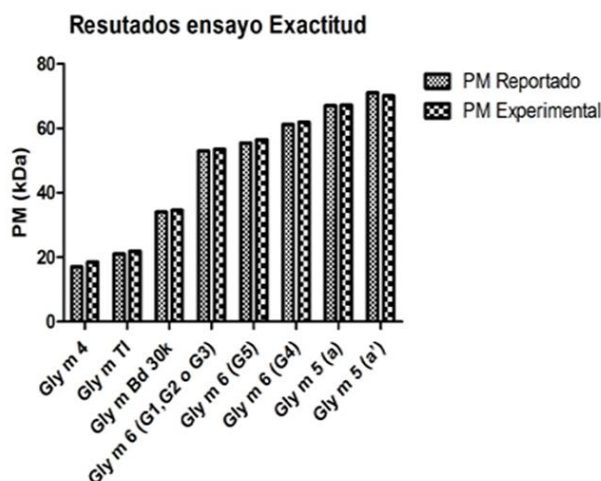


Fig. 2. Resultados de la evaluación de la exactitud del método de SDS-PAGE. No se observan diferencias significativas (t Student, $p > 0.05$) entre el peso molecular determinado experimentalmente para las bandas alergénicas principales del extracto de Soya y el peso molecular reportado en la literatura.

Como se observa en la figura 3, el límite de detección (LD) de la técnica resultó ser la concentración de 0.5 µg/ml, siendo reconocida como la menor concentración del extracto aplicada en que se detectan todas las bandas principales presentes en la muestra.

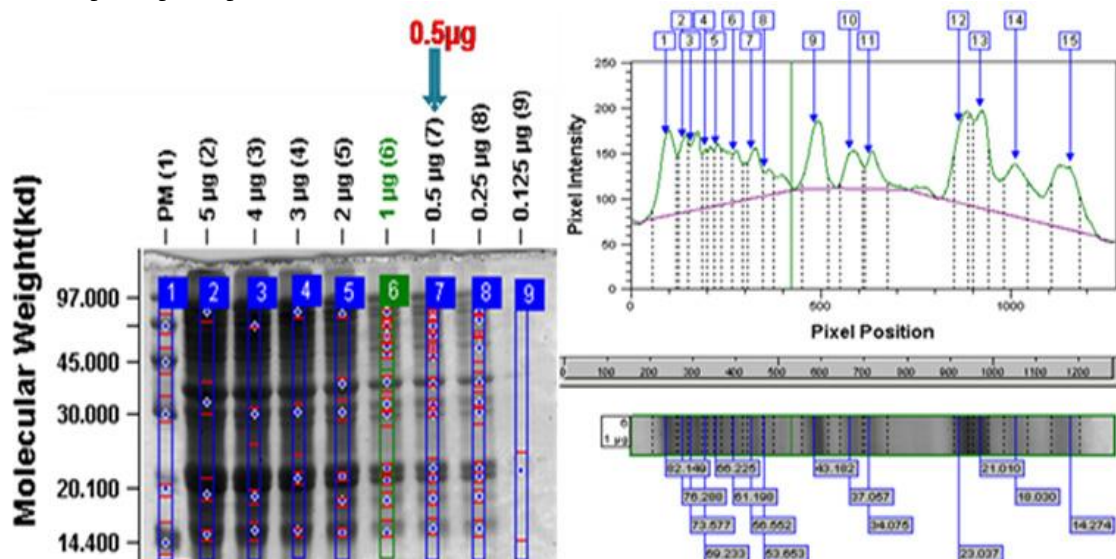


Fig. 3. Análisis densitométrico del SDS-PAGE de extracto de semillas de soja: carril 1. PPM de 14-97 kDa (Pharmacia, Reino Unido). Carriles 1: Patrón de bajo peso molecular; 2-9: RI liofilizada de soja a las concentraciones 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg/ml respectivamente. En verde en el carril 6 la concentración empleada en el resto de los ensayos (1 µg/ml). La flecha en carril 7 marca la concentración de 0.5 µg/ml, que corresponde al LD.

DISCUSIÓN

Inmunorreactividad de anticuerpos IgG4 e IgE a las proteínas del extracto de soja

La soja está compuesta aproximadamente por 38-40% de proteínas con funciones diversas. Se ha informado que alrededor de 28 de estas proteínas son alergénicas. Entre ellas se destacan: **Gly m Bd 30K** (34 kDa), **Gly m 4** (~17 kDa), **Gly m TI** (~21 kDa), **Gly m 5**, conformada por tres subunidades: α (67 kDa), α' (71 kDa) y β (50 kDa) y **Gly m 6**, conformada por 5 subunidades: G1 (53 kDa), G2 (52,4 kDa), G3 (52,2 kDa), G4 (61,2 kDa) y G5 (~55,4 kDa) (allergen.org; allergome.org; Berneder et al., 2013; Mateo, 2014; Natarajan et al., 2018; Murakami et al., 2018; Pi et al., 2021).

No obstante, los datos publicados sobre los alérgenos de la soja siguen siendo controversiales y se reconoce que no han sido identificados todos los componentes claves para predecir la reactividad clínica IgE alérgeno específica a este alimento (Pi et al., 2021).

La banda detectada en este trabajo a 34 kDa fue identificada tentativamente como **Gly m Bd 30K** (también conocida como **P34**), cisteína proteasa análoga a la papaína. Aunque P34 es relativamente, un constituyente menor de la semilla (menos del 1% de la proteína total), es considerada un alérgeno mayor o inmunodominante, habiéndose identificado como causa de reacciones alérgicas en pacientes sensibles a la soja. En varios estudios se ha demostrado que más del 65% de los pacientes sensibles a la soja muestran unión de IgE solo a esta proteína, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio (76,6% de reconocimiento) (Figueroa-García et al., 2012; Jeong et al., 2013; San Miguel et al., 2017). El contenido de **P34** suele ser alto en varios productos de la soja, por ejemplo, en la harina de soja (32 mg/g), aislado de proteína de soja (29 mg/g) y leche de soja (23 mg/g), lo cual es consistente con el patrón del consumo de productos de soja en Cuba, sobre todo para el yogur de soja (Mateo, 2014).

En este trabajo, también fueron reconocidas por la IgE del suero de pacientes bandas entre 50-85 kDa (46,6 %), pero con menor intensidad que la banda de 34 kDa. Este conjunto de bandas apretadas podrían corresponder a subunidades de Gly m 5 (b-conglicinina) y Gly m 6 (glicinina), dos proteínas de

almacenamiento que componen la mayor parte del contenido proteico de la soya, las cuales son reconocidas como los alérgenos más importantes y clínicamente relevantes de la soya en países desarrollados (Murakami et al., 2018).

Por otra parte, la banda detectada por la IgG4 alrededor de los 17 kDa pudiera corresponder con Gly m 4, proteína de transferencia de lípidos análoga a Bet v 1, conocido panalergeno respiratorio. Ha sido reportado que la sensibilización a Gly m 4, en ausencia de sensibilización a Gly m 5 y Gly m 6, está relacionada con síntomas graves y generalizados en la mayoría de los pacientes (Berneder et al. 2013).

En este estudio también se detectó por la IgG4 una banda cerca de los 21 kDa que pudiera corresponder con **Gly m TI**, inhibidor de la α -amilasa/tripsina, reportado como alérgeno de la soya. Sin embargo, ambas proteínas no fueron reconocidas por la IgE de los pacientes alérgicos evaluados. Por lo tanto, para confirmar la relevancia de la alergenidad de estas proteínas en la población cubana sería recomendable estudiar un mayor número de pacientes. Su reconocimiento por IgG4 y no por IgE pudiera sugerir que se ha logrado una tolerancia hacia ellas, tal vez por ser muy comunes en la dieta habitual en nuestro país. La selección de las bandas útiles para la técnica de SDS-PAGE como ensayo de control de calidad, debe tener en cuenta su relevancia clínica, así como los criterios de desempeño en el ensayo, particularmente la posibilidad de resolver claramente las bandas e identificarlas apropiadamente por su peso molecular.

Teniendo en cuenta las bandas principales identificadas como alérgicas (IgE) y antigénicas (IgG4), fueron seleccionadas para la validación del método (ensayos de exactitud y límite de detección), las bandas cercanas a los 17; 21; 34; 53; 56; 61 67 y 71 kDa. Para los ensayos de repetibilidad, precisión intermedia y especificidad se utilizaron los rangos de PM 15 – 23, 34 – 43 y 50 – 85 kDa, los cuales contienen a las bandas principales como se observa en la Tabla IV

Tabla IV. Bandas principales identificadas como alérgicas y antigénicas

Región seleccionada en SDS-PAGE (kDa)	Alérgeno tentativamente identificado	Peso molecular reportado (kDa)	Banda detectada (kDa)	Unión de IgE (%)	Unión de IgG4 (%)
15-23	Gly m 4	17	17	-	40,0
	Gly m TI	21	21	-	33,3
34-43	Gly m Bd 30K	34	34	76,6	100
	subunidad G1, G2 o G3 de Gly m6	53 52,4 52,2	53		
50-85	subunidad G5 de Gly m 6	55,4	56	46,6	73,3
	subunidad G4 de Gly m 6	61	61		
	subunidad α de Gly m 5	67	67		
	subunidad α´ de Gly m5	71	71		

Desempeño del método analítico

Según la GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del CECMED, la validación de los métodos analíticos desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

La precisión es una medida de cuán cerca están los resultados unos de otros o, mejor dicho, es el grado de concordancia de los valores de una serie repetida de ensayos analíticos, efectuados sobre una muestra homogénea. Es la distribución de los valores analíticos alrededor de su media y se expresa como el coeficiente de variación (CV%). Este parámetro se determina a tres niveles, siempre que proceda: intraensayo (repetibilidad), interensayo (precisión intermedia) e interlaboratorios (reproducibilidad) (GUIA No. 41-2013 del CECMED; Kurbanoglu et al., 2018). En este estudio se demostraron los dos primeros niveles con resultados satisfactorios.

La **repetibilidad** se lleva a cabo sobre la base de un número suficiente de determinaciones de una mezcla homogénea del producto, en las mismas condiciones, muestra, analista, laboratorio, equipos y reactivos; generalmente en un corto intervalo de tiempo, por lo cual evalúa la variabilidad intrínseca del proceso. Por

otro lado, la **precisión intermedia** es la medida de la precisión dentro de un laboratorio cuando se emplea una muestra homogénea y se analiza en condiciones diferentes, es decir analista diferente y día diferente (GUÍA No. 41-2013 del CECMED). El estudio de precisión de la técnica de SDS-PAGE para extractos de soya mostró una buena repetibilidad y reproducibilidad de los resultados, obteniéndose CV menores que 5%. Estos resultados cumplen no solo con los criterios de aceptación de la guía nacional del CECMED (GUÍA No. 41-2013), sino también con lo expresado en la guía internacional para la Validación de Métodos Analíticos ICH Q2 (R1).

Es importante también que el método analítico mantenga una imprecisión mucho menor que el rango de tolerancia establecido para los productos. Específicamente para la composición de proteínas de los productos alergénicos no se establecen rangos explícitos en los documentos regulatorios internacionales, quedando este aspecto a decisión de los fabricantes. No obstante, en la Monografía para Productos Alergénicos de la Farmacopea Europea (2010:1063), se establecen como rango para el ensayo de contenido de proteínas totales 80-120% y para el de componentes alergénicos individuales 50-150%. La precisión del SDS PAGE en este trabajo con las bandas seleccionadas (5%) resultan mucho menor que ambos intervalos, lo cual sostiene la idoneidad de este ensayo para el control de calidad.

La **Exactitud** es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. Para que la evaluación de la exactitud se considere satisfactoria, no existirán diferencias significativas entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores asignados. (GUÍA No. 41-2013 del CECMED). En este estudio se demostró la robustez del método de SDS-PAGE pues no hubo diferencias significativas entre los PM de las bandas principales determinadas experimentalmente con respecto los registrados en la literatura para cada uno de los componentes alergénicos.

La **Especificidad** es la habilidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes (GUÍA No. 41-2013 del CECMED) y que pueden causar interferencias. En el campo de la tecnología farmacéutica, el glicerol es un disolvente de extraordinario valor, capaz de formar disoluciones concentradas y permanentes, imposibles de obtener con otros vehículos. El mismo se ha utiliza ampliamente como excipiente para los extractos alergénicos para prick test y para la vía sublingual por sus cualidades como preservativo y estabilizante (Kyoung Yong Jeong, 2013). En este estudio el glicerol no ofreció interferencias en la determinación de las bandas en el extracto glicerinado con respecto a la RI liofilizada.

Numerosos términos han sido utilizados para definir el **límite de detección** (LD) por lo que este concepto ha sido uno de los más controversiales en química analítica. En general, se toma como LD la cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, como una concentración o cantidad exacta en las condiciones experimentales indicadas. El LD puede obtenerse de tres formas diferentes: a) inspección visual, es el mínimo nivel donde el analito es detectado; b) método de relación señal-ruido, basado en el ruido basal del instrumento y c) desviación estándar de la respuesta basada en la pendiente de la curva de calibración (GUÍA No. 41-2013 del CECMED; Kurbanoglu et al., 2018). En este estudio, teniendo en cuenta la forma de inspección visual y las características de la técnica que se está validando, se definió el LD como la menor concentración del extracto aplicada en que se detectan todas las bandas principales presentes en la muestra: 17 kDa (Gly m 4), 21 kDa (Gly m TI), 34 kDa (P34), 53 kDa (Gly m6), 56 kDa (Gly m 6), 61 kDa (Gly m 5), 67 kDa (Gly m 5) y 71 kDa (Gly m5). La banda de 56 kDa desapareció a la concentración de 0,25 µg, por lo que no fue seleccionada como LD de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos. Por tanto, el LD de la técnica fue 0.5 µg, ya que a dicha concentración se detectan todas las bandas principales presentes en la muestra. De ese modo, este LD hace posible aplicar la técnica no solo para un producto liofilizado (como la RI) sino también en el producto terminado glicerinado y en productos intermedios durante el proceso de fabricación.

En el presente trabajo se empleó una Referencia Interna del Extracto Alergénico de Soya en forma liofilizada. La Guía Europea para la producción y control de la calidad de productos alergénicos establecen la definición, importancia y caracterización de la Referencia Interna (RI) (Bonertz et al., 2018). Teniendo en consideración la complejidad de la producción de extractos alergénicos (EAs), resulta difícil lograr la estandarización de los mismos, ya que el producto generalmente es una mezcla de componentes con características alergénicas. Por tal motivo se hace necesario que cada productor establezca una RI para cada uno de sus EAs, siempre y cuando no se disponga de una Referencia Internacional reconocida. La RI será un lote típico completamente caracterizado, el cual servirá de base para la demostración de la

consistencia lote a lote, del proceso de producción. La validación de la técnica de SDS-PAGE empleando la RI aporta mayor valor a la caracterización de la RI y contribuye a robustecer el sistema de control de la calidad de este producto.

CONCLUSIONES

El estudio demostró que la técnica de SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas de extractos alergénicos de soya (seleccionando 8 bandas principales con actividad de unión de IgE e IgG4 en pacientes alérgicos cubano) cumple con los parámetros de precisión y exactitud. Asimismo, el método evidenció su especificidad en cuanto a la no interferencia del Glicerol, empleado como excipiente. El límite de detección para la RI liofilizada de soya fue de 0.5 µg/ml. De esta forma el método queda validado, cumpliendo con los requisitos nacionales e internacionales y demostrando su idoneidad para ser empleado para el control de calidad de este producto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Base de datos Allergen. (n.d.). Retrieved 2021, from <http://www.allergen.org>.
- Base de datos Allergome. (n.d.). Retrieved 2021, from <http://www.allergome.org>.
- Berneder M, Bublin M Hoffmann-Sommergruber K, Hawranek T, Lang R. (2013). Allergen Chip Diagnosis for Soy-Allergic Patients: Gly m 4 as a Marker for Severe Food-Allergic Reactions to Soy. *Int Arch Allergy Immunol*; 161:229–233.
- Bonertz A, Roberts G, Slater JE, Bridgewater J, Rabin RL, Hoefnagel M, Timon M, Pini C, Pfaar O, Sheikh A, Ryan D, Akdis C, Goldstein J, Poulsen LK, van Ree R, Rhyner C, Barber D, Palomares O, Pawankar R, Hamerlijnck D, Klimek L, Agache I, Angier E, Casale T, Fernandez-Rivas M, Halken S, Jutel M, Lau S, Pajno G, Sturm G, Varga EM, Gerth van Wijk R, Bonini S, Muraro A, Vieths S. (2018). Allergen manufacturing and quality aspects for allergen immunotherapy in Europe and the United States: An analysis from the EAACI AIT Guidelines Project. *Allergy*. Apr;73(4):816-826. doi: 10.1111/all.13357. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29150848.
- De la Cruz S, Gonzalez I, Garcia T, Martin R. (2018). Alergias alimentarias: Importancia del control de alergen en Alimentos Nutr. clin. diet. hosp.; 38(1):142-148.
- European Pharmacopoeia Monograph on Allergen Products (2010:1063)
- Figuerola I, Estruch ILM, Labrada A, León M. (2012). Evaluación de la eficacia de un extracto alergénico de soya para el diagnóstico de hipersensibilidad inmediata. *Revista Alergia México*; 59(2):47-55.
- GUIA No. 41-2013 “Validación de Métodos Analíticos” del Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).
- Jeong Kwang-Ho, Choi1 Man-Soo, Lee Seuk-Ki, Seo1 Min-Jung, Hwang Tae-Young, Yun Hong-Tai, Kim Hong-Sig, Kim Jung-Tae, Kwon Young-Up, Kim Yul-Ho. (2013). Development of Low Gly m Bd 30K (P34) Allergen Breeding Lines Using Molecular Marker in Soybean [Glycine max (L.) Merr.] *Plant Breed. Biotech.* (September) 1(3):298~306.
- Kendrick N., Darie C.C., Hoelter M., Powers G., Johansen J. (2019) 2D SDS PAGE in Combination with Western Blotting and Mass Spectrometry Is a Robust Method for Protein Analysis with Many Applications. In: Woods A., Darie C. (eds) *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1140. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15950-4_33
- Kurbanoglu, Bengi Uslu, Sibel A. Ozkan. (2018). Food Safety and Preservation Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health Book. Chapter 4: Validation of Analytical Methods for the Assessment of Hazards in Food Sevinc; 59-90.
- Larsen JN y Dreborg S. (2020). Standardization of Allergen Extracts. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 01Jan2019, 2020:63-76 DOI: 10.1007/978-1-4939-9591-2_5 PMID: 31177492.
- Mateo M, Labrada A, Torralba D, Cruz R, Oliva Y, Álvarez M, Ciria A, Jiménez M, Reyes MC, Castro RL, Tamargo B. (2017). Is peanut causing food allergy in Cuba? Preliminary assessment of allergic sensitization and IgE specificity profile to peanut allergens in Cuban allergic patients *World Allergy Organization Journal* 10:26, DOI 10.1186/s40413-017-0156-1. PubMed, PMC.

- Mateo M. (2014). Caracterización de la respuesta inmuno-alérgica a alimentos comunes, en pacientes cubanos. Tesis en opción al título académico de Máster en Ciencia y Tecnología de los Procesos Biotecnológicos. La Habana: Universidad de la Habana Instituto de farmacia y alimentos.
- McGowan Emily C; Platts-Mills Thomas A.E, Wilson Jeffrey M. (2019). Food allergy, eosinophilic esophagitis, and the enigma of IgG4. *Ann Allergy Asthma Immunol* 122 563e564.
- Molina-Sáenz, Mónica María; Villa-Arango, Ana María; Cardona-Villa, Ricardo (2017). Seguridad de la inmunoterapia subcutánea con extractos tirosinados de ácaros de polvo doméstico en pacientes con enfermedad alérgica. *Revista alergia México*, vol. 64, núm. 1, Enero-Marzo, pp. 52-65.
- Murakami, H., Ogawa, T., Takafuta, A., Yano, E., Zaima, N., & Moriyama, T. (2018). Identification of the 7S and 11S globulins as percutaneously sensitizing soybean allergens as demonstrated through epidermal application of crude soybean extract. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 82(8), 1408-1416.
- Natarajan, S., Khan, F., Song, Q., Lakshman, S., Cregan, P., Scott, R., ... & Garrett, W. (2016). Characterization of soybean storage and allergen proteins affected by environmental and genetic factors. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(6), 1433-1445.
- Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Guidance for Industry Guidance for Industry September 2021.
- Pi, X., Sun, Y., Fu, G., Wu, Z., & Cheng, J. (2021). Effect of processing on soybean allergens and their allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*.
- Reyes-Pavón D, Jiménez M, Salinas E. (2020). Fisiopatología de la alergia alimentaria. *Rev Alerg Mex*; 67(1):34-53.
- San Miguel A, Martín B, Martín S, Pachon J, Pastor R, Rodríguez E, Cabrero P. (2017). Propiedades y reacciones alérgicas al aceite de soja. Su importancia en la salud y la nutrición. *Revista Virtual Pro* ISSN 19006241.

Este artículo no presenta conflicto de intereses

ROLES DE AUTORÍA

Wendy Ramírez González. Conceptualización, Análisis formal, Investigación, Metodología, Recursos, Supervisión, Validación, Visualización Redacción del borrador original, Revisión y edición de escritura.

Mayteé Mateo Morejón. Data curación, Análisis formal, Investigación, Metodología,

Raysa Cruz Jiménez. Análisis formal, Investigación.

Anette García Freijó. Data curación, Análisis formal, Redacción del borrador original.

Alexis Labrada Rosado. Conceptualización, Análisis formal, Adquisición de fondos, Administración de proyectos, Recursos, Supervisión, Redacción del borrador original, Revisión y edición de escritura.