

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

Especialidad en Conservación y Procesamiento de Productos Marinos

**Identificación de la arginina cinasa como proteína alergénica en
la jaiba café (*Callinectes bellicosus*)**

TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Haydeé Alejandra Brassea Estardante

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

**Identificación de la arginina cinasa como proteína alergénica en la jaiba
café (*Callinectes bellicosus*)**

Haydeé Alejandra Brassea Estardante



Dr. Alonso Alexis López Zavala

Director de la tesis




Dra. Oliviert Martínez Cruz

Co-Directora de tesis



Dr. José Luis Cárdenas López

Secretario



Dra. Karina Dalila García Orozco

Sinodal

Hermosillo, Sonora

Enero de 2021

Hermosillo, Sonora a 25 de Enero de 2021.

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 la arginina cinasa como proteína alergénica en la jaiba café (*Callinectes bellicosus*)", en los sucesivo LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestro en Ciencias, 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


LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA



Haydeé Alejandra Brassea Estardante

RESUMEN

En los últimos años se ha registrado un aumento en la prevalencia de reacciones alérgicas ante el contacto o consumo de crustáceos, ocasionando la activación de respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos IgE. La arginina cinasa (AK) es una enzima que participa en el metabolismo energético anaerobio de invertebrados a través de la síntesis fosfágenos como reserva de energía. Asimismo, es considerada como uno de los principales alérgenos presentes en invertebrados. Actualmente, no se ha estudiado el potencial alergénico de la jaiba café (*Callinectes bellicosus*), el cual es un crustáceo de gran importancia económica en nuestro Estado. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es identificar a la arginina cinasa como uno de los principales alérgenos presentes en la jaiba café y sus epítomos de unión a IgE mediante un análisis bioinformático. Para ello, se purificó la AK a partir del músculo mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio a un 90% de saturación y por cromatografía de intercambio iónico, encontrando una banda única de peso molecular de ~40 kDa mediante SDS-PAGE, la cual fue identificada por espectrometría de masas como AK. La alergenicidad de la AK fue evaluada “*in vitro*” mediante western blot en condiciones nativas y desnaturizantes por inmunodetección con IgE, utilizando sueros de pacientes alérgicos a la jaiba y/o crustáceos. El 70 % de los sueros evaluados presentaron reacción a la proteína nativa, mientras que un 80 % mostró detección con la proteína en condiciones desnaturizantes. Por otro lado, se obtuvo la secuencia nucleotídica de 1,075 pb que codifican para 357 aminoácidos correspondientes a la AK, la cual tiene >90% de identidad con otras secuencias de AKs. A partir de la secuencia de aminoácidos se hizo un análisis bioinformático utilizando el programa BepiPred 1.0 y Secret-AAR, encontrando así ocho posibles epítomos de unión a IgE, los cuales presentan similitud con otros epítomos reportados en crustáceos. Este es el primer estudio en donde se logró identificar a la AK como una de las proteínas alérgicas presentes en la jaiba café.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	12
Importancia de la producción de crustáceos.....	12
Producción de jaiba en México.....	12
Generalidades de la jaiba.....	16
Reacciones alérgicas por consumo de alimentos.....	18
Respuesta del sistema inmunológico.....	21
Características de proteínas alergénicas.....	24
Alérgenos en crustáceos.....	26
Arginina cinasa: Estructura y función.....	29
Arginina cinasa en reacciones alérgicas.....	33
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Evaluación de la arginina cinasa como alérgeno.....	37
Obtención de sueros.....	37
Recolección de jaiba y purificación de la AK.....	39
Cuantificación de proteína y electroforesis SDS-PAGE y nativa.....	40
Identificación de la arginina cinasa por LC-MS.....	40
Evaluación in vitro de la AK de la jaiba café por inmunotransferencia (<i>Western blot</i>).....	41
Predicción de epítomos de unión a IgE de la arginina cinasa de la jaiba café	42
Diseño de oligonucleótidos.....	42
Extracción del ARN total de <i>C. bellicosus</i>	44

Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN total.....	44
Digestión del ADN genómico presente en muestras de ARN total y síntesis del ADN complementario.....	45
Obtención de la secuencia nucleotídica de la arginina cinasa.....	45
Predicción de los epítomos de unión de IgE de la arginina cinasa.....	46
Modelo estructural de la arginina cinasas y sus regiones alergénicas....	47
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	48
Purificación e identificación de la AK.....	48
Inmunodetección de la AK de la jaiba café por western blot.....	52
Secuencia nucleotídica de la arginina cinasa.....	57
Obtención de la secuencia nucleotídica de la AK.....	57
Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la arginina cinasa.....	59
Estructura tridimensional de la AK de <i>C. bellicosus</i>	63
Análisis bioinformático de los epítomos de unión a IgE de la arginina cinasa	67
CONCLUSIONES.....	74
RECOMENDACIONES.....	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXO 1.....	87
ANEXO 2.....	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Producción de jaiba en México (2013-2017).....	14
2	Participación porcentual de la producción de jaiba en las principales entidades.....	15
3	Distribución geográfica de <i>Callinectes spp.</i> en el océano Pacífico	17
4	Fases de la respuesta inmune mediada por IgE.....	23
5	Tipos de epítomos de células B.....	25
6	Complejo binario de la estructura cristalina de la AK de <i>L. vannamei</i> con arginina.....	32
7	Cromatografía de intercambio iónico las fracciones proteicas del músculo de la jaiba café.....	49
8	Electroforesis SDS-PAGE de fracciones obtenidas por CII.....	50
9	Identificación y cobertura de la AK de <i>C. bellicosus</i> con la AK de <i>C. sapidus</i>	51
10	Inmunodetección de la AK en condiciones desnaturalizantes.....	55
11	Inmunodetección de la AK en condiciones nativas.....	56
12	Obtención de la secuencia nucleotídica de la AK de la jaiba café.	58
13	Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de la AK de <i>C. bellicosus</i>	60
14	Alineamiento secuencia nucleotídica de la AK de <i>C. bellicosus</i> contra la AK de <i>C. sapidus</i>	61
15	Alineamiento secuencia nucleotídica de la AK de <i>C. bellicosus</i> contra especies de crustáceos.....	62
16	Alineamiento secuencia de aminoácidos de la AK de <i>C. bellicosus</i> contra la AK de <i>C. sapidus</i>	65
17	Modelo estructural tridimensional teórico de la AK.....	66

18	Predicción computacional de epítomos lineales de la AK de <i>C. bellicosus</i>	70
19	Comparación y alineamiento de los epítomos lineales predichos de la AK de <i>C. bellicosus</i> contra las de otras especies de crustáceos.....	71
20	Predicción computacional de epítomos conformacionales de la AK de <i>C. bellicosus</i>	72
21	Comparación y alineamiento de los epítomos conformacionales predichos de la AK de <i>C. bellicosus</i> contra las de otras especies de crustáceos.....	73

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
1	Sintomatología de reacciones alérgicas a alimentos.....	20
2	Proteínas alérgicas identificadas en mariscos.....	28
3	Estudios sobre la caracterización de la arginina cinasa en diferentes organismos.....	31
4	Sitios de unión a IgE con arginina cinasa en crustáceos.....	34
5	Características de los sueros de los sujetos alérgicos y no alérgicos.....	38
6	Características de los oligonucleótidos diseñados para la AK de <i>C. bellicosus</i>	43

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de alimentos marinos ha presentado una alta demanda a nivel mundial, ya que son parte importante de la dieta humana por su gran aporte nutricional. Sin embargo, la hipersensibilidad a mariscos se ha convertido en una de las reacciones anafilácticas de mayor prevalencia en varios países, en donde se activan respuestas inmunológicas mediadas por anticuerpos IgE, inducidas principalmente por el consumo o contacto con crustáceos (Sicherer y col., 2004; Múniera y col., 2013).

En México las especies más importantes de jaiba que se capturan son *Callinectes toxotes*, *Callinectes arcuatus* y *Callinectes bellicosus*, siendo ésta última la más comercializada a nivel nacional e internacional y por lo tanto de mayor consumo (Cisneros y col., 2014; Ramírez-Félix y col., 2015). Las reacciones alérgicas hacia crustáceos han ido en aumento, por lo que varias investigaciones se han dirigido a la identificación de las proteínas responsables de causar dicha reacción inmunológica. Entre las proteínas alergénicas se destacan la tropomiosina, como el mayor alérgeno presente en invertebrados, la miosina y proteínas sarcoplasmáticas unidas al calcio (Daul y col., 1994; Shiomi y col., 2008; Rahman y col. 2010). De manera similar, se ha identificado a la arginina cinasa (AK) como alérgeno de camarón y de otras especies de cangrejos (García-Orozco y col., 2007; Mao y col., 2013). La arginina cinasa es una enzima que se encarga de catalizar la transferencia reversible de un grupo fosfato de alta energía de la fosfoarginina al ATP, para la regeneración de energía durante el aumento de actividad celular y se encuentra abundantemente en el músculo de diversas especies de invertebrados (Morrison y James, 1965; Yazawa, 1988). En estudios recientes, se ha logrado predecir e identificar experimentalmente epítomos lineares y conformacionales de la AK en el cangrejo de los manglares, *Scylla paramamosain* y el cangrejo de río, *Procambarus clarkii*, con el empleo de diferentes técnicas inmunológicas y bioinformáticas (Chen y col., 2013; Yang y col., 2015).

Actualmente, no se ha estudiado el potencial alergénico de la jaiba café, por lo que se desconocen las proteínas encargadas de provocar reacciones alérgicas a su consumo. Por ello, el presente trabajo se centra en identificar a la arginina cinasa como una de las principales proteínas alergénicas presentes en la jaiba café y sus posibles epítomos de unión con IgE.

ANTECEDENTES

Importancia de la producción de crustáceos en México

Los crustáceos son decápodos que se caracterizan por tener el cuerpo segmentado y poseer numerosos apéndices articulados, estos habitan en zonas marinas y costeras, y son uno de los principales animales marinos de mayor importancia económica a nivel mundial (Flores-Campaña y col., 2003; Arzola-González y col., 2010; Vinuesa y col., 2015). También participan como reguladores ecológicos, siendo parte fundamental de la alimentación de diversas especies de peces y de otros animales de gran interés comercial (Cognetti y col., 2001; Santamaría-Miranda y col., 2006). Asimismo, se consideran parte fundamental de la dieta humana, por contener una gran cantidad de proteínas, ácidos grasos, vitaminas y minerales (Zikorski y col., 1990).

La República Mexicana posee 11, 592.77 km de litoral, en donde 8, 475.06 km pertenecen al litoral del Pacífico, la cual es una zona que ofrece una gran diversidad de hábitats para el desarrollo de distintas especies marinas (DOF, 2006). En México se captura principalmente camarón, jaiba, langosta y langostino, siendo el primero con mayor valor económico, aportando alrededor de 17 mil 707 millones de pesos, seguido por la jaiba, generando 753.5 millones de pesos al año. El Estado de Sonora se ubica como uno de los estados más importantes que cultivan y capturan crustáceos en el país (CONAPESCA, 2017).

Producción de jaiba en México

La jaiba ha tenido gran aceptación por comerciantes por su alta calidad de distribución, ya que pueden exportarse enteras o desmenuzadas, a granel o en latas puesto que toda la captura en el país va directamente al consumo humano. En 2017, se reportó una captura de 48, 602 toneladas en donde la jaiba se encontró en la posición 9, tanto

en producción como venta pesquera en México, siendo Sinaloa, Sonora y Campeche los más grandes productores de jaiba, aportando un 74 % del volumen total (Figura 1 y 2; CONAPESCA, 2017). Alrededor del 95 % de la captura comercial del Estado de Sonora es aportada por la jaiba café y la jaiba azul el 5 % restante. Se comercializa principalmente a las ciudades de Ciudad de México, Monterrey y Guadalajara e internacionalmente a Japón, Corea y Estados Unidos, en donde alrededor del 22 % de la captura total es exportada a este último país (Ramírez-Félix y col., 2003; CONAPESCA, 2014; López-Martínez y col., 2014).

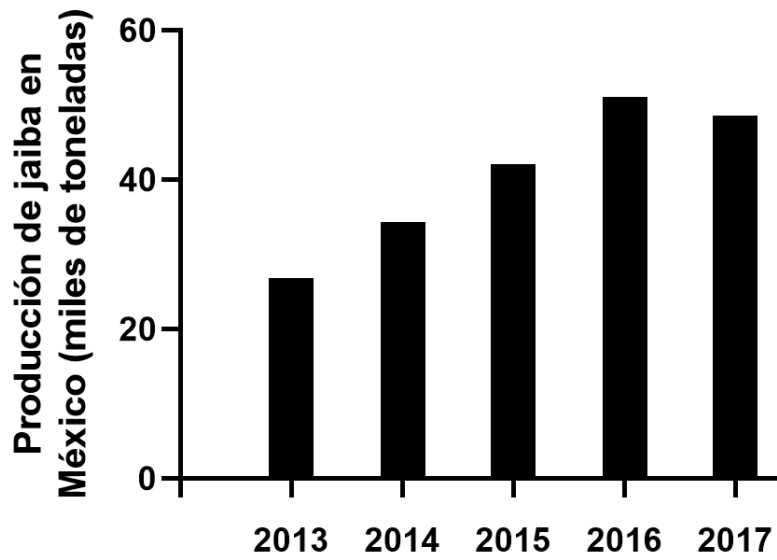


Figura 1. Producción de jaiba en México (2013-2017). Base de datos de CONAPESCA.

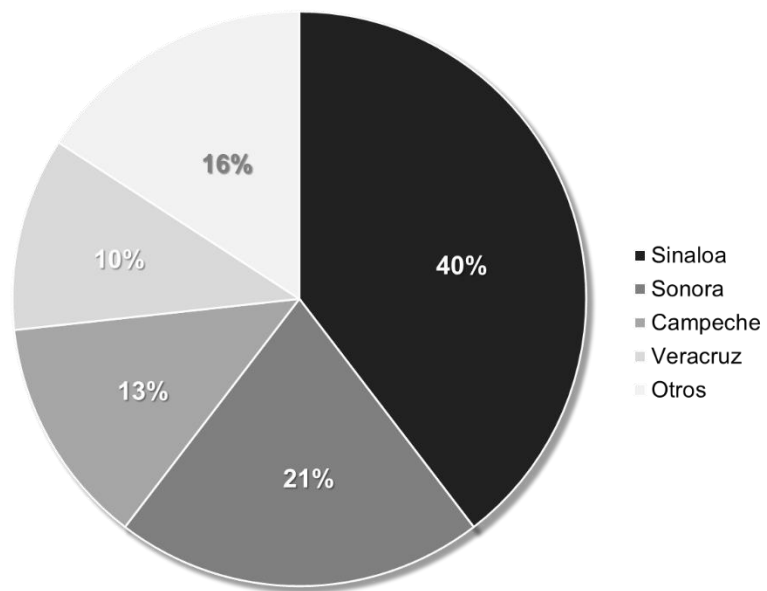


Figura 2. Participación porcentual de la producción de jaiba en las principales entidades. Base de datos de CONAPESCA.

Generalidades de la jaiba

Las jaibas, también conocidas como cangrejos nadadores, son crustáceos que pertenecen al género *Callinectes* de la familia *Portunidae*, habitan en la zona de ribera marina y lagunas costeras durante la fase adulta. Las especies *C. bellicosus* (jaiba café) y *C. arcuatus* (jaiba azul) se encuentran distribuidas en el Océano Pacífico, desde el sur de California, Estados Unidos hasta el Golfo de Tehuantepec y Perú, respectivamente; por otro lado, *C. toxotes* (jaiba negra) cubre la región del sur del Golfo de California hasta Colombia (Figura 3; Cisneros y col., 2014). Estas especies son un componente base en las principales pesquerías comerciales de varios países, siendo de igual manera un recurso pesquero marino aprovechado en la mayoría de las costas mexicanas. Su captura es habitualmente de tipo artesanal, utilizando artes de pesca sencillos y de bajo costo (Escamilla-Montes y col., 1998).

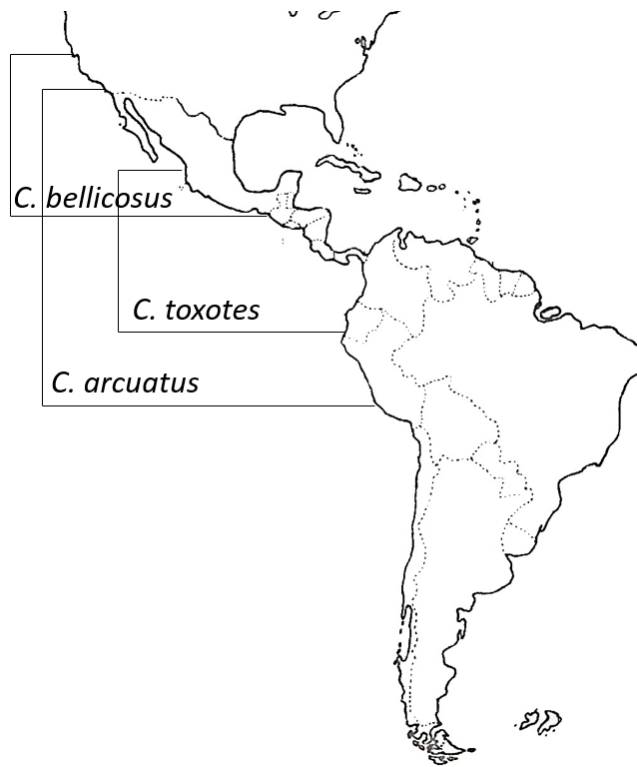


Figura 3. Distribución geográfica de *Callinectes spp.* en el océano Pacífico. Imagen modificada de Cisneros y col. (2014).

Reacciones alérgicas por consumo de alimentos

Se define como alergia alimentaria a la respuesta anormal del sistema inmunológico ante la presencia de un antígeno específico, posterior al contacto, ingesta o inhalación de un alimento determinado (Medina-Hernández y col., 2015; Sánchez y col., 2018). En los últimos años, los casos por alergias alimentarias han ido en aumento, convirtiéndose en un importante problema de salud (Matricardi, 2014). Se ha reportado que alrededor de mil millones de personas presentan algún tipo de reacción alérgica en el mundo y se cree que esta cifra podría aumentar hasta cuatro mil millones de personas en el año 2050 (Asher y col., 2006; Matricardi, 2014).

No existen datos precisos sobre la incidencia de alergias hacia alimentos, ya que estos varían según su definición, población, métodos de diagnóstico, geografía, edad, dieta, entre otros factores. Sin embargo, este tipo de reacciones es frecuente en niños durante sus primeros años de vida, perjudicando al 6 % de niños menores de 3 años y un 2 % de la población adulta (Macías-Iglesias, 2018). Se tienen identificados más de 170 alimentos que pueden llegar a causar una reacción alérgica, entre los más frecuentes se destacan la leche, el huevo, el pescado, la soya, los frutos secos, el trigo, los crustáceos y moluscos (Medina-Hernández y col., 2015).

Los mariscos (crustáceos y moluscos) son responsables del 2.8-8 % de los casos de reacciones alérgicas por alimentos afectando mayormente a adultos (Macías-Iglesias, 2018). Las reacciones hacia este tipo de alérgenos suelen aparecer como consecuencia de la ingesta, inhalación de vapores o contacto con el alimento. Normalmente este tipo de alergias son persistentes, frecuentemente causan reacciones de anafilaxia y existe un 75 % de posibilidad que las personas que son alérgicas a un crustáceo puedan a reaccionar a otras especies de crustáceos (Macías-Iglesias, 2018). Asimismo, se han descrito casos donde una persona alérgica a mariscos puede presentar también alergia a los pescados, esto se debe a una co-sensibilización (Macías-Iglesias, 2018).

Las manifestaciones clínicas de alergias a mariscos son similares a otras alergias alimentarias (Tabla 1). Los síntomas generalmente aparecen durante o posterior a las dos horas de exposición, aunque se ha reportado reacciones tardías de hasta ocho horas después de la ingesta (Lopata y col., 1997). Las afecciones respiratorias y orales se presentan con mayor incidencia que en otras alergias alimentarias, ocasionando que el individuo presente un cuadro clínico desfavorable (Matricardi y col., 2016). A diferencia de otros alimentos, la alergia a mariscos persiste de por vida hasta en un 90 % de los casos (Ruethers y col., 2018). La prevalencia de alergia a crustáceos es más alta que la provocada por moluscos, de acuerdo a datos obtenidos en un estudio realizado en Italia, donde el 10.3 % de los adultos italianos presentan afección alérgica a estos alimentos, siendo el langostino y el cangrejo los principales en causar anafilaxia, tanto en niños como en adultos (Burney y col., 2010; Moonesinghe y col., 2016). El consumo de cangrejos es común en la dieta de muchas poblaciones en todo el mundo, encontrándose entre los crustáceos más populares (FAO, 2010). Sin embargo, el consumo de cangrejo es una de las ocho fuentes principales de alérgenos alimentarios propuestos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Son frecuentes los informes sobre las reacciones alérgicas inducidas por la ingesta de estos crustáceos, especialmente en áreas costeras donde los mariscos son comunes en la dieta (Liang y col., 2008). Se han reportado en varios países asiáticos una prevalencia en las reacciones inmunitarias hacia crustáceos. En Taipei, Taiwán el cangrejo es el alérgeno alimentario más común entre infantes con una prevalencia del 88 % (Wan y col., 2010). Mientras que, en Singapur, la alergia al cangrejo afecta hasta al 16.2 % de los adultos (Thong y col., 2007).

Tabla 1. Sintomatología de reacciones alérgicas a alimentos.

Sistema	Síntoma
Cutáneos	Urticaria
	Dermatitis atópica
	Angioedema
Digestivos	Dolor abdominal
	Dificultad para deglutir
	Diarrea
	Vómito
	Comezón en la faringe
	Síndrome de alergia oral
Respiratorios	Rinitis
	Tos
	Disfonía
	Asma
Generales	Paro respiratorio (Anafilaxis)
	Hipotensión

Fuente: Macías-Iglesias (2018).

Respuesta del sistema inmunológico

El sistema inmunológico de algunos sujetos, en situaciones normales tolera bien los alimentos, pero existen situaciones en las que reacciona de manera patológica al verse afectado por la presencia de antígenos que son obtenidos durante la ingesta de alimentos, dando origen a una alergia alimentaria (Macías-Iglesias, 2018). Existen algunos factores que podrían ocasionar este tipo de afecciones como, por ejemplo, condiciones ambientales, alteraciones en el tracto gastrointestinal, polimorfismos genéticos, dosis, tipo y vía de administración del alérgeno o la edad de la persona (Macías-Iglesias, 2018). Las reacciones alérgicas por alimentos son similares a otras respuestas inmunitarias, necesitan de un estímulo antigénico para generar una respuesta (Macías-Iglesias, 2018). Son respuestas moderadas por procesos inmunológicos, los cuales se pueden clasificar en función al mecanismo que se encuentre implicado durante la afección: 1) respuesta mediada por inmunoglobulinas E (IgE), dando lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo I (urticaria, síndrome de alergia oral, vómito, diarrea, etc.), 2) respuesta no mediada por IgE (enterocolitis, enfermedad celíaca y dermatitis) y 3) mixta, en donde participan ambas respuestas (gastroenteritis eosinofílica alérgica, asma alérgica) (Sampson, 1999; Macías-Iglesias, 2018).

En el desarrollo de una respuesta inmunitaria ante una alergia alimentaria mediada por IgE, se sigue una serie de pasos, en donde el individuo genera sensibilización al ser expuesto a una cierta cantidad del compuesto alergénico, induciendo una respuesta de anticuerpos IgE (Figura 4):

1. Fase de sensibilización: comienza cuando se capta la presencia del antígeno y los linfocitos T CD4 + (LT) vírgenes son presentados por células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (LB) que utilizan citocinas (IL-4 e IL-13). Los LT vírgenes se convierten en linfocitos Th2, ayudando a que los LB se transformen en células plasmáticas, para la

producción de IgE específicas al antígeno. Durante esta fase no se muestran síntomas.

2. Fase efectora: si existe una exposición frecuente al antígeno, se estimula la que las inmunoglobulinas E se unan a los receptores de basófilos y mastocitos, originando que se activen y liberen compuestos inflamatorios (histamina, leucotrienos, etc.) los cuales funcionan como mediadores durante la respuesta inmunológica. Una vez dada esta reacción, aparecen síntomas a nivel piel y mucosas. Esta fase inicia al poco tiempo de que se da la exposición con el antígeno y puede presentar una fase tardía a las 2-24 h de haber estado en contacto.
3. Fase crónica: se debe a la continua repetición de las fases tardías (McFarlane, 2000; Abbas y Lichtman, 2003).

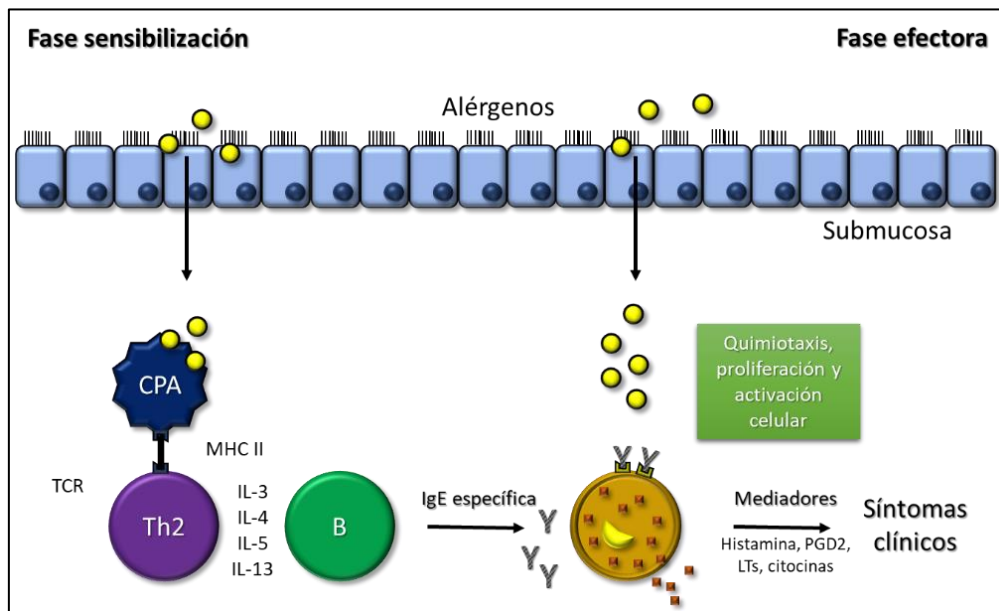


Figura 4. Fases de la respuesta inmune mediada por IgE. Imagen modificada de Macías-Iglesias (2018).

Características de proteínas alergénicas

Los aspectos de la estructura de la proteína que pueden ser relevantes para la alergenicidad son la solubilidad, la estabilidad, el tamaño y lo compacto que se encuentre su estructura (Thomas y col., 2005). Estos aspectos reflejan la dependencia de la alergenicidad en el transporte sobre las barreras mucosas y la susceptibilidad a las proteasas (Thomas y col., 2005). La proteólisis parcial los alérgenos favorece el transporte de la mucosa y por lo tanto aumenta el potencial alergénico (Thomas y col., 2005). Sin embargo, esta modificación postraduccional también puede afectar al alérgeno de diferentes maneras, como formar nuevos epítomos o inhibiendo su potencial alergénico (Thomas y col., 2005).

También la participación de anticuerpos IgE específicos han sido de gran importancia en la evaluación de los alérgenos alimentarios. Gracias a los recientes avances tecnológicos en biología molecular, se han identificado en varias especies los compuestos responsables de causar una respuesta inmunitaria, elucidar sus estructuras moleculares y los epítomos de unión a IgE, los cuales son considerados como un buen indicador en la identificación de pacientes con alergia a alimentos, predecir la gravedad clínica y el desarrollo de tolerancia (Lin y Sampson, 2009; Matsuo y col., 2015).

Los epítomos de unión a IgE pueden dividirse en dos tipos: lineales y conformacionales. Los epítomos lineales comprenden secuencias continuas de aminoácidos, mientras que los conformacionales están formados por aminoácidos espacialmente adyacentes ubicados de forma distante en la estructura primaria de las proteínas (Figura 5; Matsuo y col., 2015).

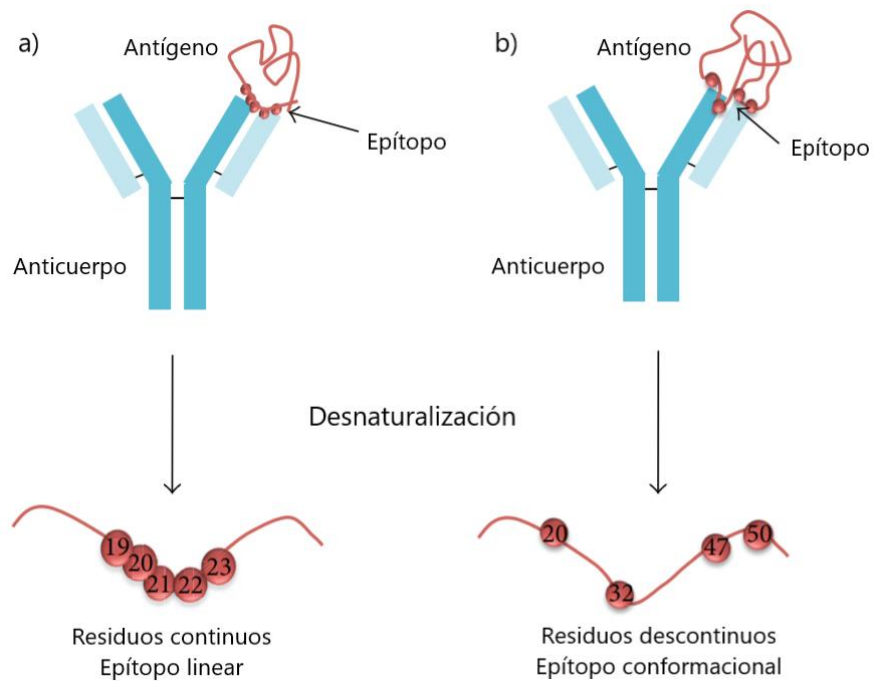


Figura 5. Tipos de epítipos de células B. Los epítipos lineales (a) están compuestos por residuos de aminoácidos continuos, mientras que los epítipos conformacionales (b) presentan residuos no continuos a lo largo de la secuencia. Imagen modificada de Sanchez-Trincado y col. (2017).

Alérgenos en crustáceos

El camarón es uno de los principales alimentos causante de alergias, por lo que ha sido una de las especies de crustáceos más estudiadas en el desarrollo de estrategias para contrarrestar la respuesta alérgica (Ruethers y col., 2018). Sin embargo, el consumo de otras especies como cangrejos y jaibas también se han relacionado con el desarrollo de alergias (Ruethers y col., 2018). Los alérgenos en crustáceos son proteínas que se localizan principalmente en tejido muscular, el cefalotórax o las huevas (Ruethers y col., 2018). Estos compuestos se caracterizan por presentar alta solubilidad en agua, elevada estabilidad térmica y un punto isoeléctrico ligeramente ácido (Lopata y col., 2016; Ruethers y col., 2018).

En las últimas dos décadas se han identificado varios alérgenos en crustáceos como el camarón tigre grande, *Penaeus monodon*, el camarón o gamba gris, *Crangon crangon* y cangrejos como el cangrejo del río, *Procambarus clarkii*, el cangrejo de las nieves, *Chionoecetes opilio*, especies de *Scylla* y el cangrejo azul, *Portunus pelagicus* (Tabla 2; García-Orozco y col., 2007; Shiomi y col., 2008; Rahman y col., 2010; Rosmilah y col., 2012; Chen y col., 2013). Esto ha sido posible en gran medida por el desarrollo de la proteómica y transcriptómica apoyado por herramientas de secuenciación masiva permitiendo obtener de un gran número de secuencias de proteínas en tiempos relativamente cortos y cada vez con un menor costo (Fu y col., 2018). Además, las técnicas tradicionales de caracterización de alérgenos y el desarrollo de nuevas estrategias como la bioinformática han favorecido la identificación de epítomos alérgicos (Fu y col., 2018).

Entre las proteínas alérgicas identificadas en estos organismos se destacan la tropomiosina, arginina cinasa, triosa fosfato isomerasa, miosina, entre otras, en las cuales se ha encontrado que sus funciones están asociadas con el movimiento muscular y el metabolismo energético (Ruethers y col., 2018). La tropomiosina, es conocida como uno de los alérgenos más importantes y de mayor prevalencia en invertebrados marinos (Shiomi y col., 2008; Rahman y col., 2010). De manera similar,

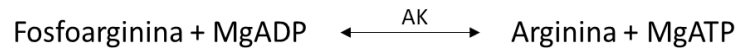
se ha reportado a la arginina cinasa como alérgeno del camarón y de otras especies de cangrejos (García-Orozco y col., 2007; Mao y col., 2013). Ambas proteínas son capaces de desencadenar reacciones cruzadas y potenciar la respuesta alérgica (Giuffrida y col., 2014; Pascal y col., 2015). Se ha estimado que existe una probabilidad del 10 al 51 % de que individuos alérgicos presenten reacción cruzada entre la tropomiosina y la AK de diversas especies de crustáceos (Ayuso y col., 2010).

Tabla 2. Proteínas alergénicas identificadas en crustáceos.

Crustáceo	Alérgeno	Autor(es)
Cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>)	Proteína sarcoplasmática de unión a calcio (PSC)	Chen y col. (2013)
Cangrejo de manglares o barro (<i>Scylla spp.</i>)	Arginina cinasa	Mao y col. (2013), Shen y col. (2011)
Cangrejo o jaiba azul (<i>Portunus pelagicus</i>)	Tropomiosina y arginina cinasa	Rosmilah y col. (2012)
Camarón o gamba gris (<i>Crangon crangon</i>)	Arginina cinasa, troponina C, tropomiosina miosina de cadena ligera, triosa fosfato isomerasa, PSC	Bauermeister y col. (2011)
Cangrejo de las nieves (<i>Chionoecetes opilio</i>)	Arginina cinasa	Rahman y col. (2011)
Langostino tigre (<i>Penaeus monodon</i>)	Miosina de cadena ligera, arginina cinasa, tropomiosina y PSC	Rahman y col. (2010), Shiomi y col. (2008)
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Arginina cinasa	García-Orozco y col. (2007)
Cangrejo rojo (<i>Charybdis feriatatus</i>)	Tropomiosina	Leung y col. (1998)
Camarón café (<i>Penaeus aztecus</i>)	Tropomiosina	Daul y col. (1994)

Arginina cinasa: Estructura y función

La arginina cinasa (E.C. 2.7.3.3) tiene como función principal catalizar la transferencia reversible de un fosfato de alta energía de la fosfoarginina a una molécula de ADP para formar ATP:



Para evitar la hidrólisis de ATP, las cinasas son capaces de proteger sus sitios activos de medios acuosos, a partir de un ajuste inducido (Jencks, 1975). Este proceso implica el cierre de un dominio sobre otro cuando se une al sustrato. Este cierre de dominio también elimina los sustratos y evita el escape de los intermediarios de la reacción (Koshland, 1958, 1994; Anderson y col., 1979; Knowles, 1991). Se considera que la enzima se encuentra libre al estar en una conformación abierta y se cierra al unirse el sustrato.

En el músculo, la AK funciona como un amortiguador temporal de ATP durante las transiciones de descanso al trabajo y también puede servir para aminorar la concentración espacial de ATP durante la actividad contráctil sostenida (Ellington, 2001). Además, se encuentra involucrada en procesos biológicos que demandan grandes cantidades de energía, como la contracción muscular, el movimiento flagelar y transporte de iones (Bessman y Carpenter, 1985; Wallimann y col., 1992).

La arginina cinasa ha sido estudiada ampliamente en invertebrados donde las investigaciones han sido dirigidas en aislar a la enzima, determinar sus condiciones de trabajo y caracterizarla tanto molecular como bioquímicamente, con el fin de comprender su función en el metabolismo energético. La AK posee alrededor de 356 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 38–45 kDa, un punto isoeléctrico (pI) aproximadamente de 6 y un pH óptimo de 8.2 y 6.9 durante la síntesis de fosfoarginina y ATP, respectivamente (Storey, 1977; Jarilla y col., 2014). Esta enzima se ha aislado y purificado en varios insectos y organismos marinos como el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, donde purificaron y evaluaron la actividad

enzimática de la AK (Tabla 3; García-Orozco y col., 2007). En 2013, López-Zavala y col. aislaron a la AK y obtuvieron dos estructuras cristalinas en este mismo organismo, una en un complejo binario de la enzima AK con arginina y otra en un complejo análogo de estado de transición ternaria (Figura 6; López-Zavala y col., 2013). En los reportes sobre la obtención de las constantes de Michaelis-Menten, se encontró que en la cucaracha americana (*Periplaneta americana*) y el camarón blanco del Pacífico, la AK tiene mayor afinidad por el sustrato ATP, mientras que, en el calamar, *Symplectoteuthis oualaniensis*, es favorable la reacción reversible de la enzima en la síntesis de ATP, al tener mayor afinidad al ADP (Storey, 1977; Brown y col., 2004; Hernández-Flores, 2014).

Tabla 3. Estudios sobre la caracterización de la arginina cinasa en diferentes organismos.

Organismo	Aportación(es)	Autor(es)
Camarón de río oriental (<i>Macrobrachium nipponense</i>)	Aumento en la expresión de la AK durante el estrés oxidativo ocasionado por altas concentraciones salinas	Huang y col. (2020)
Pulga de agua (<i>Daphnia magna</i>)	Participación de Hys284 en la actividad catalítica de la AK	Rao y col. (2020)
Cangrejo de manglares o barro (<i>Scylla paramamosain</i>)	Purificación y obtención de la estructura cristalina de la AK	Yang y col. (2019)
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Purificación, ensayos de actividad enzimática y determinación de constantes cinéticas	Hernández-Flores (2014).
Cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>)	Purificación y caracterización fisicoquímica e inmunológica de la AK	Chen y col. (2013)
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Obtención de dos estructuras cristalinas de la AK	López-Zavala y col. (2013)
Pulpo oriental (<i>Octopus fangsiao</i>)	Purificación de la AK y se analizaron sus características moleculares, inmunológicas y fisicoquímicas	Shen y col. (2012)
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Purificación, ensayos de actividad enzimática e inmunoreactividad a IgE	García-Orozco y col. (2007)
Langosta migratoria (<i>Locusta migratoria manilensis</i>)	Clonación y expresión de la AK en <i>Escherichia coli</i> . Purificación y constantes cinéticas (<i>K_m</i> y <i>K_d</i>)	Wu y col. (2007)

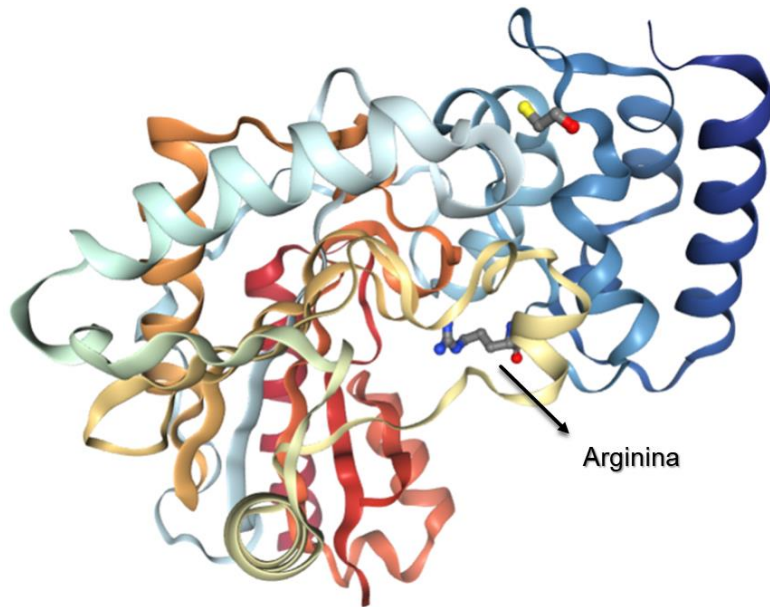


Figura 6. Complejo binario de la estructura cristalina de la AK de *L. vannamei* con arginina. Imagen tomada de base de datos PBD: 4BHL.

Arginina cinasa en reacciones alérgicas

La arginina cinasa es uno de los alérgenos más estudiados en invertebrados, ha sido caracterizada principalmente en especies de camarones como un alérgeno clínicamente relevante después de la tropomiosina (Ayuso y col., 2010). En el camarón blanco chino, *Penaeus chinensis* y en *L. vannamei* se han identificado las regiones de aminoácidos que reaccionan con anticuerpos (Tabla 4). También en el cangrejo de manglares, *S. paramamosain*, predijeron nueve epítomos lineares y siete epítomos conformacionales por medio de análisis bioinformáticos. A su vez, detectaron a la arginina cinasa como alérgeno en condiciones nativas y desnaturalizantes, mediante ensayos dot-blot y western blot, respectivamente (Mao y col., 2013).

Si bien ya se han reportado y caracterizado alérgenos de algunas especies de cangrejos, no se han identificado las proteínas alergénicas de las principales especies de jaibas de interés comercial en América, como la jaiba café, *C. bellicosus*. Por ello, el presente trabajo se propone identificar a la arginina cinasa como una proteína alergénica de la jaiba café, así como predecir sus epítomos de unión a IgE.

Tabla 4. Sitios de unión a IgE con arginina cinasa en crustáceos.

Especie	Tipo de epítomos	Epítomos de unión a IgE (No. de aminoácidos)	Autor(es)
Camarón chino (<i>Penaeus chinensis</i>)	Linear	19-33, 55-72, 91-107, 123-135, 140-154, 158-169, 250-266, 286-299, 320-333, 337-356	Fu y col. (2018)
Cangrejo de río (<i>Procambarus clarkii</i>)	Conformacional	91–92, 94–98, 100–101, 106, 108, 314 115–116, 172, 174–176, 178–180, 183, 263, 295, 299	Chen y col., (2013)
	Linear	39-43, 89-103, 146–152, 252-256, 311-317, 325-330	
Cangrejo de manglares (<i>Scylla paramamosain</i>)	Linear	39-44, 87-103, 146-151, 174-181, 253-256, 294-298, 309-317, 325-330	Mao y col., (2013)
	Conformacional	91-100, 106, 115-116, 172-183, 263, 295-299, 315, 320-321	
Camarón blanco del Pacífico (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Linear	1-18, 25-42, 64,96, 121-141, 142-159, 160-192, 232-255, 319-342	Ayuso y col., (2012)

HIPÓTESIS

La arginina cinasa es uno de los principales alérgenos en la jaiba café (*Callinectes bellicosus*) y es capaz de generar una respuesta inmunológica en sueros de pacientes alérgicos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar a la arginina cinasa como uno de los principales alérgenos presentes en la jaiba café (*Callinectes bellicosus*) y sus epítomos de unión a IgE mediante un análisis bioinformático.

Objetivos Específicos

1. Purificar la arginina cinasa a partir del músculo de la jaiba café.
2. Evaluar la inmunoreactividad a IgE *in vitro* en condiciones nativa y desnaturalizada utilizando sueros de sujetos alérgicos.
3. Obtener una secuencia nucleotídica del ADN complementario que codifica para la arginina cinasa de la jaiba café.
4. Predecir las regiones antigénicas de unión a IgE de la arginina cinasa a partir de su secuencia de aminoácidos, mediante un análisis bioinformático.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la arginina cinasa de la jaiba café como alérgeno

Obtención de sueros

Para la obtención de sueros se seleccionaron individuos alérgicos a la jaiba u otros crustáceos mediante la aplicación de un cuestionario, con el fin de recopilar información sobre los antecedentes familiares, manifestaciones clínicas durante o posterior al consumo de crustáceos y si han recibido inmunoterapias (Tabla 5), con la autorización del Comité de Ética en Investigación (CEI) de la Universidad de Sonora (Anexo I). Se consideraron como criterios de inclusión a aquellas personas con historial de alergias hacia el consumo de carne de jaiba (Anexo II). En caso de que los sujetos no tuvieran conocimiento de respuesta alérgica al consumo de jaiba, pero si al consumo de otros crustáceos, como el camarón, también se recolectaron muestras de suero. Esto con la finalidad de identificar si existe una reacción cruzada a estos dos tipos de alimentos.

La recolección de sangre periférica de cada sujeto se llevó a cabo en tubos BD Vacutainer® SST™ por venopunción, la cual se conservó a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo. Todas las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 min y se recolectó el suero, el cual fue dividido en alícuotas y se conservó a -80°C hasta su uso.

Tabla 5. Características de los sueros de los sujetos alérgicos y no alérgicos.

Sujeto (código)	Sexo	Edad	Control	Alergias conocidas
763	H	22	+	Camarón
974	M	28	+	Jaiba
184	M	20	+	Jaiba
447	M	29	+	Camarón
164	H	18	+	Varios alimentos
330	M	19	+	Jaiba
793	H	21	+	Jaiba
365	M	22	+	Jaiba
480	M	22	+	Jaiba
354	H	53	+	Jaiba
503	H	25	-	Ninguna
875	H	34	-	Ninguna

Recolección de jaiba y purificación de la AK

La jaiba café (*C. bellicosus*), se obtuvo del área costera de Bahía de Kino, Sonora. Esta fue identificada morfológicamente por pescadores dedicados a la captura de este organismo. Los especímenes se congelaron a -80 °C en el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Universidad de Sonora hasta su uso. La purificación de la AK se realizó a partir del músculo de la jaiba para lo cual se siguió el método descrito por García-Orozco y col. (2007) modificado. Se homogenizaron 10 g de músculo de la quela de la jaiba con 50 mL de buffer lisis (Tris-HCl 100 mM, PMSF 25 µM, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1mM, clorhidrato de benzamidina 1mM, pH 8.0). El homogenado se mantuvo en agitación constante por 16 h a 4 °C. Posteriormente, se clarificó por centrifugación a 18,000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se sometió a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio del 60 y 90 % de saturación. Se recuperó el precipitado de la fracción del 90 %, el cual fue resuspendido en buffer A (Tris-HCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 0.1mM, pH 8.0) y se dializó exhaustivamente contra este mismo buffer. El dializado se clarificó por centrifugación a 18, 000 x g a 4 °C por 20 minutos y se le midió la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976). Esta fracción se inyectó a una cromatografía de intercambio iónico utilizando un sistema de cromatografía líquida ÄKTA prime plus (GE Healthcare Life Sciences) y una columna pre-empacada Q sepharosa de 5 mL (GE Healthcare Life sciences) previamente equilibrada con buffer A. La columna se lavó con este buffer para eliminar las proteínas no unidas. La elución se realizó mediante un gradiente lineal del 0 al 100 % de buffer B (buffer A + NaCl 1 M) a un flujo de 3 mL/min. Durante toda la cromatografía se registró la absorbancia a 280 nm y se colectaron fracciones de 3 mL, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones en las que se observó la presencia de una banda única del peso molecular esperado para la AK (aprox. 40 kDa) se almacenaron a 4 °C para su posterior uso.

Cuantificación de proteína y electroforesis SDS-PAGE y nativa

La concentración de proteína de las fracciones se determinó por el método de Bradford adaptado a microplaca como se describe a continuación: 250 μL del reactivo de Bradford se mezclaron con 45 μL de agua ultrapura y 5 μL de la muestra. La reacción se incubó a 25 °C por 5 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm utilizando un espectrofotómetro de microplaca Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Japón). Cada medición se realizó por triplicado y se utilizó el buffer A como blanco de la reacción. La concentración de proteína se calculó por regresión lineal, utilizando como referencia albúmina de suero bovino (ASB) como estándar (0 – 2 mg).

Las fracciones proteicas obtenidas en el extracto y en la precipitación con sulfato de amonio, se analizaron por electroforesis de poliacrilamida en geles al 12% en condiciones desnaturizantes y nativas (Laemmli, 1970). Por último, los geles fueron teñidos por una hora con 0.1 % de azul brillante de Coomassie y se digitalizaron en un fotodocumentador Gel Doc[®]EZ (BioRad).

Identificación de la arginina cinasa por LC-MS

La banda correspondiente al peso molecular esperado para AK fue cortada del gel y enviada para su secuenciación mediante servicio del Laboratorio Universitario de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM). Brevemente, la muestra fue reducida con ditioneitol, alquilada con iodoacetamida, digerida con tripsina y posteriormente se analizaron por LC-MS acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Una vez obtenidas la secuencia del fragmento, estos fueron analizados comparándolos con secuencias depositadas en la base de datos de UniProt.

Evaluación *in vitro* de la AK de la jaiba café por western blot

La detección de la AK presente en las fracciones del músculo de la jaiba café se realizó por inmunotransferencia húmeda en una cámara Mini Trans-Blot® Cell (BioRad). Esta se llevó a cabo de la siguiente manera: se utilizaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) que fueron sumergidas brevemente en etanol concentrado y después en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20 % metanol, pH 8.3). La transferencia de la AK a la membrana se realizó a 200 mA por 105 minutos. Una vez terminada la transferencia, se lavó la membrana con 0.05 % de Tween-20 en TBS (Tris con buffer de solución salina) y se incubó durante 1 h en solución bloqueadora (5 % caseína de leche bovina en buffer Tween/TBS) a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con buffer Tween/TBS y se incubó a temperatura ambiente con suero de sujetos alérgicos (1:250 con buffer Tween/TBS) como anticuerpo primario por 24 h. Se retiró el anticuerpo primario, se lavó la membrana con buffer Tween/TBS y se incubó nuevamente la membrana con el anticuerpo secundario (anticuerpo IgE antihumano de conejo; Sigma Aldrich) a una dilución de 1:3000 con buffer Tween/TBS por 1.5 h (García-Orozco y col., 2007). Previamente el anticuerpo secundario fue biotinilado con 200 uL de biotina-n-succinimida 0.1 M (BNHS) en dimetilformamida (DMF) y dializado contra NaCl 0.1 M por 24 h. Posteriormente, se lavó la membrana con buffer Tween/TBS y se incubó con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP; EMD Millipore Corp) a una dilución de 1:2000 con buffer Tween/TBS por 1.5 h. Finalmente, las proteínas fueron detectadas empleando la solución reveladora: 10 mg de 3,3-Diaminobencidina (DAB; Sigma Aldrich) en 15 mL de buffer TBS y 12 µL de peróxido de hidrógeno (30% p/v; H₂O₂). La reacción se detuvo hasta que se observó la presencia de bandas en el tamaño esperado. Se realizaron controles experimentales y negativos con sueros de sujetos no alérgicos.

Predicción de epítomos de unión a IgE de la arginina cinasa de la jaiba café

Diseño de oligonucleótidos

Actualmente no se encuentra reportada la secuencia nucleotídica de la arginina cinasa de la jaiba café, por lo que se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia reportada de la jaiba azul del Atlántico, *Callinectes sapidus* en la base de datos GenBank (No. acceso: AF233355.1) para obtener de la secuencia de la AK. Los oligonucleótidos contienen entre 40 y 60 % de GC y una longitud entre 20 y 24 pares de bases con el fin de obtener un amplicón de ~1000 pares de bases, tamaño idóneo para la obtención de la secuencia nucleotídica que codifica a la arginina cinasa (Tabla 5).

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos diseñados para AK de *C. bellicosus*.

Oligonucleótidos	Secuencia	pb	%G C	Tm °C
AKcrab_Fw1	ATGGCTGACGCTGCTACCATTG	22	54.5	68
AKcrab_Rv1	TTACTGCATTTCTTCTCAATCTT	24	33.3	62
AKcrab_Fw2	GACCAAGGAAGTGCAGCAAAAGC	23	52.1	68
AKcrab_Rv2	GGAAGCGGTCACCCTCCTTGA	21	61.9	70

Extracción de ARN total de *C. bellicosus*

Para la obtención de la secuencia de ADN complementario (ADNc) se utilizaron 130 mg del músculo de la quela de la jaiba café, los cuales fueron macerados en 1 mL de reactivo TRIzol® (Invitrogen, CA) y de acuerdo con lo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). Posteriormente, al ser homogenizado el músculo, se añadieron 200 µL de cloroformo, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se recolectó la fase acuosa y se llevó a cabo nuevamente la extracción adicionando 500 µL de TRIzol®. Se recuperó la fase acuosa a la cual se le adicionó 1 mL de isopropanol frío, se incubó por 10 minutos y se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol frío al 75 % en agua tratada con dietil pirocarbonato al 0.1 % (DEPC). Para finalizar la extracción, se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4 °C y se desechó el sobrenadante; el exceso de etanol restante se eliminó por evaporación. El precipitado se re-suspendió en 30 µL de agua DEPC al 0.1 %.

Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN Total

El ARN total obtenido se cuantificó por triplicado a una longitud de onda de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 v 3.5.2, (Thermo Scientific, USA). Posteriormente, se valoró la integridad del ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con UView™ 6x Loading Dye (1 µL/5 µL de muestra; Bio-Rad Laboratories, Inc.) como marcador fluorescente, utilizando 3 µg de ARN total. La electroforesis se llevó a cabo a 60 volts y el gel fue fotodocumentado con el sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-rad, USA) y analizado con el programa Image Lab™ Software (Bio-rad, USA).

Digestión del ADN genómico presente en muestras de ARN total y síntesis del ADN complementario

Para la obtención completa del ADNc fue necesario eliminar la contaminación por ADN genómico (ADNg) que se encuentra en la muestra de ARN total extraída. Para ello se digirieron 5.5 µg de muestra con DNasa I (1 U/µg de ARN; Sigma, USA) en buffer de reacción y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la mezcla se incubó a 37 °C por 20 minutos, se añadió 1 µL de EDTA 50 mM para inactivar la enzima y se incrementó la temperatura a 70 °C por 10 minutos. Posteriormente, se comprobó la eliminación del ADNg por medio de PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

El ADNc fue sintetizado a partir de 5 µg de ARN total de *C. bellicosus* libre de ADNg empleando el kit comercial SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se preparó una mezcla con 5 µg de ARN total, 0.5 µL de oligo (dT)₂₀, y se incubó a 65 °C por 5 minutos. Se enfrió en hielo por 5 minutos, se agregó una segunda mezcla con 4 µL de SCRIPT RT Buffer complete, 1 µL de dNTP Mix 10 mM, DTT stock solution 100 mM, 1 µL de RNase Inhibitor y 0.5 µL de SCRIPT Reverse Transcriptase y se llevó hasta un volumen de 20 µL con H₂O libre de nucleasas. La reacción se incubó a 25 °C por 5 minutos y después a 42 °C por una hora. Posteriormente, se incubó a 70 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima transcriptasa reversa. Finalmente, el ADNc se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Obtención de la secuencia nucleotídica de la arginina cinasa

A partir del ADNc sintetizado se llevó a cabo un PCR convencional utilizando los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la arginina cinasa de *C. bellicosus*. La reacción de PCR se realizó usando 24 µL de la mezcla preparada a partir de 12.5 µL H₂O agua ultrapura, 2.5 µL coral 10x, 2.5 µL buffer 10x, 0.5 µL dNTPs 10 mM, 5 µL

solución Q 5x, 0.125 μ L Taq (5 U/ μ L) y 0.5 μ L de cada oligonucleótido 1.6 mM y 1 μ L de ADNc (equivalentes a 200 ng de ARN total). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 5 minutos (un ciclo); 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 1.5 minutos (35 ciclos) y una extensión de 72 °C por 10 minutos en un termociclador C-1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Por último, los productos de PCR obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1 % y purificados por columnas GFX (General Electric, CA), siguiendo las condiciones del fabricante. La secuenciación nucleotídica se llevó a cabo por el método de Sanger a través de un servicio externo a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma Nacional de México (IBt-UNAM). La secuencia fue analizada en el software Chromas y fue identificada realizando una búsqueda blast en la base de datos de NCBI contra la secuencia reportada de *C. sapidus* (No. acceso: AF233355.1). A partir de la secuencia obtenida, se dedujo la secuencia de aminoácidos por el programa ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

Predicción de los epítomos de unión a IgE de la arginina cinasa

La predicción de las regiones alergénicas presentes en la secuencia deducida de aminoácidos de la AK, se realizó a través de diferentes programas informáticos. Se utilizaron los softwares BepiPred 1.0 y Secret-AAR los cuales pronostican la ubicación de los epítomos lineales de células B utilizando una combinación entre el modelo oculto de Markov y un método de escala de propensión o epítomos conformacionales con ayuda del algoritmo Random Forest (Larsen y col., 2006; Cornejo-Granados y col., 2018). Y para los epítomos conformacionales se usó DiscoTope 2.0 que predice residuos de aminoácidos discontinuos con tendencia a ser alergénicos. Este programa calcula la accesibilidad a la superficie (estimada en términos de números de contacto) y califica a los aminoácidos a ser propensos a ser epítomos. El resultado final se calcula

al combinar las puntuaciones de propensión de los residuos en la proximidad espacial y los números de contacto (Kringelum y col., 2012).

Modelo estructural de la arginina cinasa y sus regiones alergénicas

A partir de la secuencia deducida de aminoácidos, se generó un modelo por homología de la estructura de la AK de *C. bellicosus*. El modelo se construyó utilizando el programa Phyre2 en el modo intensivo (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>; Kelley y col., 2015) tomando como templado la estructura cristalina de la arginina cinasa del cangrejo herradura del Atlántico, *Limulus polyphemus* depositada en la base de datos Protein Data Bank (PDB: 1RL9), ya que este tiene >77% de identidad de la secuencia de aminoácidos comparado con la AK de *C. bellicosus*. El análisis del modelo y las imágenes generadas se realizaron con el programa UCSF Chimera (Pettersen y col., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Purificación e identificación de la AK

La AK se purificó a partir del extracto crudo del músculo de la jaiba café, *C. bellicosus*, mediante precipitación fraccionada con (60 y 90 %) con sulfato de amonio. En la fracción del precipitado al 90% de saturación de sulfato de amonio se observó una banda abundante correspondiente al peso molecular esperado (aprox. 40 kDa) para la AK (Figura 8, carril 3). Esta fracción se inyectó a la cromatografía de intercambio iónico en la que se observó la presencia proteína en varios picos. En la figura 7 se muestra un cromatograma típico de la purificación de la AK, en el cual se observa claramente la separación de varios picos. En las fracciones correspondientes al pico mayoritario (4 % de buffer B equivalente a 0.04 M de NaCl) se observó la presencia de una banda única alrededor de los 40 kDa (figura 8 cariles 6-10); la cual corresponde a la proteína de interés, ya que ésta concuerda con lo reportado en 2013 por Mao y col., donde obtuvieron una banda con un peso molecular de 40 KDa que pertenece a la arginina cinasa del cangrejo de los manglares, *Scylla paramamosain*. Estas fracciones se mezclaron y fueron utilizadas para realizar la identificación de la enzima por cromatografía LC-MS. Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa Scaffold (Proteome Software) y se comparó con la secuencia de AK reportada de *Callinectes sapidus* (GenBank: AF233355.1), obteniendo un 60% de cobertura con la jaiba azul del Atlántico, identificando así la proteína purificada como arginina cinasa con un 100% de similitud (Figura 9). De acuerdo con este resultado se confirmó que la proteína purificada con el procedimiento anteriormente descrito corresponde a la arginina cinasa de la jaiba café *C. bellicosus*.

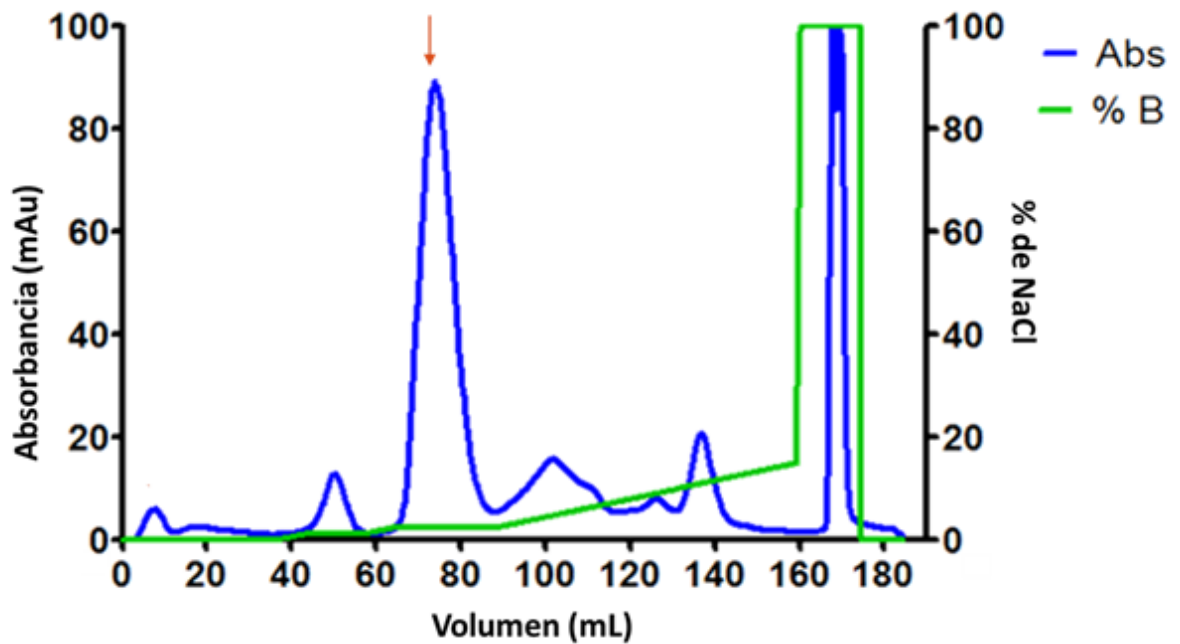


Figura 7. Cromatografía de intercambio iónico las fracciones proteicas del músculo de la jaiba café. La absorbancia obtenida se muestra de color azul y el gradiente de 0 a 100 % de buffer B (NaCl) se representa en color verde, el cual fue aplicado a partir de la fracción 6, de manera que el pico formado entre las fracciones 16 y 17 indica la elución de la enzima (flecha naranja).

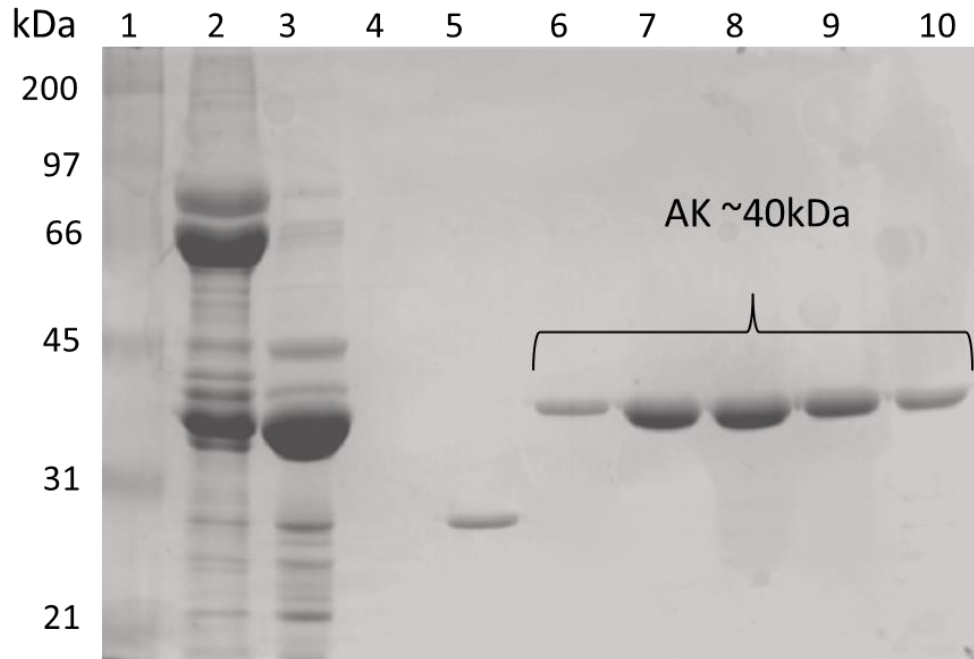


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE de fracciones obtenidas por CII. 1) Marcador de peso molecular, 2) clarificado, 3) precipitado al 90 % con sulfato de amonio, 4) proteínas no unidas a columna antes de la elución con buffer B, 5) proteína eluída a 1 % de buffer B y 6-10) fracciones puras de AK. Gel teñido con 0.1 % de azul brillante de Coomassie.

KARG_CALSI (100%), 40,315.8 Da

25 exclusive unique peptides, 34 exclusive unique spectra, 221 total spectra, 213/357 amino acids (60% coverage)

Sequence Coverage	Protein /					Accession	Prob
	Arginine kinase OS=Callinectes sapidus OX=6763 PE=2 SV=1					KARG_CALSI	100%
MADAATIAKL	EEGFKKLEAA	TDCKSLLKKY	LTKSVFDQLK	DKKTSLGATL	LDVIQSGVEN		
LDSGVGVYAP	DAEAYTLFAP	LFDPPIEDYH	KGFKQTDKHP	NKDFGDVNQF	VNVDPDGKQV		
ISTRVRCGRS	MEGYPFNPCL	TEAQYKEMES	KVSSTLSNLE	GELKGTYPPL	TGMTKEVQQK		
LIDDHFLFKE	GDRFLQAANA	CRYWPTGRGI	YHNDNKTFVL	WCNEEDHLRI	ISMQMGDLG		
QVYRRLVSAV	NEIEKRVVPS	HHDRLGFLTF	CPTNLGTTVR	ASVHIKLPKL	AANREKLEEV		
AGKYSLQVRG	TRGEHTEAEG	GVYDISNKRR	MGLTEYQAVK	EMQDGILELI	KIEKEMQ		

Figura 9. Identificación y cobertura de la AK de *C. bellicosus* con la AK de *C. sapidus*. Se marca en amarillo aquellos péptidos identificados de la muestra de *C. bellicosus* y de verde los residuos modificados (No. acceso: AF233355.1).

Inmunodetección de la AK de la jaiba café por western blot

La inmunoreactividad de la AK se evaluó mediante la técnica “western blot” empleando diez sueros de sujetos alérgicos a la jaiba y/o crustáceos, dos sueros de sujetos no alérgicos (Tabla 6) y se realizaron tres controles experimentales: sin anticuerpo primario (sueros), sin anticuerpo secundario y sin ningún anticuerpo. El 80 % de los sueros mostraron reactividad con la AK desnaturalizada (carriles 3-10), los sueros de pacientes no alérgicos (carriles 11 y 12) y los controles experimentales no mostraron reactividad contra la AK (carriles 13-15; Figura 10). En el caso del inmunoensayo con la enzima nativa, solo siete de los diez sueros utilizados mostraron ser positivos la unión entre IgE con la AK (carriles 4-10); en las tiras de sueros no alérgicos (carriles 11 y 12) y los controles no presentaron bandas (carriles 13-15; Figura 11). En los sueros 763 y 974 (carriles 1 y 2, respectivamente) no hubo detección de bandas en ambas pruebas. Esto podría deberse a que el paciente 763 desconoce si es alérgico a la jaiba, pero fue seleccionado para este ensayo ya que en las respuestas al cuestionario mencionó que es alérgico al camarón y existen antecedentes familiares sobre alergias a crustáceos. Al no haber detección de la AK probablemente sus anticuerpos no presentan reactividad cruzada o no es alérgico a la enzima evaluada. Por el lado del paciente 974, indicó en sus respuestas que si ha presentado reacción inmunológica al consumo de la jaiba. Sin embargo, al dar negativo a la prueba de inmunodetección, significa que no es alérgico a la AK. En el caso de estos dos sujetos es posible que la respuesta alérgica esté relacionada a otra proteína presente en el músculo de la jaiba como la tropomiosina, miosina de cadena ligera u otras proteínas, como lo reportado en el camarón gris, *C. crangon* donde se identificaron seis proteínas diferentes en sueros de sujetos alérgicos (Bauermeister y col., 2011).

Como se mencionó anteriormente, existen dos tipos de epítomos, los lineales que comprenden regiones de aminoácidos continuas y son reconocidos en su estructura primaria por los anticuerpos IgE y los conformacionales, que son aquellas regiones de aminoácidos que se encuentran distanciados espacialmente cuando se encuentran en su estructura secundaria y/o terciaria (Bannon, 2004; Matsuo y col.,

2015). SDS-PAGE es una técnica electroforética que ayuda a separar a las moléculas por su tamaño y carga utilizando SDS (dodecilsulfato sódico) como detergente, el cual desnaturaliza la estructura terciaria y secundaria de las proteínas para poder estimar su peso molecular (Brunelle y Green, 2014). Los resultados obtenidos nos indican que los anticuerpos de los sueros de pacientes alérgicos que mostraron alergenicidad a la AK, presentan reconocimiento a epítomos tanto lineales como conformacionales, dado que la banda detectada a los 40 kDa se mantiene en ambas condiciones. El suero 184 (carril 3) fue el único en presentar diferencias entre ambos ensayos. Esto podría deberse a que los anticuerpos IgE del sujeto 184 podrían mostrar sensibilidad únicamente a los epítomos lineales de la enzima al encontrarse expuestos estructuralmente, permitiendo su interacción. Caso similar sucede en el estudio reportado por Mao y col. (2013), donde evaluaron a la AK nativa y desnaturalizada de *S. paramamosain*, utilizando sueros de pacientes alérgicos, obteniendo predominancia en la unión de IgE a la AK nativa, donde nueve pacientes presentaron reactividad, mientras que, en condiciones desnaturalizantes, solo tres de ellos reaccionaron con la enzima, concluyendo que su grupo de estudio tiene predominancia a epítomos conformacionales que a los lineales.

La arginina cinasa ya ha sido identificada como proteína alergénica en varios organismos. García-Orozco y col. (2007), reportaron a la AK como el primer alérgeno identificado en el camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei* (Lit v 2), por medio de ensayos western blot utilizando sueros de pacientes alérgicos. En el cangrejo del barro, *S. serrata*, se logró detectar a la AK purificada y recombinante como proteína alergénica a través de un ensayo dot-blot con suero de cuatro pacientes alérgicos a crustáceos (Shen y col., 2011). Por otro lado, Rosmilah y col. (2012) evaluaron la alergenicidad del extracto crudo y cocido del cangrejo azul, *P. pelagicus*, en donde detectaron en >90 % de los sueros, bandas correspondientes a la arginina cinasa en el extracto crudo, pero ésta no apareció en el extracto cocido, debido a que la AK es una enzima termolábil y se degrada a altas temperaturas. Resultados similares se reportaron en el camarón gigante de río, *Macrobrachium rosenbergii* y en el langostino tigre, *P. monodon* (Samson y col., 2004; Yadzir y col., 2012).

Con estos resultados se puede concluir que la AK de la jaiba café, es capaz de generar una reacción inmunológica mediada por IgE en sueros de pacientes alérgicos.

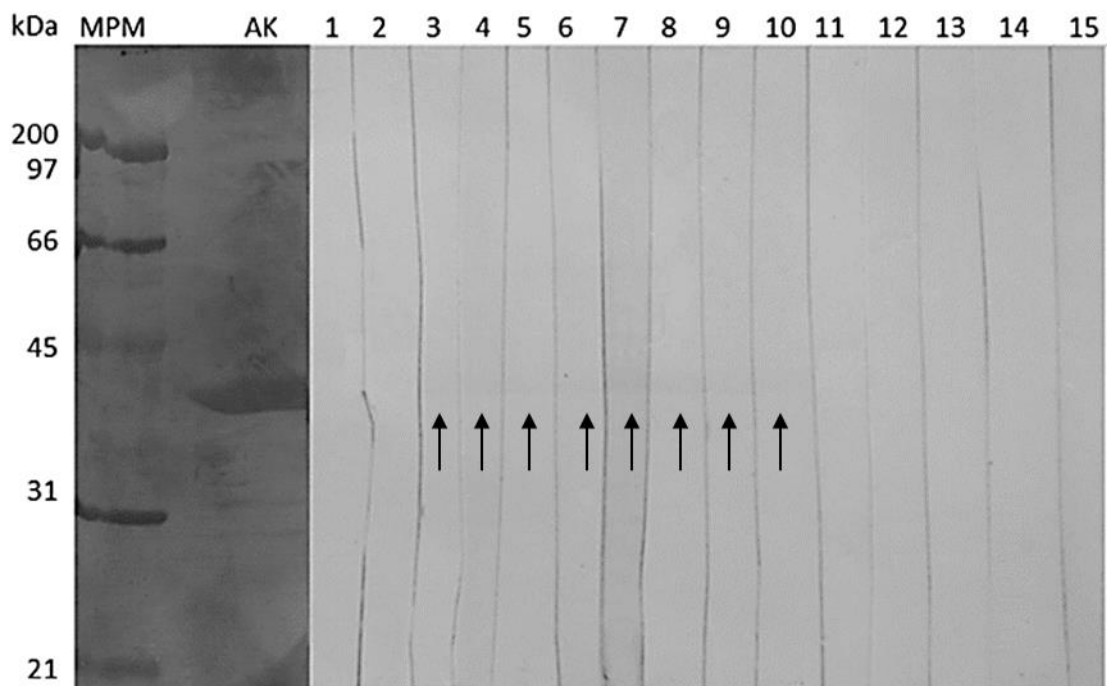


Figura 10. Inmunodetección de la AK en condiciones desnaturalizantes. 1-10) Sueros de pacientes alérgicos, 11-12) sueros de pacientes no alérgicos, 13) control sin anticuerpo primario, 14) control sin anticuerpo secundario y 15) control sin ambos anticuerpos. Se señala con flechas la ubicación de las bandas detectadas.

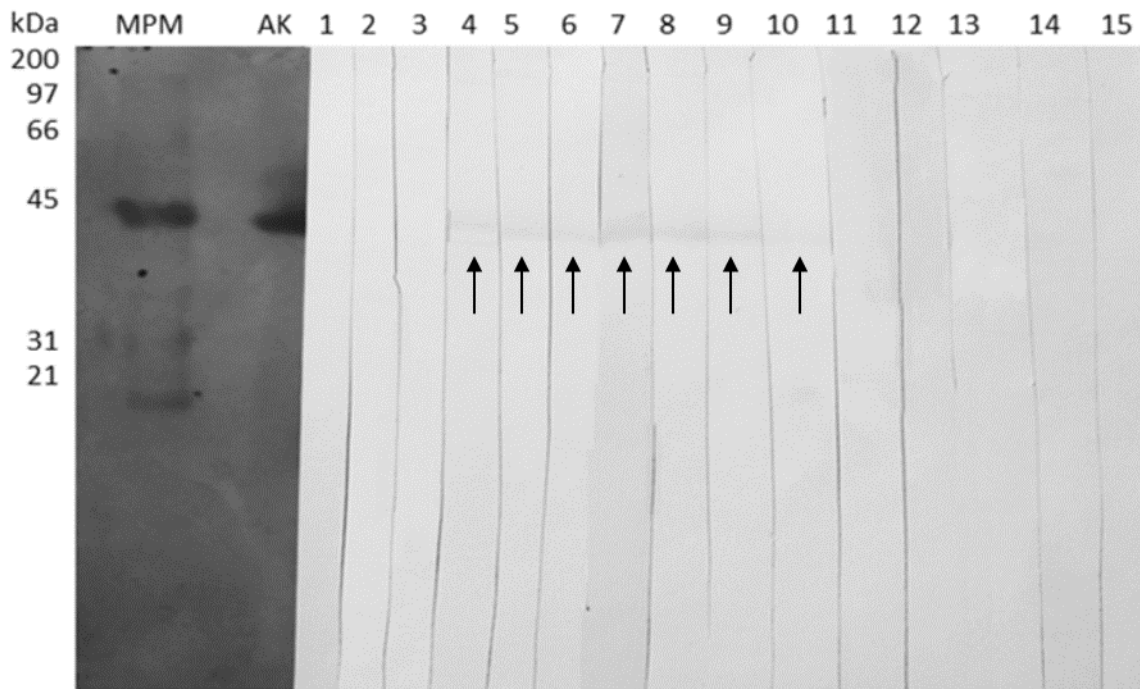


Figura 11. Inmunodetección de la AK en condiciones nativas. 1-10) Sueros de pacientes alérgicos, 11-12) sueros de pacientes no alérgicos, 13) control sin anticuerpo primario, 14) control sin anticuerpo secundario y 15) control sin anticuerpos. Se señala con flechas la ubicación de las bandas detectadas.

Secuencia nucleotídica de la arginina cinasa

Obtención de la secuencia nucleotídica de la AK

Para obtener la secuencia del ADNc de la AK, se aisló y se cuantificó el ARN total extraído por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm, obteniendo una concentración de 933 ng/ μ L y una relación 260/280 de 2.0. La concentración de ARN se deriva de la absorbancia a 260 nm, la longitud de la trayectoria de la luz y el coeficiente de extinción molar (Douglas y col., 2005). Mientras que la pureza se obtiene a partir de la relación de la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. El ARN debe tener una relación 260/280 de alrededor de 1.8 – 2 para ser considerado como un producto puro (Douglas y col., 2005). La evaluación de la integridad del ARN se hizo mediante la visualización de las bandas 28S y 18S del ARN ribosomal (ARNr) y por la ausencia de barridos en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 12; Mueller y col., 2004).

Para la amplificación del gen de interés es necesario eliminar el ADN genómico del RNA extraído, ya que en el ARNm maduro se encuentran secuencias codificantes (exones) y la presencia de ADNg podría causar posibles interferencias al momento de evaluar la expresión génica. En la Figura 12b se confirma la eliminación del ADNg tratado con la enzima DNAsa I por la ausencia de una banda de amplificación del gen AK (carril 2). Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del ADNc y la amplificación de AK de *C. bellicosus* por PCR convencional utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados. En la Figura 12c se muestra una banda de amplificación de ~1000 pb (carril 2) correspondiente al gen AK, utilizando los primers Fw1 y Rv1. En el carril 4 el control positivo empleando ADNg amplificado con AK y el carril 3 representa el control negativo de AK utilizando ADNg. Por lo anterior, se confirma la obtención del fragmento de interés de 1000 pb correspondiente a la arginina cinasa de *C. bellicosus*.

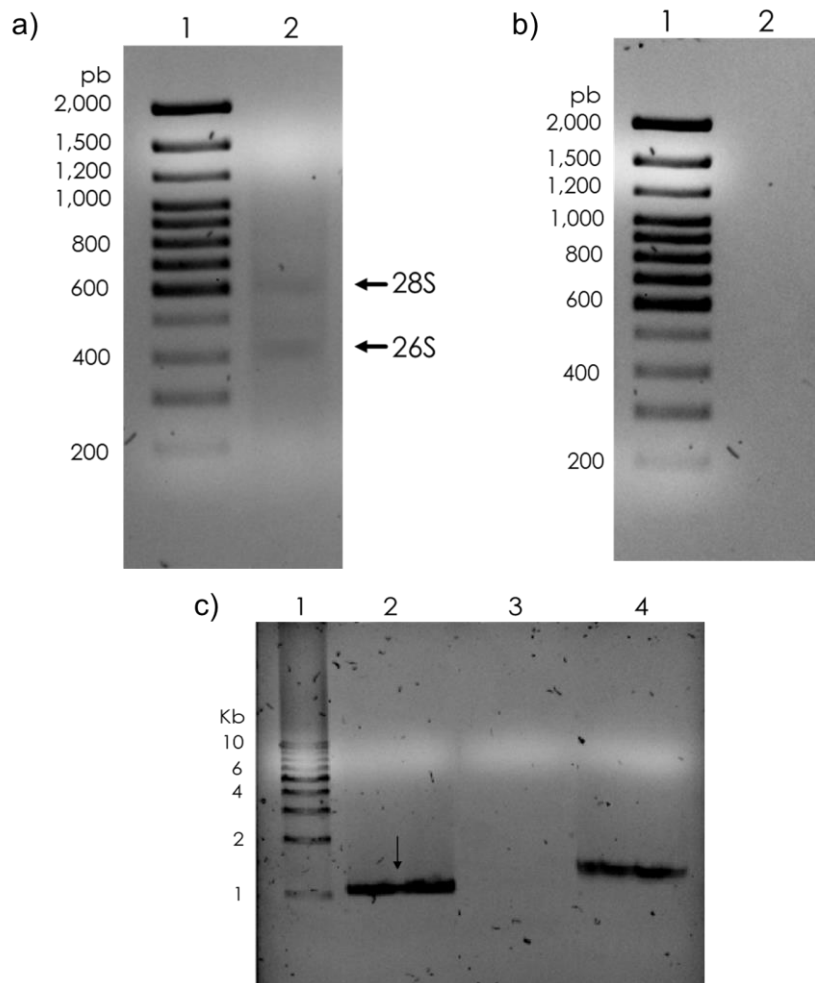


Figura 12. Obtención de la secuencia nucleotídica de la AK de la jaiba café. a) Integridad del ARN total de *C. bellicosus*. 1) Marcador de peso molecular y 2) ARN total de *C. bellicosus*. b) Digestión del ADN genómico de *C. bellicosus*. 1) Marcador de peso molecular, 2) ARN tratado con DNasa I. c) Amplificación del fragmento de ADNc de *C. bellicosus*. 1) Marcador de peso molecular, 2) ADNc amplificado con AK, 3) control negativo utilizando ADNg amplificado con AK y 4) control positivo utilizando ADNg amplificado con AK.

Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la arginina cinasa

Se llevó a cabo la purificación del producto de PCR del fragmento amplificado de 1000 pb a través de columnas GFX, obteniendo una pureza de 1.94 y una concentración de 41.34 ng/uL de ADN. A través de un servicio externo a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma Nacional de México (IBt-UNAM) se obtuvo la secuencia nucleotídica completa de la AK de la jaiba café la cual posee un marco de lectura abierto de 1075 pb, el codón de inicio (ATG) se encuentra en la posición 2 y el codón de termino (TAA) en 1073 pb (Figura 13). La secuencia de nucleótidos fue comparada con la secuencia reportada de *C. sapidus* (No. acceso: AF233355.1), obteniendo una identidad del 99% en ambas secuencias; por lo tanto, la secuencia corresponde al transcrito de una AK (Figura 14). Posteriormente, se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el programa ExPASy generándose una secuencia de 357 residuos de aminoácidos (Figura 13). Adicionalmente, se hizo un alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos con la AK de otras especies cangrejos y de camarones, consiguiendo un >92 % de similitud, indicando que la secuencia de la AK de *C. bellicosus* se encuentra altamente conservada entre crustáceos (Figura 15).

A lo largo de la secuencia de aminoácidos deducida de la AK de *C. bellicosus* se encuentran solo dos residuos distintos al de *C. sapidus*, en la posición tres, donde se cambia un ácido aspártico (D) por un ácido glutámico (E) y en la posición 50 un ácido aspártico por una glicina (G). Sin embargo, esta variación no genera algún cambio en la estructura de la proteína ni en su función, puesto que ambos aminoácidos presentan características químicas similares (Vasudevan y Sreekuman, 2012).

1	TATG	GCTGAAGCTGCTACCATTGCCAAGCTGGAGGAGGGCTTCAAGAAGCTGGAGGCTGCC	61
1	M A E A A T I A K L E E G F K K L E A A		20
62	ACTGACTGCAAGTCTCTCCTCAAGAAGTACCTCACCAAGTCTGTGTTCGACCAGCTCAAG	121	
21	T D C K S L L K K Y L T K S V F D Q L K		40
122	GGCAAGAAGACAAGCCTTGGCGCCACCCTCCTCGATGTGATCCAGTCTGGTGTGAGAAC	181	
41	G K K T S L G A T L L D V I Q S G V E N		60
182	CTGGACTCTGGCGTTGGTGTGTATGCCCTGACGCCGAGGCCTACACCCTCTTCGCCCCT	241	
61	L D S G V G V Y A P D A E A Y T L F A P		80
242	CTGTTCGACCCCATCATCGAGGACTACCAAGGGTTTCAAGCAGACTGACAAGCACCCCT	301	
81	L F D P I I E D Y H K G F K Q T D K H P		100
302	AACAAGGACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAACGTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTG	361	
101	N K D F G D V N Q F V N V D P D G K F V		120
362	ATCTCCACTCGCGTTCGCGTTCGCGTCCATGGAGGGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTC	421	
121	I S T R V R C G R S M E G Y P F N P C L		140
422	ACCGAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAGGTTTCTCCACCCTGTCCAACCTCGAG	481	
141	T E A Q Y K E M E S K V S S T L S N L E		160
482	GGCGAGCTCAAGGGCACTTACTCCCCCTACCGGCATGACCAAGGATGTGCAGCAGAAG	541	
161	G E L K G T Y F P L T G M T K D V Q Q K		180
542	CTGATCGACGACCACTTCTCTTCAAGGAGGGTGACCGCTTCTGCAGGCCGCTAATGCC	601	
181	L I D D H F L F K E G D R F L Q A A N A		200
602	TGCCGCTACTGGCCCACTGGCCGTGGCATCTACCACAACGACAACAAGACCTTCTGGTG	661	
201	C R Y W P T G R G I Y H N D N K T F L V		220
662	TGGTGCAACGAAGAGGATCACCTCCGCATCATCTCCATGCAGATGGGTGGTGACCTGGGC	721	
221	W C N E E D H L R I I S M Q M G G D L G		240
722	CAGGTCTACCGCCGCTTGTTCAGCGCTGTTAACGAGATTGAGAAGCGCGTGCCCTTCTCC	781	
241	Q V Y R R L V S A V N E I E K R V P F S		260
782	CACCATGACCGCCTGGGCTTCTCACCTTCTGCCCCACCAACCTTGGCACCACCGTGCCT	841	
261	H H D R L G F L T F C P T N L G T T V R		280
842	GCCTCCGTCCACATCAAGCTCCCCAAGCTGGCCGCAACCGCGAAAAGCTTGAGGAAGTC	901	
281	A S V H I K L P K L A A N R E K L E E V		300
902	GCTGGCAAGTACAGTCTCCAGGTTTCGCGGCACCCGCGGCGAGCACACCGAGGCTGAGGGC	961	
301	A G K Y S L Q V R G T R G E H T E A E G		320
962	GGCGTGTACGACATCTCCAACAAGCGCCGCATGGGTCTTACTGAGTACCAGGCTGTTAAG	1021	
321	G V Y D I S N K R R M G L T E Y Q A V K		340
1022	GAGATGCAGGACGGTATCCTTGAGCTCATCAAGATTGAGAAGGAAATGCAGTAA	1075	
341	E M Q D G I L E L I K I E K E M Q -		357

Figura 13. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida de la AK de *C. bellicosus*. Alineamiento de la secuencia nucleotídica obtenida y su traducción a aminoácidos. Se muestran de color amarillo el codón de inicio (ATG) y de gris el codón de termino (TAA).

<i>C. sapidus</i>	CGCCAGGGGTCTTCACAGAACACAATGGCTGACGCTGCTACCAITGCCAAGCTGGAGGAG	60
<i>C. bellicosus</i>	-----TATGGCTGAGGCTGCTACCAITGCCAAGCTGGAGGAG	37

<i>C. sapidus</i>	GGCTTCAAGAAGCTGGAGGCTGCCACTGACTGCAAGTCTCTCCTCAAGAAGTACCTCACC	120
<i>C. bellicosus</i>	GGCTTCAAGAAGCTGGAGGCTGCCACTGACTGCAAGTCTCTCCTCAAGAAGTACCTCACC	97

<i>C. sapidus</i>	AAGTCTGTGTTGACCCAGCTCAAGGACAAGAAGACAAGCCTGGGCGCCACCTCCTCGAT	180
<i>C. bellicosus</i>	AAGTCTGTGTTGACCCAGCTCAAGGACAAGAAGACAAGCCTGGGCGCCACCTCCTCGAT	157

<i>C. sapidus</i>	GTGATCCAGTCTGGTGTGAGAACCTGGACTCTGGCGTTGGTGTGTACGCCCTGACGCC	240
<i>C. bellicosus</i>	GTGATCCAGTCTGGTGTGAGAACCTGGACTCTGGCGTTGGTGTGTATGCCCTGACGCC	217

<i>C. sapidus</i>	GAGGCCTACACCCTCTTCGCCCTCTGTTCGACCCCATCATCGAGGACTACCACAAAGGTT	300
<i>C. bellicosus</i>	GAGGCCTACACCCTCTTCGCCCTCTGTTCGACCCCATCATCGAGGACTACCACAAAGGTT	277

<i>C. sapidus</i>	TTCAGCAGACTGACAAAGCACCTAACAAAGGACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC	360
<i>C. bellicosus</i>	TTCAGCAGACTGACAAAGCACCTAACAAAGGACTTCGGCGATGTCAACCAGTTCGTCAAC	337

<i>C. sapidus</i>	GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTTCGTTGGTTCGCTCCATGGAG	420
<i>C. bellicosus</i>	GTGGACCCCGATGGCAAGTTCGTGATCTCCACTCGCGTTCGTTGGTTCGCTCCATGGAG	397

<i>C. sapidus</i>	GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCGAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAAGGTT	480
<i>C. bellicosus</i>	GGCTACCCCTTCAACCCCTGTCTCACCGAGGCCAGTACAAGGAGATGGAGTCCAAAGGTT	457

<i>C. sapidus</i>	TCCTCCACCCTGTCCAACTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC	540
<i>C. bellicosus</i>	TCCTCCACCCTGTCCAACTCGAGGGCGAGCTCAAGGGCACTTACTTCCCTCTCACCGGC	517

<i>C. sapidus</i>	ATGACCAAGGAAGTGCAGCAAAAGCTGATCGACGACCCTTCTCTTCAAGGAGGTTGAC	601
<i>C. bellicosus</i>	ATGACCAAGGATGTGCAGCAAAAGCTGATCGACGACCCTTCTCTTCAAGGAGGTTGAC	577

<i>C. sapidus</i>	CGCTTCCTGCAGGCGCTAATGCTGCGCTACTGGCCCACTGGCCGTGGCATCTACCAC	660
<i>C. bellicosus</i>	CGCTTCCTGCAGGCGCTAATGCTGCGCTACTGGCCCACTGGCCGTGGCATCTACCAC	637

<i>C. sapidus</i>	AACGACAACAAGACCTTCTGTGGTGTGCAACGAAAGAGATCACCTCCGCATCATCTCC	720
<i>C. bellicosus</i>	AACGACAACAAGACCTTCTGTGGTGTGCAACGAAAGAGATCACCTCCGCATCATCTCC	697

<i>C. sapidus</i>	ATGCAGATGGGTGGTGCACCTGGGCCAGTCTACCGCCGCTTGTACGCGCTGTTAACGAG	780
<i>C. bellicosus</i>	ATGCAGATGGGTGGTGCACCTGGGCCAGTCTACCGCCGCTTGTACGCGCTGTTAACGAG	757

<i>C. sapidus</i>	ATTGAGAAGCGCGTGCCTTCTCCCACCATGACCGCCTGGGCTTCTCACCTTCTGCCCC	840
<i>C. bellicosus</i>	ATTGAGAAGCGCGTGCCTTCTCCCACCATGACCGCCTGGGCTTCTCACCTTCTGCCCC	817

<i>C. sapidus</i>	ACCAACCTTGGCACCACCGTGGCTGCCCTCCGTCACATCAAGCTCCCCAAGCTGGCCGCG	900
<i>C. bellicosus</i>	ACCAACCTTGGCACCACCGTGGCTGCCCTCCGTCACATCAAGCTCCCCAAGCTGGCCGCG	877

<i>C. sapidus</i>	AACCGCGAAAAGCTTGGAGGAGTCCCGGCAAGTACAGCCTCCAGGTTCCGCGGCACCCGC	960
<i>C. bellicosus</i>	AACCGCGAAAAGCTTGGAGGAGTCCCGGCAAGTACAGCCTCCAGGTTCCGCGGCACCCGC	937

<i>C. sapidus</i>	GGCGAGCACACCGAGGCTGAGGGCGCGGTGTACGACATCTCCAAACAGCGCGCATGGGT	1020
<i>C. bellicosus</i>	GGCGAGCACACCGAGGCTGAGGGCGCGGTGTACGACATCTCCAAACAGCGCGCATGGGT	997

<i>C. sapidus</i>	CTCACTGAGTACCAGGCTGTCAAGGAGATGCAGGACGGTATCCTTGAGCTCATCAAGATT	1060
<i>C. bellicosus</i>	CTTACTGAGTACCAGGCTGTAAAGGAGATGCAGGACGGTATCCTTGAGCTCATCAAGATT	1057
	** *****	
<i>C. sapidus</i>	GAGAAGGAAATGCAGTAAAGTTCGGCTCCTCCTCTATGGGTGAGGGCGAGCCGGTCTCT	1140
<i>C. bellicosus</i>	GAGAAGGAAATGCAG-----	1072

<i>C. sapidus</i>	GCTGTAGGAAGAGGTTGCCCCACCTGGACCCGGGCCCCAGGAGAGTGGCGCTGGATTG	1200
<i>C. bellicosus</i>	-----	1072

<i>C. sapidus</i>	GCAITTTGTCAGCCCGCAACAAACCATCTTTAACCTAGCGAGCTGATGAAGCAGCT	1256
<i>C. bellicosus</i>	-----	1072

Figura 14. Alineamiento secuencia nucleotídica de la AK de *C. bellicosus* contra la AK de *C. sapidus*. Los asteriscos (*) representan las bases nucleotídicas similares entre secuencias, los espacios cuando son distintos y los guiones (-) las pares de bases no secuenciadas (No. acceso: AF233355.1).

Cbellicosus	MAEAATIAKLEEGFKKLEAATDCKSLKKYLTKSVFDQLKGGKTSLGATLLDVIQSGVEN	60
Csapidus	MADAATIAKLEEGFKKLEAATDCKSLKKYLTKSVFDQLKGGKTSLGATLLDVIQSGVEN	60
Sparamamosain	MADAATIAKLEEGFKKLEAATDCKSLKKYLTKSVFDQLKGGKTSLGATLLDVIQS-VEN	59
Lvannamei	MADAAVIEKLEAGFKKLEAATDCKSLKKYLTKSVFDKLDKRTSLGATLLDVIQSGVEN	60
Pchinensis	MADAAVIEKLEAGFKKLEAATDCKSLKKYLTKAVFDQLKGGKTSLGATLLDVIQSGVEN *:*. * ** ***** ***:*. *:***** **	60
Cbellicosus	LDSGVGVYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHKGFKQTDKHPNKDFGDVNFVNVDPDGKFV	120
Csapidus	LDSGVGVYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHKGFKQTDKHPNKDFGDVNFVNVDPDGKFV	120
Sparamamosain	LDSGVGVYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHKGFKQTDKHPNKDFGDVNFVNVDPDGKFV	119
Lvannamei	LDSGVGIYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHVGFKQTDKHPNKDFGDVNSFVNVDPEGKFV	120
Pchinensis	LDSGVGIYAPDAEAYTLFAPLFDPIIEDYHVGFKQTDKHPNKDFGDVTSFVNVDPEGKYV *****:***** ***** *****:***** . *****:***	120
Cbellicosus	ISTRVRCGRSMEGYFPNCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGELKGTYPPLTGMTKDVQQK	180
Csapidus	ISTRVRCGRSMEGYFPNCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGELKGTYPPLTGMTKEVQQK	180
Sparamamosain	ISTRVRCGRSMEGYFPNCLTEAQYKEMESKVSSTLSNLEGELKGTYPPLTGMTKDVQQK	179
Lvannamei	ISTRVRCGRSLQGYFPNCLTESQYKEMEAKVSSTLSNLEGELKGTYPPLTGMTSKEVQQK	180
Pchinensis	ISTRVRCGRSMEGYFPNCLTEDQYKEMESKVSSTLSNLEGELKGTYPPLTGMTGKEVQQK *****:***** *****:***** *****:***** *:****	180
Cbellicosus	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDNKTFVWCNEEDHLRIISMOMGGDLG	240
Csapidus	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDNKTFVWCNEEDHLRIISMOMGGDLG	240
Sparamamosain	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPTGRGIYHNDNKTFVWCDEEDHLRIISMOMGGDLG	239
Lvannamei	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPAGRGIYHNDNKTFVWVNEEDHLRIISMOMGGDLG	240
Pchinensis	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRYWPSGRGIYHNDNKTFVWVNEEDHLRIISMOMGGDLG *****:***** *****:***** *****:***** *****:*****	240
Cbellicosus	QVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRLGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANREKLEEV	300
Csapidus	QVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRLGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANREKLEEV	300
Sparamamosain	QVYRRLVSAVNEIEKRVPFSSHDRLGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANREKLEEV	299
Lvannamei	QVFRRLTSAVNEIEKRIPFSSHDRLGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANREKLEEV	300
Pchinensis	QVFRRLTSAVNEIEKRIPFSSHDRLGFLTFCPTNLGTTVRASVHIKLPKLAANRDKLEEV *:***. *****:***** *****:***** *****:***** *****:*****	300
Cbellicosus	AGKYSLQVRGTRGEHTEAEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVKEMQDGILELIKIEKEMQ 357	
Csapidus	AGKYSLQVRGTRGEHTEAEGGVYDISNKRRMGLTEYQAVKEMQDGILELIKIEKEMQ 357	
Sparamamosain	AGKYSLQVRGTRGEHTEAEGGVYDISNKRRMGLTEFQAVKEMQDGILELIKIEKEMQ 356	
Lvannamei	AGKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMGLTEFQAVKEMQDGILELIKIEKEM- 356	
Pchinensis	AGKYNLQVRGTRGEHTEAEGGIYDISNKRRMGLTEFQAVKEMQDGILELIKIEKEM- 356 ***. *****:***** *****:***** *****:***** *****:*****	

Figura 15. Alineamiento secuencia de aminoácidos de la AK de *C. bellicosus* contra especies de crustáceos. Se muestra de color amarillo el sitio activo. Los asteriscos (*) representan los residuos similares entre secuencias, los dos puntos (:) cuando el cambio es conservativo, el punto (.) cuando el cambio es semi-conservativo y el espacio es cuando el cambio de residuo no es conservativo (No. acceso *C. sapidus*: AF233355.1; *S. paramamosain*: AFK25805.1, *L. vannamei*: Q004B5.1 y *P. chinensis*: AAV83993.1).

Estructura tridimensional teórica de la AK de *C. bellicosus*

El programa Phyre2 es uno de los servidores gratuitos en línea de predicción de estructuras más utilizados en el mundo. Permite utilizar diferentes herramientas informáticas para analizar estructuras, funciones y mutaciones de proteínas. A través de él se pueden construir modelos 3D teóricos por homología, permitiendo identificar los posibles sitios de unión a ligandos y evaluar el efecto de variantes de aminoácidos (Kelley y col., 2015). A partir de este programa, se analizó la secuencia deducida de 356 residuos de aminoácidos de la AK, obteniendo un total de 99 modelos de estructura similar a la nuestra, siendo la estructura cristalográfica del complejo arginina cinasa/creatina/ADP del cangrejo herradura del Atlántico, *Limulus polyphemus* el organismo con mayor porcentaje de identidad (77%) dentro de la base de datos PDB y con un nivel de confianza del 100%. Este último dato es de importancia, ya que valores >90% de confianza significa que el modelo generado por Phyre2 es confiable.

La estructura teórica de la AK de la jaiba café consta de un dominio pequeño N-terminal α -helicoidal y un dominio C-terminal grande que posee una hoja β antiparalela de ocho cadenas, la cual está rodeada por siete hélices α y su sitio activo putativo se localiza en Cys271-Thr277 (Figura 16a; Zhou y col., 1998). Como se observa en la Figura 16b, los plegamientos del modelo obtenido presentan alto grado de conservación en base a la sobreposición con la estructura de la AK del cangrejo herradura del Atlántico y esto se ve reflejado en la similitud en la secuencia primaria de ambas especies, ya que presentan 77 % de identidad (Figura 17). A comparación de esta enzima con su homólogo en vertebrados, la AK no termina con residuos de prolina-glicina en el extremo N-terminal, mientras que, en la CK, las moléculas de prolina limitan los cambios conformacionales y son los aminoácidos que terminan las hélices (Wang y col., 2013). El sitio de unión, lugar donde se lleva a cabo la transferencia reversible del fosfato, se encuentra en el dominio C-terminal en el cual se aloja un sustrato ATP o ADP y el dominio N-terminal interactúa con la arginina o fosfoarginina (Suzuki y col., 2000). Las interacciones dominio-dominio son importantes para la estructura y su función catalítica. Sin embargo, se desconoce la participación

de todos los residuos que se encuentran en el entrelazamiento de ambos dominios. Se ha sugerido que esta unión se da entre los residuos Asp62 y Arg193 ubicados en el N-terminal y C-terminal, respectivamente, proporcionando estabilidad a la enzima cuando se encuentra en una conformación cerrada (unida al sustrato) (Zhou y col., 1998; Suzuki y col., 2000; Yousef y col., 2003; Uda y Suzuki, 2004; Kenyon y col., 2012; Wu y col., 2012).

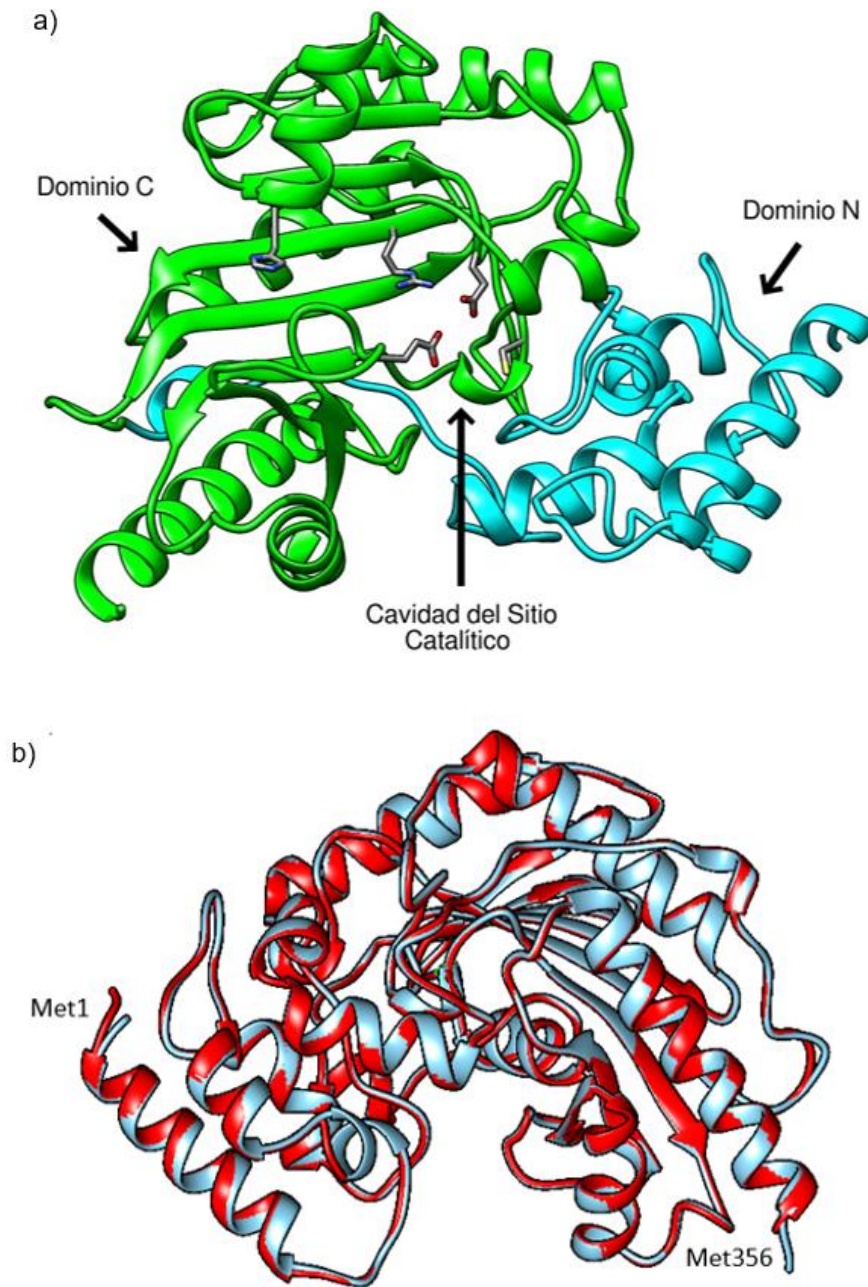


Figura 16. Modelo estructural tridimensional teórico de la AK. a) Modelo estructural teórico por homología de la arginina cinasa de la jaiba café, *C. bellicosus*. Se representa de color verde el dominio C y de azul el dominio N. Los aminoácidos del sitio catalítico se muestran en palos. b) Modelo de la estructura superpuesta de la AK de *C. bellicosus* (rojo) con la de *L. polyphemus* (azul; PDB: 1RL9).

Análisis bioinformático de los epítomos de unión a IgE de la arginina cinasa

La predicción de epítomos de células B permite identificar aquellas regiones alergénicas capaces de generar una respuesta inmunológica, con la finalidad de producir anticuerpos para la creación de vacunas o estudiar la estructura y función de estas (Sanchez-Trincado y col., 2017). El reconocimiento de las IgE por estas regiones se debe a su exposición con la superficie de la proteína y en la mayoría de los casos, estas se unen a residuos espacialmente plegados en la proteína, es decir a epítomos conformacionales (Larsen y col., 2006). Sin embargo, el 10% de los casos de reactividad cruzada, son ocasionados por la unión de anticuerpos a fragmentos de aminoácidos continuos (Pellequer y col., 1991). Por ello la predicción de epítomos se ha convertido en un estudio esencial al momento de evaluar la alergenicidad de alimentos y enfermedades.

En los últimos años se han desarrollado varios métodos computacionales para la predicción de epítomos de células B. Uno ejemplo de ellos es BepiPred 1.0, el cual es un servidor que predice la localización de los epítomos lineares de células B, utilizando una combinación del modelo oculto de Markov y métodos de escala de propensión, basándose en las propiedades fisicoquímicas, antigenicidad, hidrofilia, hidrofobicidad invertida, accesibilidad y el plegamiento de la estructura secundaria (Larsen y col., 2006). Por otro lado, Secret AAR es un programa gratuito en línea que permite identificar las regiones antigénicas que se encuentran presentes en una secuencia proteica por medio de BepiPred y así poder calcular la Abundancia de Regiones Antigénicas (AAR, por sus siglas en inglés) para estimar así la densidad antigénica de una proteína (Cornejo-Granados y col., 2018). Este valor se calcula entre la relación de la longitud de la secuencia y el número de epítomos identificados por BepiPred, considerándose como epítomo aquellos fragmentos de >6 aminoácidos de longitud. Un valor bajo significa que la proteína tiene mayor densidad de epítomos, es decir, más regiones antigénicas (Cornejo-Granados y col., 2018). Para la predicción de epítomos conformacionales de células B, se encuentra disponible en línea el programa DiscoTope 2.0, el cual pronostica residuos discontinuos en base a la

estructura tridimensional de las proteínas. Estos son determinados a partir de la accesibilidad a los aminoácidos en la superficie y puntúa a los residuos según su propensión a tener contacto con los anticuerpos. Al final se combinan las puntuaciones de la propensión en cuestión a la proximidad espacial y los números de contacto (Kringelum y col., 2012).

A partir de los dos primeros programas, se llevó a cabo la predicción de los epítomos lineales a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de la AK. Se encontraron ocho posibles regiones alergénicas en la estructura de la AK de *C. bellicosus*: LI:40-45, LII:58-74, LIII: 91-104, LIV: 112-117, LV: 130-136, LVI: 145-151, LVII: 203-213 y LVIII: 312-325. El valor obtenido de AAR es de 44.74, indicando que la enzima presenta baja densidad antigénica. Empleando el modelo tridimensional generado de la arginina cinasa de *C. bellicosus*, se localizó la posición espacial de los epítomos lineales predichos (Figura 18). Se encontró que el epítomo II está al interior de la estructura de la AK, mientras que los demás epítomos están localizados en la superficie, por lo que los anticuerpos IgE tendrían una mayor accesibilidad de unión con la enzima hacia estos últimos. Los epítomos fueron comparados con los reportados en *S. paramamosain* (No. acceso: AFK25805.1), *L. vannamei* (No. acceso: Q004B5.1) y *P. chinensis* (No. acceso: AAV83993.1). Los epítomos LII, LIII, LV, LVI y LVIII de la jaiba café son los más conservados al compararlos con los reportados en las otras especies con una similitud de >50 % (Figura 19).

Con el programa DiscoTope 2.0 se predijeron 28 residuos discontinuos: 92, 94-98, 100-101, 103, 106, 108, 115-117, 172, 174-180, 183, 263, 293, 295, 317, 319-320 y 334. Estos fueron ubicados en el modelo tridimensional, encontrando siete posibles epítomos conformacionales (CI: 92, 94-98, 263; CII: 100-101, 103, 334; CIII: 106, 108; CIV: 115-117; CV: 172, 174-180, 183; CVI: 293, 295; CVII: 317, 319-320) y fueron comparados con los epítomos reportados en *P. clarkii* (No. acceso: AFA45339.1) y en *S. paramamosain*, obteniendo una similitud de >81 % (Figura 20 y 21). En los últimos años, se ha estudiado la composición de aminoácidos en las proteínas alergénicas para comprender la interacción con los anticuerpos. Se ha encontrado que los epítomos suelen estar conformados por aminoácidos polares y cargados, los cuales se localizan

normalmente en la superficie de la proteína (Rubinstein y col., 2008). Esto las predispone a la formación del complejo antígeno-anticuerpo, ya que las cadenas laterales de los aminoácidos se encuentran expuestas, favoreciendo así la unión con anticuerpos (Rubinstein y col., 2008). También se ha sugerido que la tirosina (Y) se encuentra abundantemente en regiones alergénicas y, con escasos, los aminoácidos alifáticos hidrofóbicos (Rubinstein y col., 2008). Esto concuerda con los epítomos predichos para la AK de la jaiba café, conteniendo en su mayoría residuos de lisina (K) y glutamina (Q), los cuales son aminoácidos polares y, ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), que son aminoácidos cargados negativamente. En cuanto a los aminoácidos aromáticos (a excepción de la tirosina) y alifáticos, estos aparecen con menor frecuencia. Asimismo, varios autores han reportado que los epítomos se encuentran constantemente en los lazos de la estructura secundaria de las proteínas, dado que estas son regiones flexibles y están expuestas en la superficie de la molécula (Janine y Chothia, 1990; Reimer, 2009, Zhao y col., 2012). Los epítomos LVI y LVII se encuentran como hélice α y hoja β , respectivamente, mientras que los epítomos restantes se ubican en lazos, coincidiendo con lo anterior.

Los métodos de predicción de epítomos de células B son herramientas que pronostican epítomos altamente significativos (Kringelum y col., 2012). Con estos resultados, se puede inferir que los epítomos predichos podrían llegar a ser los responsables de la inducción de una respuesta alergénica por el consumo y/o contacto con la jaiba café y una reacción cruzada con otros crustáceos. Para confirmar esto, sería necesario sintetizar péptidos de cada uno de los epítomos predichos y llevar a cabo los ensayos de inmunodetección correspondientes.

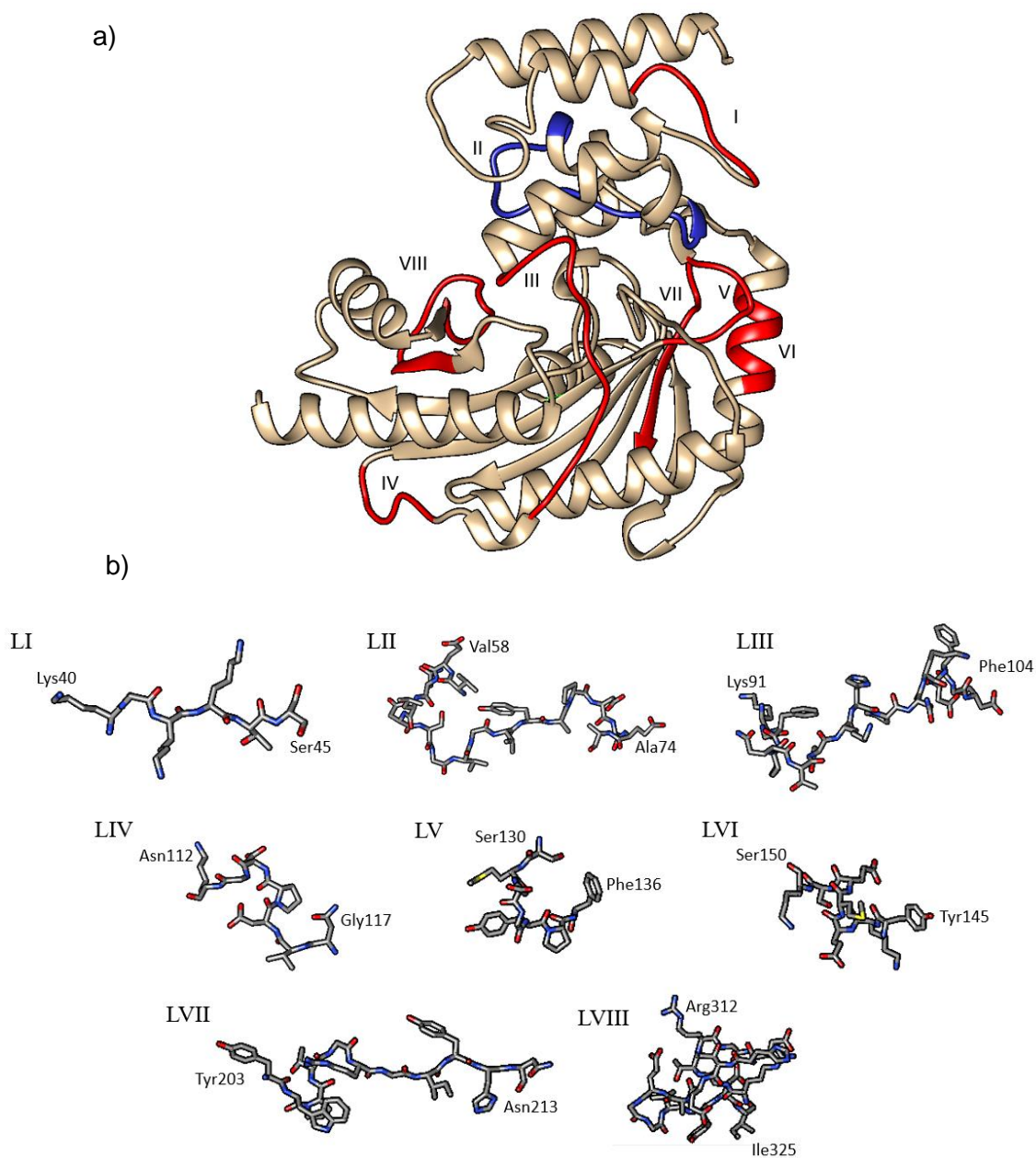


Figura 18. Predicción computacional de epítomos lineales de la AK de *C. bellicosus*. a) Modelo estructural tridimensional de la predicción de epítomos lineales de la arginina cinasa de la jaiba café, *C. bellicosus*. Se representan en color rojo las siete regiones antigénicas de superficie y de azul la interna (II). b) Estructura de los ocho epítomos lineales mostrados por separado con palos. Se marcan de color rojo los átomos de oxígeno, de azul los de nitrógeno y de amarillo los de azufre.

		I	II					
Cbellicosus	MAEAATIAKLEEGFKKLEAATDCKSLLKKYLTKSVDQL	KGKKT	SLGATLLDVIQSG	VEN 60				
Sparamamosain	MADAATIAKLEEGFKKLEAATDCKSLLKKYLTKSVDQL	KGKKT	SLGATLLDVIQS	-VEN 59				
Lvannamei	MADAAVIEKLEAGFKKLEAATDCKSLLKKYLTKEVFDKLDK		RTSLGATLLDVIQSG	VEN 60				
Pchinensis	MADAAVIEKLEAGFKKLEAATDCKSLLKKYLTKA	VFDQLKDKKTS	SLGATLLDVI	QSGVEN 60				
	.*.* ** * *** **:*.*:***** **							
	II	III	IV					
Cbellicosus	LDSGVGVYAPDAEA	YTLFAPLFDPIIEDYH	KGFKQTDKHPNKDFGD	VNQFVNVDPDGK 120				
Sparamamosain	LDSGVGVYAPDAEA	YTLFAPLFDPIIEDYH	KGFKQTDKHPNKDFGD	VNQFVNVDPDGK 119				
Lvannamei	LDS	GVGIYAPDAEA	YTLFAPLFDPIIEDYH	GVGFKQTDKHPNKDFGD	VNSFVNVDPDGK 120			
Pchinensis	LDSGVGIYAPDAEA	YTLFAPLFDPIIEDYH	GVGFKQTDKHPNKDFGD	VTSFVNVDPDGKYV 120				
	*****:***** *****:*****:*****:***							
	V	VI						
Cbellicosus	ISTRVRCGR	SMEGY	PNPCLTEAQ	YKEMESK	VSSSTLSNLEGELKGTYP	PLTGMTKDVQ 180		
Sparamamosain	ISTRVRCGR	SMEGY	PNPCLTEAQ	YKEMESK	VSSSTLSNLEGELKGTYP	PLTGMTKDVQ 179		
Lvannamei	ISTRVRCGR	SLQGY	PNPCLTESQ	YKEMEA	KVSS	TLSSLEGELKGTYP	PLTGMKSEV 180	
Pchinensis	IS	TRVRCGR	SMEGY	PNPCLTE	DQYKEMESK	VSS	TLSSLEGELKGTYP	PLTGMGKEV 180
	*****:***** *****:*****:*****:***							
	VII							
Cbellicosus	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRY	WP	TGRGI	YHNDNK	TFLVWCNEEDHLRI	ISMOMGGDLG 240		
Sparamamosain	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRY	WP	TGRGI	YHNDNK	TFLVWCDEEDHLRI	ISMOMGGDLG 239		
Lvannamei	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRY	WP	AG	RGI	YHNDNK	TFLVWVNEEDHLRI	ISMOMGGDLG 240	
Pchinensis	LIDDHFLFKEGDRFLQAANACRY	WP	SG	RGI	YHNDNK	TFLVWVNEEDHLRI	ISMOMGGDLG 240	
	*****:***** *****:*****:*****:***							
Cbellicosus	QVYRRLVSAVNEIE	KRV	PFSHHDRLG	FLTF	CPTNLGTT	VRASVHIKLPKLAANREK	LEEV 300	
Sparamamosain	QVYRRLVSAVNEIE	KRV	PFSHHDRLG	FLTF	CPTNLGTT	VRASVHIKLPKLAANREK	LEEV 299	
Lvannamei	QVFRRLTSAVNEIE	I	RIPFSHHDRLG	FLTF	CPTNLGTT	VRASVHIKLPKLAANREK	LEEV 300	
Pchinensis	QVFRRLTSAVNEIE	KRI	PFSHHDRLG	FLTF	CPTNLGTT	VRASVHIKLPKLAANRD	KLEEV 300	
	:*.* ***:*****:*****:***							
	VIII							
Cbellicosus	AGKYSLQV	R	TRGEHTEA	E	GGVYDI	SNKRRMGLTEYQAVKEMQ	DGILELIKIEKEMQ 357	
Sparamamosain	AGKYSLQVR	G	TRGEHTEA	E	GGVYDI	SNKRRMGLTEFQAVKEMQ	DGILELIKIEKEMQ 356	
Lvannamei	AGKYNLQVR	G	TRGEHTEA	E	GGIYDI	SNKRRMGLTEFQAVKEMQ	DGILELIKIEKEM- 356	
Pchinensis	AGKYNLQVR	G	TRGEHTEA	E	GGIYDI	SNKRRMGLTEFQAVKEMQ	DGILELIKIEKEM- 356	
	.**:*****:*****:***							

Figura 19. Comparación y alineamiento de los epítomos lineales predichos de la AK de *C. bellicosus* contra las de otras especies de crustáceos. Los asteriscos (*) representan los residuos similares entre secuencias, los dos puntos (:) cuando el cambio es conservativo, el punto (.) cuando el cambio es semi-conservativo y el espacio es cuando el cambio de residuo no es conservativo. Se marcan de color amarillo los epítomos predichos de la AK de la jaiba café, de gris las de *S. paramamosain*, de verde las de *L. vannamei* y de azul las de *P. chinensis*. LI-LVIII, representan los siete epítomos conformacionales predichos en la Figura 20a (No. acceso *C. sapidus*: AF233355.1; *S. paramamosain*: AFK25805.1, *L. vannamei*: Q004B5.1 y *P. chinensis*: AAV83993.1).

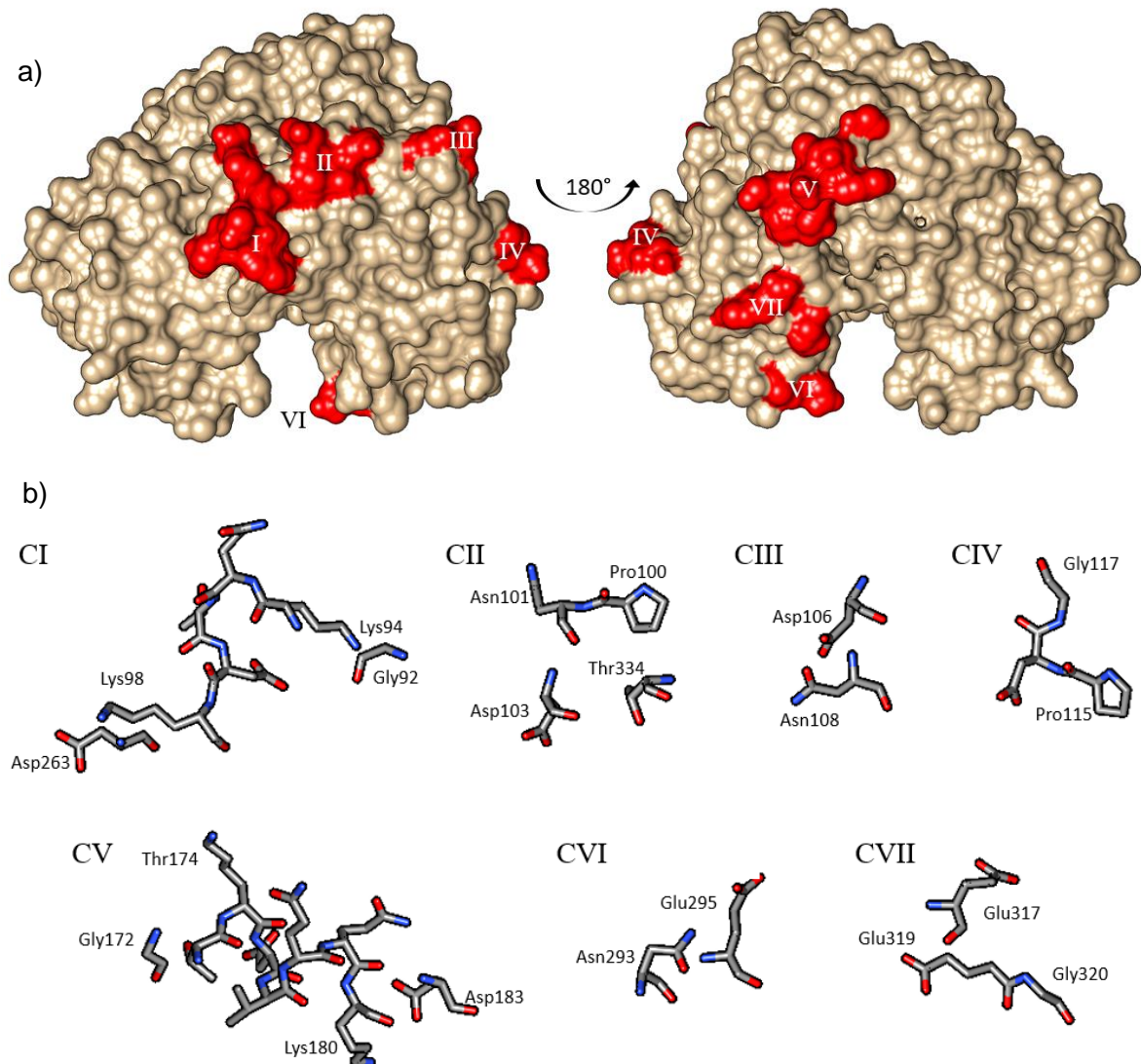


Figura 20. Predicción computacional de epítomos conformacionales de la AK de *C. bellicosus*. a) Modelo estructural tridimensional de la predicción de epítomos conformacionales de la arginina cinasa de la jaiba café, *C. bellicosus*. Se representan en color azul las siete regiones antigénicas pronosticadas. b) Estructura de los ocho epítomos conformacionales mostrados por separado con palos. Se marcan de color rojo los átomos de oxígeno, de azul los de nitrógeno y de amarillo los de azufre.

CONCLUSIONES

Se logró purificar e identificar a la AK de la jaiba como una proteína alergénica en sueros de pacientes alérgicos, a través de ensayos *in vitro* en condiciones nativas y desnaturalizantes. Por otro lado, se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del ADNc y de aminoácidos de la AK de *C. bellicosus*, las cuales no se encuentran reportadas y presentan gran similitud con *C. sapidus* y otras especies de crustáceos.

Por medio de programas bioinformáticos, se predijeron ocho epítomos lineales y siete epítomos conformacionales de la secuencia deducida de la AK de la jaiba café, de los cuales LII, LIII, LV, LVI, LVIII, CI, CII, CIII, CIV y CV son conservados entre especies, sugiriendo que podría generar reacciones alérgicas cruzadas.

RECOMENDACIONES

Sintetizar péptidos de los epítomos predichos de la AK y realizar ensayos *in vitro* con sueros de pacientes alérgicos, para confirmar su alergenicidad.

Estudiar el efecto alergénico del músculo de la jaiba café después de ser tratada térmicamente.

Caracterizar bioquímica y estructuralmente a la arginina cinasa de la jaiba café.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. (2003). *Inmunología celular y molecular*. 5ª edición. Elsevier, Estados Unidos.

Arzola-González JF, Flores-Campaña LM, Vázquez-Cervantes A. (2010). Crustáceos decápodos intermareales de las islas de la costa de Sinaloa, México. *Universidad y ciencia*, 26(2), 179-193.

Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Strachan DP, Williams H. The ISAAC Phase Three Study Group. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet*, 368(9537), 733-743.

Ayuso R, Sánchez-García S, Lin J, Fu Z, Ibáñez MD, Carrillo T, Blanco C, Goldis M, Bardina L, Sastre J. (2010). Greater epitope recognition of shrimp allergens by children than by adults suggests that shrimp sensitization decreases with age. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. 125 (6), 1286–1293 e1283.

Bannon GA. (2004). What makes a food protein an allergen?. *Current Allergy and Asthma Reports*, 4(1), 43-46.

Bauermeister K, Wangorsch A, Garoffo LP, Reuter A, Conti A, Taylor SL, Lidholm J, DeWitt AM, Enrique E, Vieths S, Holzhauser T. (2011). Generation of a comprehensive panel of crustacean allergens from the North Sea Shrimp, *Crangon crangon*. *Molecular immunology*, 48(15-16), 1983-1992.

Bessman SP, Carpenter CL. (1985). The creatine–creatine phosphate energy shuttle. *Annual Review of Biochemistry*. 54, 831–862.

- Bradford MM. (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.
- Brown AE, France RM, Grossman SH. (2004). Purification and characterization of arginine kinase from the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 56(2), 51-60.
- Brunelle JL, Green R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press.
- Burney P, Summers C, Chinn S, Hooper R, van Ree R, Lidholm J. (2010). Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* 65 (9), 1182–1188.
- Chen HL, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Mao HY, Liu GM. (2013). Purification and characterisation of sarcoplasmic calcium-binding protein, a novel allergen of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food chemistry*, 139(1-4), 213-223.
- Chen HL., Mao HY, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Zhang YX, Liu GM. (2013). Purification, physicochemical and immunological characterization of arginine kinase, an allergen of crayfish (*Procambarus clarkii*). *Food and chemical toxicology*, 62, 475-484.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159p.
- Cisneros-Mata MÁ, Apolinar-Romo AA, López-Ruíz CP, Rodríguez-Félix D, Paredes-Acuña AG, Gastélum-Mendoza FI. (2014). Primera estimación de abundancia de jaiba café (*Callinectes bellicosus*) por marcado-recaptura en el Canal del Infiernillo, Sonora, México. México. Mem. VII Foro Científico de Pesca Ribereña. Mazatlán, Sinaloa, México. Agosto, 26-28.

CONAPESCA. Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura. (2013). Anuario estadístico de acuicultura y pesca. Disponible en: www.gob.mx/conapesca. (Fecha de acceso: 14 de Septiembre de 2018).

CONAPESCA. Comisión Nacional de Pesca y Acuicultura (2017). Disponible en: www.campomexicano.gob.mx. (Fecha de acceso: 14 de Septiembre de 2018).

Cornejo-Granados F, Hurtado-Ramírez JM, Hernández-Pando R, Ochoa-Leyva A. (2019). Secret-AAR: a web server to assess the antigenic density of proteins and homology search against bacterial and parasite secretome proteins. *Genomics*, 111(6), 1514-1516.

Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. (1994). Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *International archives of allergy and immunology*, 105(1), 49-55.

DOF. Diario Oficial de la Federación. (2006). Norma Oficial Mexicana NOM-039-PESC-2003, Pesca responsable de jaiba en aguas de jurisdicción federal del litoral del Océano Pacífico. Especificaciones para su aprovechamiento. Disponible en: www.conapesca.gob.mx (Fecha de acceso: 14 de Octubre de 2018).

Douglas SA., Ao Z, Johns DG, Maniscalco K, Willette RN, Sarov-Blat L, Cogswell JP, Seepersaud S, Murdock P, Steplewski KM, Patel L. (2005). Quantitative Analysis of Orphan G Protein-Coupled Receptor mRNAs by TaqMan® Real-Time PCR. In Receptor Binding Techniques. *Humana Press*. 27-49p.

Ellington WR. (2001). Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annual review of physiology*, 63(1), 289-325.

Ellington WR, Hines AC. (1991). Mitochondrial activities of phosphagen kinases are not widely distributed in the invertebrates. *The Biological Bulletin*, 180(3), 505-507.

Escamilla-Montes MR. (1998). Aspectos de la biología de jaibas del género *Callinectes* en el estero El Conchalito, Ensenada de La Paz, B.C.S. Tesis de Maestría, Centro

Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S., México, 96 pp.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010). Yearbook of fishery and aquaculture statistics. 2010. Disponible en: www.fao.org

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.

García-Orozco KD, Aispuro-Hernández E, Yepiz-Plascencia G, Calderón-de-la-Barca AM, Sotelo-Mundo RR. (2007). Molecular characterization of arginine kinase, an allergen from the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International archives of allergy and immunology*, 144(1), 23-28.

Giuffrida MG, Villalta D, Mistrello G, Amato S, Asero R. (2014). Shrimp allergy beyond Tropomyosin in Italy: clinical relevance of Arginine Kinase, Sarcoplasmic calcium binding protein and Hemocyanin. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 46 (5), 172–177.

Hernández-Flores JM. (2014). Caracterización bioquímica de la arginina cinasa del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei* y su participación en la fosforilación de nucleótidos. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.

Huang Y, Wu D, Li Y, Chen Q, Zhao Y. (2020). Characterization and expression of arginine kinase 2 from *Macrobrachium nipponense* in response to salinity stress. *Developmental & Comparative Immunology*, 113, 103804.

Janine J, Chothia C. (1990). The structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Biological Chemistry*, 265(27), 16027-16030.

Jarilla BR, Uda K, Suzuki T, Acosta LP, Urabe M, Agatsuma T. (2014). Characterization of arginine kinase from the caenogastropod *Semisulcospira libertina*, an intermediate host of *Paragonimus westermani*. *Journal of Molluscan Studies*, 80(4), 444-451.

Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, 10(6), 845-858.

Kenyon CP, Roth RL, van der Westhuyzen CW, Parkinson CJ. (2012). Conserved phosphoryl transfer mechanisms within kinase families and the role of the C8 proton of ATP in the activation of phosphoryl transfer. *BMC research notes*, 5(1), 131.

Knowles JR. (1991). To build an enzyme. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 332(1263), 115-121.

Koshland DE. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(2), 98-104.

Koshland DE. (1995). The key–lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International*, Edition in English, 33(23-24), 2375-2378.

Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. (2012). Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. *PLOS Computational Biology*, 8(12), e1002829.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.

Larsen JEP, Lund O, Nielsen M. (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, 2(1), 2.

Leung PS, Chen YC, Gershwin ME, Wong SH., Kwan HS, Chu KH. (1998). Identification and molecular characterization of *Charybdis feriatus* tropomyosin, the major crab allergen. *Journal of allergy and clinical immunology*, 102(5), 847-852.

Liang Y, Cao M, Su W, Zhang L, Huang Y, Liu, G. (2008). Identification and characterisation of the major allergen of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Food Chemistry* 111: 998-1003.

Lin J, Sampson, HA. (2009). The role of immunoglobulin E-binding epitopes in the characterization of food allergy. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 9(4), 357-363.

Lopata AL, Zinn C, Potter PC. (1997). Characteristics of hypersensitivity reactions and identification of a unique 49 kd IgE-binding protein (Hal-m-1) in abalone (*Haliotis midae*). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 100(5):642–648.

Lopata AL, Kleine-Tebbe J, Kamath SD. (2016). Allergens and molecular diagnostics of shellfish allergy. *Allergo Journal*, 25(7), 24-32.

López-Martínez J, López-Herrera L, Valdez-Holguín JE, Rábago-Quiroz CH. (2014). Dinámica poblacional de jaibas *Callinectes* (Portunidae) componentes de la fauna de acompañamiento del camarón en la costa oriental del Golfo de California. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(1), 17-29.

López-Zavala AA, García-Orozco KD, Carrasco-Miranda JS, Sugich-Miranda R, Velázquez-Contreras EF, Criscitiello MF, Brieba LG, Rudiño-Piñera E, Sotelo-Mundo RR. (2013). Crystal structure of shrimp arginine kinase in binary complex with arginine—a molecular view of the phosphagen precursor binding to the enzyme. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 45(6), 511-518.

Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB (2000). Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(1), 99-107.

Macías-Iglesias EM. (2018). Alergia a los alimentos. *Pediatría Integral*, 87.

Mao HY, Cao, MJ, Maleki SJ, Cai QF, Su WJ, Yang Y, Liu GM. (2013). Structural characterization and IgE epitope analysis of arginine kinase from *Scylla paramamosain*. *Molecular immunology*, 56(4), 463-470.

Matricardi PM. (2014). The allergy epidemic. *Berlin: Global Atlas of Allergy*, 112-114.

Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, Aalberse RC, Agache I, Asero R, Ballmer-Weber B, Barber D, Beyer K, ..., Ollert M. (2016). EAACI molecular allergology user's guide. *Pediatric Allergy and Immunology*, 27, 1-250.

Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. (2015). Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International*, 64(4), 332-343.

Medina-Hernández A, Huerta-Hernández RE, Góngora-Meléndez MA, Domínguez-Silva MG, Mendoza-Hernández DA, Romero-Tapia SJ, Iduñate-Palacios F, Cisneros-Rivero MG, Covarrubias-Carrillo RM, Juan-Pineda MA, Zárate-Hernández MC. (2015). Perfil clínico-epidemiológico de pacientes con sospecha de alergia alimentaria en México. Estudio Mexipreval. *Revista Alergia México*, 62:28-40.

Moonesinghe H, Mackenzie H, Venter C, Kilburn S, Turner P, Weir K, Dean T. (2016). Prevalence of fish and shellfish allergy: a systematic review. *Annual Allergy Asthma Immunology* 117 (3), 264–272 e264.

Morrison JF, James E. (1965). The mechanism of the reaction catalysed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochemical Journal*, 97(1), 37-52.

Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. (2004). RNA integrity number (RIN)–standardization of RNA quality control. *Agilent Application Note*, 1-8p.

Múnera M, Gómez L, Puerta L. (2013). El camarón como una fuente de alérgenos. *Biomédica*, 33(2), 306-318.

Pascal M, Grishina G, Yang AC, Sánchez-García S, Lin J, Towle D, Ibanez MD, Sastre J, Sampson HA, Ayuso R. (2015). Molecular diagnosis of shrimp allergy: efficiency of several allergens to predict clinical reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology. Practice* 3 (4), 521-529 e510.

Pellequer JL, Westhof E, Van Regenmortel MHV. (1991). [8] Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. In *Methods in enzymology* (Vol. 203, pp. 176-201). *Academic Press*.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.

Rahman AMA, Kamath S, Lopata AL, Helleur RJ. (2010). Analysis of the allergenic proteins in black tiger prawn (*Penaeus monodon*) and characterization of the major allergen tropomyosin using mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 24(16), 2462-2470.

Rahman AMA, Kamath SD, Lopata, AL, Robinson JJ, Helleur RJ. (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.

Rodríguez-Félix D, Cisneros-Mata MÁ, Aragón-Noriega EA, Arreola-Lizárraga JA. (2015). Talla de primera madurez de jaiba café *Callinectes bellicosus* en cinco zonas del Golfo de California. *Ciencia Pesquera*, 23, 5-14.

Ramírez-Félix E, López G, Náfate S. (2003). La pesquería de jaiba (*Callinectes spp.*) en el Pacífico Mexicano: diagnóstico y propuesta de regulación. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), Instituto Nacional de la Pesca, México, 48 p.

Rao Z, Kim SY, Li X, Kim DS, Kim YJ, Park JH. (2020). Insight into Structural Aspects of Histidine 284 of *Daphnia magna* Arginine Kinase. *Molecules and cells*, 43(9), 784.

Reimer U. (2009). Prediction of linear B-cell epitopes. In *Epitope Mapping Protocols* (pp. 335-344). *Humana Press*.

Rosmilah M, Shahnaz, M, Zailatul HM, 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.

Rubinstein ND, Mayrose I, Halperin D, Yekutieli D, Gershoni JM, Pupko T. (2008). Computational characterization of B-cell epitopes. *Molecular immunology*, 45(12), 3477-3489.

Ruethers T, Taki AC, Johnston EB, Nugraha R, Le TT, Kalic T, McLean TR, Kamath SD, Lopata AL. (2018). Seafood allergy: A comprehensive review of fish and shellfish allergens. *Molecular immunology*, 100:28-57.

Sampson HA. (1999). Food allergy. Part I: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103: 717-28

Samson KTR, Chen FH, Miura K, Odajima Y, Iikura Y, Rivas MN, Minoguchi K, Adachi M. (2004). IgE binding to raw and boiled shrimp proteins in atopic and nonatopic patients with adverse reactions to shrimp. *International archives of allergy and immunology*, 133(3), 225-232.

Sánchez JGR, Milla SP, Cortés BP, Plaza BL, López LMB, Gómez-Candela C. (2018). Una visión global de las reacciones adversas a alimentos: alergia e intolerancia alimentaria. *Nutrición Hospitalaria*, 35(4), 102-108.

Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. (2017). Fundamentals and methods for T-and B-cell epitope prediction. *Journal of immunology research*, 2017.

Shen Y, Cao MJ, Cai QF, Su WJ, Yu HL, Ruan WW, Liu GM. (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.

Shiomi K, Sato Y, Hamamoto S, Mita H, Shimakura K. (2008). Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *International archives of allergy and immunology*, 146(2), 91-98.

Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. (2004). Prevalence of seafood allergy in the United States determined by a random telephone survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1), 159-165.

Storey KB. (1977). Purification and characterization of arginine kinase from the mantle muscle of the squid, *Symplectoteuthis oualaniensis*: Role of the phosphagen/phosphagen kinase system in a highly aerobic muscle. *Archives of biochemistry and biophysics*, 179(2), 518-526.

Suzuki T, Fukuta H, Nagato H, Umekawa M. (2000). Arginine kinase from *Nautilus pompilius*, a living fossil site-directed mutagenesis studies on the role of amino acid residues in the guanidino specificity region. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23884-23890.

Szaniawska A. (2018). Crustaceans in the History of the Baltic Sea. In *Baltic Crustaceans*. Springer, Cham. 10p.

Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. (2005). Structural biology of allergens. *Current allergy and asthma reports*, 5(5), 388-393.

Thong BY, Cheng YK, Leong KP, Tang CY, Chang HH. (2007). Immediate food hypersensitivity among adults attending a clinical immunology/allergy centre in Singapore. *Singapore Medical Journal* 48(3): 236-240

Uda K, Suzuki T. (2004). Role of amino acid residues on the GS region of *Stichopus arginine kinase* and *Danio creatine kinase*. *The Protein Journal*, 23(1), 53-64.

Vasudevan DM., Sreekumari S. (2012). Texto de bioquímica para estudiantes de medicina. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. Nueva Delhi, India. 194-195p.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "phosphocreatine circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, 281(Pt 1), 21.

Wan KS, Yang W, Wu WF. (2010). A survey of serum specific-IgE to common allergens in primary school children of Taipei City. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 28(1): 1-6.

Wang WD, Wang JS, Shi YL, Zhang XC, Pan JC, Zou GL. (2013). Mutation of residue arginine 330 of arginine kinase results in the generation of the oxidized form more susceptible. *International journal of biological macromolecules*, 54, 238-243.

Wu QY, Li F, Zhu WJ, Wang XY. (2007). Cloning, expression, purification, and characterization of arginine kinase from *Locusta migratoria manilensis*. *Comparative*

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 148(4), 355-362.

Wu QY, Li F, Wang XY, Xu KL. (2012). Evidence that the amino acid residue Ile121 is involved in arginine kinase activity and structural stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 369-377.

Yadzir ZHM, Misnan R, Abdullah N, Bakhtiar F, Arip M, Murad S. (2012). Identification of the major allergen of *Macrobrachium rosenbergii* (giant freshwater prawn). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), 50-54.

Yang Y, Cao MJ, Alcocer M, Liu QM, Fei DX, Mao HY, Liu GM. (2015). Mapping and characterization of antigenic epitopes of arginine kinase of *Scylla paramamosain*. *Molecular Immunology*, 65(2), 310-320.

Yazawa Y. (1988). Purification and Characterization of Arginine Kinase from Scallop Smooth Muscle. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 64(6), 150-154.

Yousef MS, Clark SA, Pruetz PK, Somasundaram T, Ellington WR, Chapman MS. (2003). Induced fit in guanidino kinases—comparison of substrate-free and transition state analog structures of arginine kinase. *Protein Science*, 12(1), 103-111.

Zhao L, Wong L, Lu L, Hoi SC, Li J. (2012). B-cell epitope prediction through a graph model. In *BMC bioinformatics* (Vol. 13, No. 17, pp. 1-12).

Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, Parthasarathy G, Ellington WR, Chapman MS. (1998). Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8449-8454.

Zikorski ZE, Kolakowska A, Sun-Pan A. (1990). The nutritive composition of mayor groups of marine food organism. En: *Seafood: resources, nutritional composition and preservation*, CRC Press, Boca Raton. 29-54p.

ANEXO I



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora

Hermosillo, Sonora. 19 de junio de 2020.
Oficio No. CEI-UNISON 007/2020

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Departamento de Ciencias Químico Biológicas
Universidad de Sonora
Presente

ASUNTO: Dictamen CEI-UNISON

Por este medio, nos permitimos informarle que el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Sonora (CEI-UNISON) ha concluido la revisión del proyecto de investigación "Identificación de la arginina cinasa como alérgeno de la jaiba café (*Callinectes bellicosus*)", recibido en pleno el día 6 de marzo del año en curso, que usted envió solicitando la valoración ética correspondiente. En respuesta a su solicitud, el CEI-UNISON emite el siguiente:

DICTAMEN APROBADO

El CEI-UNISON considera que en la investigación propuesta hay riesgos mínimos para los participantes y que puede ejecutarse en los tiempos programados. Le solicitamos que informe al CEI-UNISON, en un plazo que no supere los 12 meses desde el comienzo del estudio, un resumen de los avances del proyecto, particularmente de los aspectos éticos correspondientes. Le solicitamos que cualquier adición al proyecto que involucre aspectos éticos sea informado a este Comité antes de proceder a su eventual implementación. Finalmente, le comunicamos que los datos de este proyecto no podrán ser utilizados para otro proyecto, a menos que el segundo proyecto sea evaluado y aprobado por el Comité.

Sin otro particular, aprovecho el medio para hacerle llegar un cordial saludo.

Atentamente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Aracely Angulo Molina", written over a horizontal line.

Dra. Aracely Angulo Molina
Presidenta del Comité de Ética
en Investigación de la Universidad de Sonora

C.c.p. Archivo CEI-UNISON

ANEXO II

Cuestionario sobre historial clínico

Nombre: _____ Edad: ____ Fecha: _____

1. ¿Tiene antecedentes familiares de alergias alimentarias? (especifique que miembro de su familia) _____

Indique que tipo de alergia: _____

2. ¿Ha presentado alergia a alguno de estos alimentos?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Jaiba/cangrejo | <input type="checkbox"/> Pulpo y/o calamar |
| <input type="checkbox"/> Camarón | <input type="checkbox"/> Otros |
| <input type="checkbox"/> Pescado | <input type="checkbox"/> Ninguno de los anteriores |

3. ¿Qué síntomas presentó durante la reacción alérgica?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Respiratorios (lagrimeo, mucosidad) | <input type="checkbox"/> Sistémicos (choque anafiláctico, dificultad para respirar) |
| <input type="checkbox"/> Cutáneos (ronchas, comezón) | |
| <input type="checkbox"/> Gastrointestinales (diarrea, vómito) | <input type="checkbox"/> Otros |

4. ¿Cuánto tiempo después de haber sido ingerido el alimento se presentaron los síntomas?

5. ¿El alimento estaba crudo o cocido? _____

6. ¿Cuándo fue la última vez que consumió algún marisco? _____

7. ¿Los síntomas se han repetido en exposiciones anteriores? _____

8. ¿Su alergia ha sido confirmada clínicamente? _____

9. ¿Toma algún antihistamínico o ha recibido algún tipo de inmunoterapia? ¿Con qué frecuencia?

10. ¿Presenta algún otro tipo de alergia? _____

11. ¿Está usted dispuesto (a) a participar en este estudio? _____

Firma