Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Ciencias Biológicas Departamento de Química

# Análisis de prolaminas en alimentos Desarrollos metodológicos y estudio del efecto del tratamiento térmico

**Tesis** Doctoral

Martín Rumbo



Año 1999

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos y la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas bajo la Dirección de la Dra. María Cristina Añón y la Codirección del Dr. Carlos Alberto Fossati.

### Agradecimientos

A mis Directores de Tesis, Cristina Añón y Alberto Fossati por haberme dado su apoyo en todo momento para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas porque gracias a las distintas becas que me otorgó pude contar con la dedicación necesaria para la realización de la Tesis.

Deseo agradecer muy especialmente a Fernando Chirdo, con quien compartimos largos días de laboratorio, porque siempre estuvo dispuesto a darme una mano en todo, por todo lo que aprendí de él, por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio, Gustavo Martínez, Marcos Civello, Silvana Petrucelli, Nora Martínez, Germán Jovanovich y Guillermo Docena, quienes siempre me ayudaron y me enseñaron con su experiencia.

A mis compañeros de los laboratorios de Vegetales, Proteínas e Inmunología, Paula, María, Federico, Norberto, Leticia, Mercedes, Analía C., Sonia, Ariel, Cecilia P., Sara, Adriana y Cachito, los que siempre tuvieron excelente disposición para colaborar en resolver cualquier inconveniente, para mantener funcionando el laboratorio de la mejor forma posible.

A Sergio Giorgieri, por su gran colaboración en el manejo de la electroforesis capilar y por todo lo que aprendí con él.

A Claudio Rosa y Anita Margheritis, por su gran compañerismo.

A los muchachos del taller, Vicente, el Tortu, Pablo, el Ruso, Oscar Fernandez y Sergio Torres y del laboratorio de electronica, Caffa, el Comandante y Néstor, a los que tuve que recurrir tantas veces para que me ayuden con las reparaciones de todo tipo de cosas.

A Aldo Campana, quien siempre se pudo hacer un rato para hacerme "una copia más" de alguna foto que necesitaba para ayer, o colaborar con tareas del funcionamiento del laboratorio.

A mis "vecinos", Mario y Néstor, que siempre pusieron una cuota de humor para matizar las tardes de trabajo.

A todos mis compañeros del CIDCA, que de distintas formas me enseñaron y me ayudaron en mi trabajo, con los que formamos "una gran familia".

Quiero agradecer muy especialmente a mis padres y mi familia de quienes siempre recibí todo el apoyo y a Grace, por todo el cariño y comprensión que siempre me brindó, por todos los almuerzos a cualquier hora que compartimos siempre y por todo lo que no se puede expresar con simples palabras...

# Los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido parcialmente publicados en los siguientes artículos:

\* Changes in structure and immunochemical reactivity on heat-treated ovalbumin. Rumbo M., Chirdo F.G., Fossati C.A. and Añón M.C. J Agric. Food Chem.44 (12): 3793-3798 (1996 Dec).

\* Influence of heat treatment of food on gliadin immuochemical detection. Rumbo M., Chirdo F.G., Fossati C.A. and Añón M.C. Food and Agric. Immunol. 8 (3): 195-203 (Septiembre 1996).

\* Immunoblotting of gliadins separated by acid PAGE (A-PAGE). Analysis of electrotransference conditions. Rumbo M., Chirdo F.G., Fossati C.A. and Añón M.C. Food and Agric. Immunol. 9 (2): 135-139 (Junio 1997)

\* Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin) in human serum, saliva, calostrum and milk. Rumbo M., Chirdo F.G., Añón M.C. and Fossati C.A. Clin. Exp. Immunol. 112 (1):453-458 (Junio de 1998).

\*Presence of high levels of non degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. F. G. Chirdo, M. Rumbo, M. C. Añón y C. A. Fossati. Scand. J. Gastr. 1998;33:1186-1192

\* Comparison of gliadin relative mobility in capillary electrophoresis and acidic PAGE. Rumbo M. and Giorgieri S. A. J. Capill. Electrophoresis. 1998; 5:39-44

\* Analysis of antigliadin antibodies by immunoblotting and ELISA using FPLCpurified gliadin as antigen. F. G. Chirdo, M. Rumbo, P. Carabajal, N. Castagnino, E. Mavromatopoulos, V. Cirincione, M. C. Añón y C. A. Fossati. J. Ped. Gastr. Nut. 1999; 29(2): 171-177.

\* Preparative fractionation of gliadins by electrophoresis at pH 3.1 (A-PAGE). Rumbo M., Chirdo F.G., Giorgieri S.A., Fossati C.A. and Añón M.C. J. Agric and Food Chem. 1999; 47(8): 3243-3247.

\* Analysis of anti-prolamin monoclonal antibodies reactivity using prolamin fractions purified by preparative electrophoresis. Rumbo M., Chirdo F.G., Añón M.C. and Fossati C.A. Food and Agric. Immunol. (en prensa).

\* Determination of anti-ω-gliadin antibodies in serological tests for coeliac disease detection. F. G. Chirdo, M. Rumbo, P. Carabajal, N. Castagnino, E. Mavromatopoulos, V. Cirincione, M. C. Añón y C. A. Fossati. Scand J. Gastr. (enviado, Septiembre 1999).

### INDICE

BREVE INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Características generales de la enfermedad celíaca	3
Mecanismo desencadenante de la enfermedad celíaca	4
Patologías asociadas a la enfermedad	7
Tratamiento de la enfermedad celíaca	8
Proteínas de reserva del grano de trigo: generalidades	9
Proteínas de reserva del grano de trigo: ubicación y función	10
Proteínas de reserva del grano de trigo: caracterización electroforética	11
Proteínas de reserva del grano de trigo: metodologías de purificación	12
Proteínas de reserva del grano de trigo: estudios estructurales y de biolo	gía
molecular	14
Proteínas de reserva de otros cereales	17
Toxicidad de las distintas proteínas de cereales en pacientes celíacos	22
Estudios de toxicidad empleando proteínas parcialmente digeridas	23
Estudios de toxicidad empleando péptidos sintéticos	23
Toxicidad de las prolaminas de avena	25
El papel de las proteínas tóxicas en alimentos	25
Normas internacionales para alimentos destinados a enfermos celíacos	27
Métodos de control de alimentos para celíacos	27
Inconvenientes introducidos por el tratamiento térmico	31
<b>OBJETIVOS GENERALES DE LA TESIS DOCTORAL</b>	32
PARTE I DESARROLLO DE METODOLOGIA DE UTILIDAD PARA	
EL ESTUDIO DE LA PROBLEMATICA DE LA ENFERMEDAD	
CELIACA Y SU TRATAMIENTO	34
Seccion I – Purificación de prolaminas empleando electroforesis	
preparativa	34
Introducción	34

Materiales y Métodos			
Resultados			
Conclusiones			
Seccion II - Análisis de prolaminas por electroforesis capilar	49		
Introducción			
Materiales y Métodos			
Resultados	52		
Optimización de las condiciones de separación	52		
Caracterización del perfil obtenido	54		
Empleo de electroforesis capilar en el análisis de			
cultivares de trigo	56		
Empleo de electroforesis capilar para la separación de			
Prolaminas de otros cereales	60		
Conclusiones	66		
Seccion III – Optimización de la electrotransferencia para la			
realización de inmunoblotting de geles de A-PAGE	67		
Introducción			
Materiales y Métodos	68		
Resultados	70		
Conclusiones	72		
PARTE II: CARACTERIZACION DE LA REACTIVIDAD DE			

## ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTIGLIADINA Y DESARROLLO DE METODOS DE CUANTIFICACION DE GLIADINAS EN ALIMENTOS

Introducción	73
Materiales y Métodos	74
Resultados	79
Caracterización de la reactividad	80
Optimización de ensayos de ELISA de captura empleando	
los distintos anticuerpos antigliadina	93
Conclusiones	97

## PARTE III: ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA CUANTIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA DE GLIADINAS

INTRODUCCIÓN GENERAL PARTE III	98
Sección I – Estudio en un sistema modelo: ovalbúmina	99
Introducción	99
Materiales y Métodos	100
Resultados	104
Calorimetría diferencial de barrido	104
Hidrofobicidad superficial	107
Sulfhidrilos expuestos	109
Reactividad inmunoquímica	111
Conclusiones	115
Sección II – El sistema gliadinas: estudios de calentamiento e	en fase
soluble	116
Introducción	116
Materiales y Métodos	118
Resultados	119
Conclusiones	128
Sección III – Ensayos de calentamiento sobre muestras mode	elo de
alimentos: masas y harinas	129
Introducción	129
Materiales y Métodos	130
Resultados	132
Conclusiones	143
XO I	144
CLUSIONES GENERALES	148
LIOGRAFÍA	152
схо п	173

## ABREVIATURAS

HLA	antígeno leucocitario humano				
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad				
IL-2	interleuquina 2				
IFN-γ	interferón gamma				
TcR	receptor de linfocito T				
CD8	"cluster" de diferenciación número 8				
CD4	"cluster" de diferenciación número 4				
AGA	anticuerpos antigliadina				
EMA	anticuerpos antiendomisio				
ELISA	ensayo de inmunoenzimático				
AcMo	anticuerpo monoclonal				
SDS	dodecilsulfato de sodio				
2-ME	2-mercaptoetanol				
HMW-glu	gluteninas de alto peso molecular				
LMW-glu	gluteninas de bajo peso moelcular				
Pro	prolina				
Gln	glutamina				
Phe	fenilalanina				
FPLC	cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad				
HPLC	cromatografia líquida de alta performance				
RP-HPLC	HPLC de fase reversa				
Enlace S-S	enlaces covalentes disulfuro				
TACC	trigo, avena, cebada y centeno				
MALDI	)I ionización-desorción asistida por la matriz y generada por excitaci				
	LASER				
OMS	Organización Mundial de la Salud				
HPMC	hidroxipropilmetilcelulosa				
DMSO	dimetilsulfóxido				
EDTA	ácido etilendiaminotetracético				
PAGE	electroforesis en geles de acrilamida				
A-PAGE	electroforesis en geles de acrilamida en buffer de pH ácido				
SDS-PAGE	electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS				
OVA	ovoalbúmina				
DSC	calorimetría diferencial de barrido				
DTNB	ácido 5,5'ditiobis(2- nitrobenzoico)				
ANS	ácido anilinonaftalensulfónico				

INTRODUCCIÓN GENERAL

#### **BREVE INTRODUCCION Y OBJETIVOS**

La enfermedad celíaca es una afección gastrointestinal crónica desencadenada en respuesta a la ingesta de prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena en individuos susceptibles. Las prolaminas son las proteínas del grano solubles en etanol acuoso e insolubles en soluciones salinas a pH neutro. La enfermedad celíaca se caracteriza por una alteración histológica de la mucosa del intestino delgado que conduce a la instalación de un cuadro de malabsorción que puede ir acompañado de manifestaciones extraintestinales diversas. Todas las anomalías patológicas pueden revertir si se instala una dieta libre de los componentes tóxicos. Esta conducta constituye el único tratamiento posible de la enfermedad al momento actual. La dieta debe ser estricta y de por vida, a fin de evitar alteraciones que, aunque muchas veces son subclínicas, conducen a complicaciones a largo plazo tales como linfomas intestinales, osteoporosis, trastornos endócrinos, etc. La realización efectiva de la dieta resulta problemática, dado que no solamente los alimentos que obviamente contienen los cereales tóxicos tales como panificados o pastas deben ser evitados. Muchos otros alimentos son adicionados con pequeñas cantidades de harina o almidón de trigo, por las propiedades que aportan al mejoramiento de los productos y también deben ser eliminados de la dieta de los pacientes celíacos. Para el control de alimentos destinados a estos pacientes se necesitan métodos analíticos capaces de reconocer en forma específica las prolaminas tóxicas en una matriz de suma complejidad como son los distintos alimentos. A su vez deben ser capaces de detectar muy bajas cantidades de dichas prolaminas, para poder dar certidumbre respecto de la inocuidad del alimento para los pacientes celíacos. Los métodos que reúnen estas condiciones y que actualmente se emplean a nivel mundial para el control alimentos destinados a pacientes celíacos son métodos inmunoquímicos. Estos métodos, que se basan en el empleo de anticuerpos específicos para las proteínas tóxicas, permiten el reconocimiento y cuantificación de las mismas sobre extractos del alimento a analizar. Contar con una metodología confiable de análisis de alimentos significa un gran avance en el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, no existe a nivel mundial un método universalmente aceptado, habiendo distintos sistemas de cuantificación en estudio. Muchos son los factores que pueden afectar la performance de los métodos de cuantificación, tales como la especificidad de los anticuerpos empleados, el sistema de extracción utilizado y las alteraciones estructurales que pudieran haber sufrido las prolaminas tóxicas durante el procesamiento del alimento.

En este trabajo de Tesis Doctoral se abordarán fundamentalmente estos aspectos de la metodología de cuantificación, con el objetivo de estudiar los efectos del calentamiento sobre la interacción antígeno-anticuerpo y la capacidad de detección de los sistemas analíticos empleados. Para cumplir estos objetivos a su vez se desarrollaron metodologías

de purificación y análisis de prolaminas. Se caracterizó la especificidad de los anticuerpos empleados en los ensayos de detección.

#### **INTRODUCCION GENERAL**

#### Características generales de la enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca es una entidad clínica que se describió hace más de cien años, tiempo durante el cual se han logrado avances importantes en su conocimiento, pero sin embargo, aún restan por esclarecer muchos aspectos de su patogénesis.

Hace más de cien años que Samuel Gee, publicó en 1888 la primer descripción detallada de lo que llamó "afección celíaca" y que caracterizó como una "indigestión crónica, presente en personas de edad variable, pero especialmente afecta a niños de 1 a 5 años de edad... los signos de la enfermedad se manifiestan en las heces, las que son blandas, pero no acuosas, pastosas y pálidas, ....el abdomen se presenta frecuentemente distendido y se acompaña de pérdida de peso..." (revisado por Walker Smith, 1988). Sin embargo, recién en 1950, en los trabajos de Dicke (Dicke, 1950; Dicke, Weijers y col 1953), se asoció la enfermedad a la ingesta de prolaminas. El concepto de enfermedad celíaca fue evolucionando constantemente desde entonces, al ritmo de distintos avances diagnósticos, estudios poblacionales mayores y de seguimiento de cohortes de pacientes y la aplicación de técnicas de investigación más poderosas. Con el mayor conocimiento de las diversas formas en que se puede manifestar la enfermedad se observó que existe una gran heterogeneidad en la presentación clínica de la misma, así como un alto grado de variación en la susceptibilidad individual frente a la ingesta de prolaminas tóxicas (Visakorpi, 1996). Actualmente las distintas formas de la enfermedad se clasifican dentro de tres grandes grupos: la enfermedad celíaca manifiesta, su forma silente y su forma latente (Tronccone, Greco y col. 1996).

La enfermedad celíaca manifiesta presenta síntomas floridos, tales como cuadro clínico profuso (diarrea crónica, pérdida de peso por malabsorción), alteraciones histológicas características en intestino y presencia de marcadores serológicos e histológicos característicos (Dinari, Branski y col. 1992). Las alteraciones histológicas típicas de la enfermedad consisten en una atrofia en las vellosidades intestinales y una hipertrofia de las criptas, con hiperproliferación celular. Este daño histológico tiene correlación con alteraciones funcionales de la mucosa intestinal que conducen a un cuadro de malabsorción. A su vez se observan alteraciones en las poblaciones celulares de la mucosa. Es característico de la mucosa atrófica de la enfermedad una infiltración linfocitaria en la lámina propia y un aumento de linfocitos intraepiteliales (Troncone, Maiuri y col. 1994). A su vez, es común observar la aparición de ciertos marcadores serológicos que se presentan con la enfermedad, como son la aparición de anticuerpos antigliadina, antiendomisio y antireticulina (Mäki, Hälstrom y col. 1994). Todas las alteraciones clínicas e histológicas remiten luego del retiro de gluten de la dieta.

La enfermedad celíaca silente se caracteriza por la ausencia de manifestaciones clínicas observables, sin embargo estos pacientes presentan una mucosa atrófica, con los infiltrados celulares característicos (Marsh 1993, Corazza, Valentini y col. 1992). Finalmente la condición de enfermedad celíaca latente se caracteriza por una desaparición temporaria de las distintas manifestaciones de la enfermedad. Es observada en casos en que habiendo presentado sintomatología y alteraciones histológicas características no presentan reactividad frente a posteriores ingestas de las prolaminas tóxicas. Sin embargo, un porcentaje significativo de estos pacientes presenta reaparición de la enfermedad luego de muchos años de dieta normal (Visakorpi, 1996).

#### Mecanismo desencadenante de la enfermedad celíaca

Hasta el momento se han manejado varias hipótesis sobre la causa de la enfermedad. Establecer el mecanismo desencadenante de la enfermedad es de importancia para poder identificar poblaciones de riesgo, plantear estrategias de protección para dichas poblaciones e incluso se podría llegar a determinar una estrategia terapéutica diferente. Un déficit enzimático a nivel del ribete en cepillo de los enterocitos fue planteado como un posible mecanismo desencadenante de la enfermedad (Frazer, Fletcher y col. 1953, Cordone, Gemme y col. 1975). La enzima deficitaria sería una proteasa específica que tendría entre sus sustratos a las distintas prolaminas tóxicas. La carencia de esta enzima podría dejar a las personas que no la posean expuestos a péptidos derivados de gluten que presentarían una acción tóxica *per se* que sería ejercida en forma directa sobre el enterocito y la mucosa intestinal. Esta hipótesis se vio sustentada en experiencias *in vitro* empleando digestos pepto-trípticos de prolaminas de trigo, en donde se observó toxicidad sobre cultivos de células derivadas de intestino. Sin embargo, nunca se pudieron caracterizar las enzimas faltantes y el efecto tóxico *in vitro* se observó sobre distintos cultivos celulares no relacionados con la enfermedad (Wieser 1996).

Weiser y Douglas (1976) sugirieron que la acción tóxica de las proteínas del gluten podría deberse a la unión de los componentes tóxicos a restos glucídicos de la superficie de células del tracto gastrointestinal. Las sustancias tóxicas actuarían como lectinas reconociendo específicamente un receptor celular y desencadenando así una acción tóxica selectiva. Hasta el momento no ha sido descripto dicho receptor, ni encontrado diferencias en las moléculas superficiales de células del epitelio intestinal entre enfermos celíacos y controles sanos.

También fueron planteadas distintas hipótesis de mímica molecular. Basándose en estudios de apareamiento de secuencias de distintas proteínas contra las prolaminas tóxicas, Kasarda (1996) observó que muchas proteínas de control de proliferación celular de distintos organismos eucariotes tenían homología parcial con secuencias típicas de

péptidos tóxicos de prolaminas. En particular se encontró homología con distintas tirosinquinasas de la familia Src que participan en distintos eventos de activación linfocitaria (Superti-Furga, 1995) y una homología débil con otras proteínas celulares tales como interleukina 2 murina (IL-2), Receptores del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (rFGF), etc. La absorción de péptidos con secuencias comunes con estas proteínas podría causar un desbalance en distintos sistemas de control homeostático y originar las alteraciones histológicas típicas de la enfermedad. La evidencia encontrada hasta el momento no alcanza a corroborar esta hipótesis. Además no se ha podido encontrar un rol clave en el establecimiento de la enfermedad para ninguna de las proteínas humanas anteriormente mencionadas. Por otra parte el modelo propuesto no explica la fuerte asociación encontrada entre ciertos haplotipos HLA y el desarrollo de la enfermedad (Marsh, 1992). Dentro de las hipótesis de desencadenamiento de la enfermedad por mímica molecular se encuentra la explicación propuesta por Kagnoff, Austin y col. (1984) quienes hallaron una homología entre un péptido derivado de gliadinas y una proteína de envoltura del enterovirus E1b, postulando que la infección por dicho enterovirus podría ser un factor desencadenante de la enfermedad, produciendo una respuesta inmune exacerbada frente a la ingesta de prolaminas de estructura similar a la de dicho enterovirus. Sin embargo estudios posteriores (Sturgess, Day y col., 1994) empleando péptidos sintéticos con la secuencia homóloga entre gliadina y enterovirus E1b para desafiar en forma local la mucosa duodenal de pacientes celíacos, no observaron reactividad cuando se desafiaba con el péptido en cuestión, mientras que sí había cambios al emplear otros péptidos derivados de gliadina para el mismo procedimiento.

Actualmente se acepta que el mecanismo patogénico de la enfermedad celíaca tiene un componente principal de naturaleza inmunológica e involucra una reacción inmune exacerbada contra las proteínas de los cereales nocivos (Marsh, 1993). Se determinó que más del 95% de los enfermos celíacos poseen el dímero de MHC clase II DQ2, formado por las cadenas DQA1\*0501 y DQB1\*0201, constituyendo la mayor asociación entre una enfermedad y un determinado haplotipo HLA detectada hasta el momento (Kagnoff, 1992). Por otra parte clones de linfocitos T de lesiones de mucosa intestinal de pacientes celíacos mostraron en su mayoría reconocimiento de péptidos derivados de gliadina, estando algunos restringidos por el alelo DQ (α1\*0501, β1 \*0201) (Lundin, Scott y col. 1993; Lundin, Sollid y col. 1990; Gjertsen, Lundin y col. 1994). Por otra parte, se han detectado en estudios in vivo aumento en la síntesis de ARNm de distintas citoquinas proinflamatorias como interferón y (IFN-y), IL-2, etc., cuando se desafía la mucosa duodenal de pacientes celíacos con péptidos derivados de gliadinas. Los mismos resultados se han obtenido empleando péptidos sintéticos de secuencias similar a distintas regiones de las gliadinas. Además se observan cambios característicos en las subpoblaciones linfocitarias de la mucosa intestinal durante la formación de la lesión en la mucosa, incluso pocas horas después del desafio con prolaminas tóxicas (Marsh, Loft y col. 1994). Hay un aumento característico de los linfocitos T intraepiteliales portadores del receptor T (TcR)  $\gamma/\delta$  y también se observa un aumento de los linfocitos intraepiteliales T CD8+ TcR  $\alpha\beta$ + (Cerf-Bensussan, Cuenod-Jabri y col. 1996). Por otra parte, en la lámina propia de la mucosa intestinal se observa un aumento linfocitario a expensas de la población T CD4+ TcR $\alpha/\beta$ + (Halstensein y Brandtzaeg 1993). Todos estos hallazgos sugieren que se monta una respuesta celular específica contra péptidos derivados de las prolaminas a nivel de la mucosa intestinal como uno de los eventos precipitantes de la enfermedad (Troncone, Maiuri y col 1994).

Esta hipótesis permite explicar la fuerte asociación de la enfermedad con los alelos de MHC, así como el aumento de las poblaciones linfocitaros en las lesiones. Por otro lado abre una serie de perspectivas de conocimiento de la enfermedad, permitiendo por ejemplo conocer el perfil de péptidos derivados de gliadina capaces de unirse al alelo DQ2, deduciendo los motivos estructurales que debe presentar un péptido para una fuerte unión a este alelo de MHC. A su vez posibilitará la identificación de las secuencias específicas que desencadenan la enfermedad mediante análisis de activación de clones T derivados de pacientes en ensayos *in vitro* (Sollid, Lundin y col. 1996). Sin embargo hay otros factores – genéticos y/o ambientales- hasta el momento desconocidos que influyen en el desarrollo de la enfermedad, ya que en poblaciones sanas se puede encontrar hasta un 30% de individuos DQ2, siendo un porcentaje muy bajo el que desarrolla la enfermedad (Partanen 1996) y por otra parte sólo una baja proporción de hermanos (menos del 10%) que comparten este alelo desarrollan la enfermedad.

Un aspecto importante de la enfermedad, debido a que ha sido explotado como herramienta diagnóstica, es la presencia de anticuerpos específicos de la misma en pacientes no tratados (Mäki, 1992). Se observa una respuesta inmune aumentada frente a gliadinas de tipo IgG e IgA, evidenciable por ELISA indirecto (Corazza, Valentini y col. 1992). La determinación de anticuerpos séricos antigliadina (AGA) se emplea como prueba orientativa, siendo el diagnóstico de enfermedad celíaca confirmado por medio de una biopsia intestinal. Los anticuerpos AGA disminuyen con la dieta libre de gluten con la que se trata a los pacientes celíacos y puede emplearse incluso como control de incumplimiento de la misma (Bode, Weile y col., 1993). Mediante inmunofluorescencia sobre cortes de esófago de mono se puede poner en evidencia la presencia de otro tipo de anticuerpos séricos específicos de la enfermedad celíaca, los anticuerpos anti-endomisio (EMA) (Ferreira, Davies y col. 1992). Esta determinación tiene una muy buena eficiencia diagnóstica de la enfermedad (Cataldo, Ventura y col., 1995), pero dadas las características técnicas de la prueba de inmunofluorescencia, es dificil de aplicarla en estudios poblacionales de gran escala. La determinación de EMA también se puede realizar sobre cortes de cordón umbilical humano, permitiendo disminuir los costos de la misma y evitar el problema ético asociado a la obtención de los cortes de esófago de mono. Recientemente ha sido descripta la transglutaminasa tisular como el principal autoantígeno reconocido por la determinación de EMA (Dieterich, Ehnis y col., 1997), siendo posible la realización de ensayos serológicos por ELISA empleando este antígeno con fines diagnósticos (Dieterich, Laag y col., 1998).

#### Patologías asociadas a EC

Una de las características salientes de la enfermedad celíaca es su marcada heterogeneidad (Dinari, Branski y col., 1992), existiendo un espectro de casos desde aparición de sintomatología gastrointestinal evidente frente a ingestas de muy bajas cantidades de gliadina hasta casos de enfermedad latente (Howdle, 1992). La distribución de casos es difícil de determinar. En nuestro medio no se han llevado a cabo estudios de "screening" masivo de la enfermedad por lo que el número de enfermos con formas latentes de la enfermedad no puede ser precisado. Se acepta que la distribución de casos es similar a la determinada en poblaciones europeas, de características genéticas comparables. Estudios poblacionales multicéntricos europeos (Catassi, Ratsch y col., 1996) han determinado una relación aproximada de 7 a 1 para los casos latentes o silentes respecto a los de manifestaciones clínicas evidentes. Esto ha llevado al desarrollo del concepto de iceberg (Catassi, Ratsch y col., 1994), coincidiendo en que sólo se manifiestan y detectan una baja proproción del total de casos de enfermedad. Esto significa que una gran parte de la población celíaca no es diagnosticada, exponiéndose a la ingesta continua de las prolaminas tóxicas y por lo tanto con altas probabilidades de desarrollar las patologías asociadas y complicaciones a largo plazo que presenta la enfermedad.

Así como existe un arco de posibles formas de la enfermedad, también hay una gran variedad de trastornos asociados a la misma que pueden presentarse en distintas situaciones (Branski, Askenazi y col. 1992). Estas patologías asociadas pueden ser clasificadas en malignas y no malignas (Renuala, Collin y col., 1996). En estudios de seguimiento de grupos de pacientes celíacos se ha detectado una mayor incidencia de enfermedades proliferativas malignas, entre las que se destacan linfomas intestinales y carcinomas asociados a distintos tejidos, principalmente del tracto digestivo (Holmes, 1997a). Es difícil precisar, por distintos motivos, la frecuencia de aparición de dichas complicaciones en la población celíaca. La prevalencia de enfermedad celíaca en una población es difícil de determinar dado que muchos pacientes silentes o latentes nunca serán diagnosticados debido a la falta de sintomatología clínica que aliente a la búsqueda de la enfermedad. Por otro lado, en muchos casos no se puede determinar la presencia de enfermedad maligna y a su vez muchos casos de linfomas intestinales pueden tener su origen en una enfermedad celíaca no diagnosticada (Holmes, 1998). A su vez hay una

influencia clara de la dieta en el desarrollo de estas complicaciones. Los resultados de seguimiento de distintos grupos de pacientes arrojaron una prevalencia de 3-11% para todos los tipos de complicaciones malignas en pacientes celíacos, siendo una tasa claramente superior a la observada en poblaciones control (Selby y Gallagher 1979; Collin, Renuala y col., 1994; Nielsen, Jacobsen y col., 1995).

Las alteraciones no malignas asociadas son más frecuentes que las malignas, siendo muchas de ellas causadas por los eventos de malabsorción intestinal propios de la enfermedad tales como retrasos en el crecimiento (Holmes 1996). Muchas otras alteraciones no se asocian claramente a dicho cuadro de malabsorción, presentándose en pacientes con escasa sintomatología intestinal, tales como infertilidad, menopausia temprana, alteraciones endócrinas, alteraciones en el metabolismo del calcio y osteoporosis, alteraciones neurológicas, epilepsia y depresión (Collin, Renuala y col. 1994; Branski, Ashkenazi y col. 1992; Holmes, 1996; Corazza, Biagi y col., 1996; Collin, Renuala y col. 1996).

#### Tratamiento de la EC

La enfermedad celíaca también se caracteriza porque al detener el desafio suprimiendo de la dieta los componentes nocivos, todas sus manifestaciones desaparecen, si el tiempo de dieta es lo suficientemente prolongado (Dinari, Branski y col., 1992). Se restituye la arquitectura histológica normal del intestino, desaparecen todos los síntomas clínicos y se normalizan los marcadores serológicos. Esto diferencia claramente a la enfermedad celíaca de las distintas enfermedades autoinmunes, que son automantenidas una vez que han iniciado su desarrollo (Rosemberg, 1992). La relación de la enfermedad con la ingesta fue una de las presunciones más tempranas realizadas sobre la naturaleza de la enfermedad. Gee, ya en su estudio del año 1888 decía "... si existe una cura para esta enfermedad será a partir de la alimentación..." (Walker-Smith, 1988). Si bien a partir de un mayor conocimiento de la enfermedad se pueden plantear distintas estrategias terapéuticas, la dieta libre de los componentes nocivos es la única estrategia terapéutica válida hasta el momento. Un aspecto crítico que debe ser considerado es que el tratamiento de la enfermedad mediante una dieta libre de los componentes tóxicos revierte todas las alteraciones no malignas asociadas (incluso los retrasos en el crecimiento si el tratamiento es temprano) (Holmes, 1996). Por otra parte se ha observado una menor frecuencia de complicaciones malignas en grupos de pacientes que mantuvieron una estricta adhesión a la dieta libre de gluten en comparación con otro grupo cuyo cumplimiento de la dieta fue más laxo (Holmes, Prior y col 1989, Lewis, Renuala y col., 1996). El riesgo de aparición de cáncer en los grupos de pacientes que mantuvieron una dieta estricta no se vio incrementado con respecto al de la población general. Por lo tanto una adhesión

permanente a la dieta libre de gluten es fundamental para evitar la aparición de las complicaciones asociadas a la enfermedad celíaca. Este criterio esta claramente arraigado en la comunidad médica mundial. Sin embargo sobrevienen una gran cantidad de interrogantes a ser resueltos que iremos analizando en forma secuencial. En una primer instancia se debe conocer cuáles son los componentes que deben ser eliminados de la dieta. A fin de poder esclarecer este punto es imprescindible ahondar el conocimiento del complejo sistema de proteínas de reserva de los cereales nocivos.

#### Proteínas de reserva del grano de trigo: generalidades

El trigo ha sido uno de los principales cultivos en las regiones templadas de occidente desde los inicios de las actividades agrícolas y la formación de asentamientos poblacionales permanentes en el neolítico superior. Actualmente constituye el principal cultivo a nivel mundial, con una producción global promedio de 569.700.000 toneladas anuales (FAOSTAT). Por otra parte constituye la mayor fuente de proteínas de la dieta de la humanidad, siendo equivalente a 2,7 kg de proteína por persona por día, frente a otros productos como arroz (1 kg de prot/cap/día), maíz (0,7 kg de prot/cap/día), carne bovina (0,8 kg de prot/cap/día) o productos lácteos (0,9 kg de prot/cap/día), según datos suministrados por la Food and Agriculture Organization, (promediando las cifras de los años 1990-1998, FAOSTAT).

A su vez las proteínas de trigo pueden considerarse las primeras en haber sido fraccionadas a partir de un producto natural (Beccari, 1745). Desde aquellos años en adelante, han sido objeto de estudio constante y un campo del conocimiento en continua expansión. Los estudios de fraccionamiento de proteínas de trigo fueron abordados por distintos autores en el siglo pasado y culminaron en los protocolos de extracción fraccionada propuestos por Osborne (1907) que constituyen la base de la clasificación de las proteínas de los distintos cereales. Este autor dividió las proteínas del grano de trigo en cuatro clases basándose en su solubilidad. Las albúminas, solubles en agua; las globulinas, solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; las gliadinas, solubles en etanol acuoso (concentración 60-90%) e insolubles en soluciones acuosas y las gluteninas, insolubles en alcoholes y solventes acuosos neutros. Esta división en grupos mantiene su utilidad hasta nuestros días a pesar de que a la luz de los conocimientos actuales se comprende la gran heterogeneidad de dichos grupos y la existencia de componentes en cada grupo que por sus características moleculares serían homólogos con los componentes mayoritarios de otros grupos a pesar de que su solubilidad sea diferente.

Las proteínas de los distintos cereales pueden ser clasificadas de la misma forma, nombrándose genéricamente como prolaminas a las proteínas solubles en etanol acuoso y como glutelinas a aquellas proteínas insolubles tanto en alcoholes como solventes acuosos neutros. Por otra parte, las fracciones prolamina reciben nombres propios en los distintos cereales, siendo llamadas secalinas en centeno, hordeínas en cebada, aveninas en avena, zeínas en maíz, kafirinas en sorgo, oryzinas en arroz, etc. (Wieser, 1998).

Otro procedimiento de fraccionamiento tradicional de la harina de trigo que mantiene vigencia hasta nuestros días es el referido a la obtención del gluten. El mismo se obtiene por lavado exhaustivo de la harina con agua. Este procedimiento separa los componentes solubles en agua como el almidón y las albúminas y globulinas. El residuo sólido es un agregado muy viscoelástico y se denomina gluten. Este producto consiste en una asociación de glutelinas y gliadinas mediada por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. El gluten ha sido ampliamente empleado debido a la simpleza del procedimiento de obtención y por las propiedades que aporta a los alimentos que a los que se adiciona. Es empleado como aditivo en panificados y pastas.

#### Proteínas de reserva del grano de trigo: ubicación y función

Los granos de los distintos cereales presentan diferencias morfológicas entre ellos, dependiendo de cada especie. En general poseen una cubierta externa dura, el pericarpio, con funciones de protección. Una pequeña porción interna está compuesta por el embrión o germen y la mayor parte del grano está ocupada por el endospermo, que contiene los materiales de reserva que serán removidos durante la germinación (Matz, 1959). Las albúminas y globulinas de los distintos granos se ubican preferentemente en el embrión. Corresponden a las proteínas citoplasmáticas, que básicamente cumplen funciones estructurales o enzimáticas, necesarias para la germinación de la semilla. Presentan características propias en cada especie, pero no tienen ninguna relevancia en la problemática de la enfermedad celíaca sobre la que se desarrolla el trabajo de tesis, por lo que no serán descriptas en detalle. Las fracciones prolamina y glutelina de los distintos cereales cumplen funciones de reserva de nitrógeno en las semillas, el cual será utilizado para la síntesis de los aminoácidos y bases necesarias para el crecimiento inicial del embrión durante la germinación (Kasarda, Bernardin y col., 1990). Las proteínas tóxicas para los enfermos celíacos se encuentran en estas fracciones de los granos de trigo, cebada y centeno. El rol de la avena en la patogenia de la enfermedad celíaca esta actualmente en discusión (Wieser, 1998), cuestión sobre la cual volveremos más adelante.

Siendo las prolaminas y glutelinas proteínas de reserva, se sintetizan en grandes cantidades luego de la fecundación y durante la formación de la semilla. Esta función es crítica para el desarrollo posterior de la germinación, estando sujeta a sistemas complejos de regulación tejido-específicos, temporales y ambientales. Las distintas especies de cereales tienen diferencias en los sistemas de control de estos procesos. Trigo, cebada y centeno poseen sistemas de control similares, siendo la regulación a nivel transcripcional el

factor principal de control de su síntesis (Galili, 1997). Los principales factores ambientales de control son los niveles de nitrógeno y azufre disponibles (Müller, Muth y col., 1995). La síntesis comienza en las etapas intermedias de la maduración de grano. teniendo los distintos grupos de prolaminas un control diferencial de su síntesis así como de sus niveles de acumulación. La síntesis a nivel celular se produce en el retículo endoplasmático y se acumulan formando cuerpos insolubles por agregación dentro del sistema de endomembranas llamados cuerpos proteicos. Estos cuerpos proteicos se acumulan en una vacuola central llegando a ella por dos rutas intracelulares independientes (Galili, Levanoni y col., 1993), constituyendo uno de los elementos principales del citoplasma celular. En la formación del grano, las prolaminas se ubican principalmente en la región correspondiente al albumen. La función de almacenamiento de N y su mecanismo de acumulación por formación de agregados condicionan algunas de sus características principales, que son una gran capacidad de formación de agregados en solventes acuosos, una estructura no globular y una composición aminoacídica particular, con alto contenido en glutamina y prolina (Shewry y Tatham, 1990). A su vez el sistema genético que las origina ha sufrido numerosas duplicaciones en su evolución tardía, apareciendo un gran número de prolaminas diferentes. Todas ellas comparten algunas características en común.

#### Proteínas de reserva del grano de trigo: caracterización electroforética

El uso de técnicas de análisis cada vez más poderosas permitió ampliar el conocimiento de las distintas prolaminas. Con el advenimiento de las técnicas electroforéticas a fines de los años 50 y principios de los 60 se confirmó lo que se sospechaba años atrás; la gran heterogeneidad de las distintas fracciones clasificadas en base a su solubilidad. La separación en geles de almidón a pH 3,1 en lactato de aluminio (Woychik, Boundy y col., 1961) permitió la clasificación de la fracción gliadina en distintos grupos de acuerdo a su movilidad electroforética. Así se la dividió en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ gliadinas, fracciones que a su vez presentan diversos componentes. Debido a su sencillez y la buena capacidad de separación del sistema, las técnicas electroforéticas fueron ampliamente empleadas para la caracterización de las prolaminas. El uso de geles de poliacrilamida como medio de separación fue adoptado (Lee, 1963) y se describieron distintos sistemas de buffers para la electroforesis (revisado por Bietz y Simpson 1992), todos a pH ácido, condición en la cual las prolaminas presentan buena solubilidad. En estos sistemas, si bien se pueden observar pequeñas modificaciones en la movilidad relativa de algún componente, se mantiene la división en subclases definida para el sistema descripto por Woychik, Boundy y col. (1961). La baja carga de las gliadinas resulta en una baja movilidad electroforética (las albúminas y globulinas en el sistema de pH 3 migran a mucha mayor velocidad). Se han realizado estudios bidimensionales combinando

separación a pH ácido con isolelectroenfoque o SDS-PAGE, revelando una gran complejidad, pudiéndose encontrar por estos análisis más de 50 componentes (Wrigley y Shepherd 1973) Mediante análisis por SDS-PAGE en presencia de 2-mercaptoetanol se observó que las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas presentan pesos moleculares similares, entre 33-40 kDa siendo indistinguibles mediante esta técnica (Bietz y Wall, 1972, Ewart 1973). Las  $\omega$ gliadinas presentan una masa molecular mayor, oscilando entre 50 y 65 kDa (Hamauzu, Toyomasu y col. 1974). Las gliadinas constituyen aproximadamente el 50 % de las proteínas de reserva del grano de trigo.

Las gluteninas representan el resto de las proteínas de reserva del grano de trigo. Se caracterizan por su baja solubilidad en solventes acuosos neutros y alcoholes (Ewart, 1979). Para su estudio se ha recurrido a distintas formas de extracción, empleando principalmente agentes reductores como ditiotreitol o 2-mercaptoetanol y agentes disociantes como urea o SDS (Pomeranz 1988; Kim y Bushuk, 1995, Larre, Nicolas y col 1997). Dependiendo de variaciones en el protocolo experimental empleado para su preparación (tales como pasos previos de extracción, temperatura y agentes empleados en los distintos pasos, etc.) el tipo de proteínas extraídas puede variar ligeramente. Mediante electroforesis desnaturalizante en presencia de 2-ME (SDS-PAGE) se determinó la existencia de dos tipos principales de componentes, las glutelinas de alto peso molecular (HMW) y las glutelinas de bajo peso molecular (LMW) (Shewry, Tatham y col 1986). Presumiblemente ambas fracciones se encuentran en el trigo agregadas y formando puentes disulfuro intercatenarios, lo que dificulta su extracción en solventes acuosos o etanólicos. Mediante SDS-PAGE se determinó un peso molecular de entre 70 y 100 kDa para las HMW y de 30-40 para las LMW (Bietz y Wall, 1972). Las HMW gluteninas representan un 20% de la fracción glutenina. Su estudio ha tenido un gran impulso dado que se ha relacionado su presencia y sus niveles de expresión con la calidad de panificación de la harina (MacRitchie, du Cros y col, 1990). Las LMW glutelinas, si bien son cuantitativamente más importantes que las HMW han sido menos estudiadas dada su heterogeneidad y las dificultades encontradas para su extracción (Tatham, Shewry y col., 1990).

#### Proteínas de reserva del grano de trigo: metodologías de purificación

A fin de caracterizar los distintas proteínas de reserva del trigo en forma aislada, el desarrollo de metodología de purificación de las mismas resulta un paso crucial. Dada la complejidad del sistema de proteínas de trigo, esta tarea ha representado un esfuerzo formidable, recurriéndose a las diversas metodologías disponibles para su aislamiento. Diversas técnicas cromatográficas han sido empleadas con objeto de purificar y caracterizar prolaminas. Las separaciones iniciales empleaban grandes columnas

empaquetadas en forma manual. La separación, con fines preparativos era aceptable, especialmente combinando más de una técnica de separación (Charbonnier y Mosse, 1980; Popineau, le Guerroue y col., 1986). Sin embargo, en general estas técnicas son muy trabajosas, insumen mucho tiempo y son muy poco reproducibles (Bietz y Simpson, 1992). La cromatografía de exclusión molecular ha sido empleada a fin de caracterizar y purificar las distintas prolaminas. Trabajos realizados en la década del '70 emplearon esta metodología a fin de caracterizar los pesos moleculares de distintas fracciones de gliadina, aunque las fracciones obtenidas poseían un gran número de componentes (Huebner y Wall, 1974; Payne y Corfield, 1979).

La cromatografia de intercambio iónico ha sido utilizada para la purificación de componentes de la fracción gliadina. Han sido empleados distintos soportes para intercambio aniónico, tales como sulfoetilcelulosa (Huebner y Rothfus, 1968), carboximetilcelulosa (Patey y Evans, 1973) o sulfopropilsephadex (Charbonnier y Mosse, 1980). El empleo de sistemas cromatográficos a presiones superiores a la atmosférica disminuye los tiempos operativos y mejora la reproducibilidad de las separaciones. Para obtener fracciones purificadas de gliadinas han sido empleados sistemas de separación tipo FPLC (Batey, 1984, Larre y col., 1991). En nuestro laboratorio fue desarrollada una técnica de separación de prolaminas mediante FPLC de intercambio catiónico (Chirdo, Fossati y col., 1994), que permitió obtener fracciones de  $\omega$ -gliadina purificadas. También han sido empleadas cromatografias de interacción hidrofóbica para la purificación y caracterización de prolaminas (Popineau y Godon 1982).

Las distintas técnicas cromatográficas tienen distintos problemas respecto a su capacidad de cuantificación, repetitividad, estabilidad de las columnas, etc. Estos problemas se ven reducidos empleando sistemas de alta presión tipo HPLC. El desarrollo de distintas técnicas de separación de prolaminas de buena resolución en la década pasada ha hecho de estas técnicas, junto con los métodos electroforéticos antes mencionados, las metodologías más profusamente usadas en la bioquímica de cereales. Las técnicas de exclusión molecular e intercambio iónico por HPLC han sido empleadas con éxito (revisado por Bietz, 1986), sin embargo, la metodología que ha mostrado el mayor poder de resolución ha sido HPLC de fase reversa (RP-HPLC). La técnica fue descripta inicialmente por Bietz (1983) para la separación de gliadinas, aunque rápidamente fueron descriptas distintas mejoras metodológicas que aumentaron su poder de resolución (Bietz, 1985; Marchylo, Hatcher y col. 1992) y permitieron análisis cuantitativos (Wieser, Seilmeiler y col., 1994, Wieser, 1998)

# Proteínas de reserva del grano de trigo: estudios estructurales y de biología molecular.

En paralelo a los desarrollos de purificación y estudio de las características de las proteínas, se realizaron logros en el área de la biología molecular de las prolaminas de cereales. Se clonaron distintos genes a partir de ARNm, con lo que se dispuso de las secuencias de distintas prolaminas. Kasarda, Okita y col., (1984) informaron por primera vez la secuencia completa de un gen de  $\alpha$ -gliadina. Posteriormente otros genes de  $\alpha$ gliadina fueron clonados y secuenciados, así como genes de  $\beta$ -gliadina, y-gliadina y HMW glutelina (Shewry, Halford y col., 1992; Bartels, Altosar y col., 1986; Sugiyama, Rafalski y col., 1986, Scheets y Hedgcoth, 1988). Esto permitió deducir las secuencias de aminoácidos de las distintas proteínas y modelar sus estructuras en base a estudios de simulación de plegamientos por computadora. Todo este bagaje de conocimiento permitió una reclasificación de las proteínas de reserva de trigo, revelando la gran complejidad del sistema, así como alguna de las imprecisiones de los distintos sistemas de fraccionamiento por solventes. Al poseer todas ellas una alta proporción de glutamina y prolina el nombre genérico "prolaminas" se usa a veces en forma extensiva para todo el grupo. En base a las homologías de secuencia se propuso un agrupamiento de las proteínas de reserva de trigo en: prolaminas ricas en azufre, prolaminas pobres en azufre y gluteninas de alto peso molecular (Shewry, Tatham y col. 1986). Las prolaminas ricas en azufre incluyen a las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas y las LMW gluteninas, las cuales comparten secuencias en común, así como una organización similar con estructura en dominios. Todas presentan varias cisteínas en su secuencia (en regiones no repetitivas), sin embargo en las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas todos los restos sulfhidrilo se encuentran formando puentes S-S intracatenarios, mientras que las LMW presentan restos SH libres capaces de formar puentes S-S intercatenarios con otras LMW o con las HMW siendo responsables de sus propiedades de solubilidad (Shewry y Tatham 1997a). Por otro lado, se observó una gran homología entre las  $\alpha$  y  $\beta$ gliadinas por lo que también se las conoce como gliadinas "tipo  $\alpha$ " (Shewry, Tatham y col 1986). Las secuencia de las ω-gliadinas no se conoce en su totalidad y sus genes no han sido clonados. Se las ubica como prolaminas pobres en azufre pues no presentan cisteína en su composición aminoacídica. Presentan más del 80% de su composición representada por Pro+Gln+Phe y casi la totalidad de su estructura primaria corresponde a secuencias repetitivas.

Las HMW pertenecen a un tercer grupo que no presenta homología con los anteriores. Poseen un extenso dominio repetitivo central (Goldsbrough, Bulleid y col., 1989), que a pesar de no presentar homología de secuencia con otros dominios repetitivos presentaría conformación " $\beta$ -spiral" (Shewry y Tatham, 1997b; Van Diijk, De Boef y col.,

1997; Van Diijk, Van Wijk y col., 1997) y dos dominios no repetitivos, uno C-terminal y otro N-terminal, el cual presenta el mayor número de cisteínas. La agregación y formación de puentes disulfuro intercatenarios es un comportamiento típico de estas proteínas. Este tipo de clasificación se resume en el siguiente esquema:



Figura 1: Esquema de clasificación de prolaminas según Shewry, Tatham y col., 1986.

El conocimiento de las secuencias aminoacídicas de las distintas prolaminas permitió a su vez emplear sistemas de predicción de conformación en base a programas de modelado de plegamiento. Se debe tener en cuenta que estos programas se basan en el uso de algoritmos ajustados iterativamente considerando las conformaciones de proteínas globulares cuya estructura fue determinada por cristalografía de rayos X. La validez del uso de estos modelos para predecir la estructura de proteínas de características tan inusuales como las prolaminas es controvertida. Las prolaminas ricas en azufre presentarían una estructura plegada compacta, especialmente en su región C-terminal (D'ovidio, Simeone y col., 1995), presentando en esta región su mayor proporción de  $\alpha$ -hélice (Tatham, Field y col., 1987).

Basándose en los estudios de secuencia y las similitudes estructurales entre de las distintas proteínas de reserva de trigo, se ha planteado un modelo de evolución molecular, que se reproduce en la Figura 2. El primer evento hipotético sería la duplicación de una proteína ancestral (X). Esto origina una proteína con dos dominios idénticos, ancestro evolutivo de ciertos inhibidores de proteasas presentes en muchas plantas. Por otra parte, por una nueva duplicación del gen X se habría originado una proteína de tres dominios

idénticos, los cuales por acumulación de mutaciones dieron origen a los dominios A, B y C de las prolaminas. Esta proteína ancestral sería antecesora de muchas proteínas 2S presentes en distintas semillas. Por una vía independiente habrían aparecido dos nuevos dominios entre las secuencias A y B y B y C. Esta proteína, pobre en prolina, sería antecesora de las prolaminas ricas en azufre, las cuales aparecen por acumulación de secuencias repetitivas en el extremo N terminal que incluyen gran cantidad de residuos de prolina y glutamina. A partir de estas estructuras se derivarían luego las prolaminas pobres en azufre por pérdida de los dominios no repetitivos y ampliación de los dominios repetitivos. Por otra parte del gen ancestral de prolaminas se derivarían también las HMW por introducción de un dominio repetitivo de secuencias características entre los dominios B y C. (Kreis, Shewry y col. 1985; Kreis, Frode y col. 1985; Galili 1997).



La aplicación de toda la batería de técnicas desarrolladas para la purificación de prolaminas permitió la obtención de proteínas puras de las diferentes clases. Se realizaron estudios de secuenciación N-terminal (Kasarda, Autran y col., 1983; Shewry, Autran y col. 1980), confirmando las particularidades en la estructura primaria de las distintas prolaminas así como estudios estructurales (Tatham y Shewry, 1985). Se encontró que cada tipo de gliadinas y glutelinas poseía una composición aminoacídica característica (revisado por Kasarda, 1990). Se describió la presencia de estructuras secundarias particulares, propias de estas proteínas. (Tatham, Shewry y col., 1984), empleando dicroismo circular. Se observó que su estructura secundaria presentaba un bajo contenido en  $\alpha$ -hélice (en todos los casos menor al 30%) lo cual es consistente con el alto contenido en prolina de estas proteínas (Pézolet, Bonenfent y col. 1992). A su vez se observó la aparición de secuencias repetitivas en muchas gliadinas y gluteninas, con repetición de la secuencia ser-pro-gln-gln y secuencias relacionadas, formadoras de una estructura secundaria denominada codo  $\beta$  o " $\beta$ -turn" (Tatham, Miflin y col., 1985). La sucesión de estos codos en las regiones repetitivas condiciona la formación de una estructura secundaria estabilizada por enlaces puente H denominada espiral  $\beta$ . Se observó que los distintos tipos de gliadinas y glutelinas tenían una distribución característica de dominios repetitivos y no repetitivos, siendo las ω-gliadinas las prolaminas con mayor porcentaje de secuencias repetitivas (Shewry y Tatham, 1990). Empleando sistemas de predicción de estructura proteica en base a la secuencia aminoacídica, se predice una estructura de ßspiral para las prolaminas pobres en azufre, a partir de algunos motivos de la región repetitiva (Shewry y Tatham 1990). Estas analogías estructurales junto a las comentadas anteriormente respecto a las secuencias de aminoácidos son la causa de la reactividad inmunoquímica cruzada que presentan estas proteínas, como veremos más adelante. Se debe considerar que todos los estudios biofísicos de determinación de estructuras se realizan en medio de solventes como etanol, a veces en presencia de agentes disociantes o con bloqueantes de grupos sulfhidrilo libres, lo que difiere del ambiente fisiológico para estas proteínas, por lo que la extrapolación directa de estos resultados al medio natural de las prolaminas es riesgosa (Galili, 1997).

#### Proteínas de reserva de otros cereales

Las distintas especies de cereales habrían aparecido evolutivamente a partir de un antecesor común, lo que explicaría muchas similitudes entre las prolaminas de trigo y otros cereales relacionados (Galili 1997). Taxonómicamente, los cereales económicamente relevantes pertenecen todos a la familia de las gramíneas (familia *Poaceae*), como se indica en la Figura 3. A su vez, los cereales que tienen una toxicidad manifiesta para los pacientes celíacos pertenecen a la tribu *Triticeae*, manteniendo una estrecha relación

taxonómica (Kasarda, 1996). La avena, cuya participación como agente desencadenante de la enfermedad celíaca es aún controvertida (Wieser, 1998) está relacionada en forma más lejana con los distintos miembros de la tribu *Triticeae*. Los distintos cereales presentan distintas proporciones de prolaminas en sus granos, sin tener esto relación con la toxicidad de los mismos. El maíz, inocuo para los pacientes celíacos, presenta un contenido de 70% de prolaminas, respecto al contenido total de proteína (Coleman, Dannenhoffer y col 1997), mientras que avena y arroz poseen una baja proporción de prolaminas (cercana al 10% del total de proteína). Respecto al contenido en glutamina y prolina de las prolaminas de distintos cereales, es alto en las de trigo, cebada y centeno, mientras que es menor en arroz, sorgo, mijo y maíz. Las prolaminas de avena se encuentran en una posición intermedia. La comparación de las distintas secuencias disponibles de prolaminas de distintos cereales muestra que existe una baja homología entre las gliadinas y las prolaminas de los distintos cereales no tóxicos (Wieser, 1998), mientras que la homología con las aveninas.



Figura 3: Taxonomía de las gramíneas

Las prolaminas de los distintos cereales han sido caracterizadas empleando las metodologías anteriormente mencionadas. Se encontraron similitudes respecto a los tipos de prolaminas presentes, y analogías estructurales entre las gliadinas y las prolaminas de cebada (hordeínas) y centeno (secalinas), las que habrían compartido muchos eventos de la evolución propuesta anteriormente para las proteínas de reserva de trigo (Tatham, Shewry y col. 1990). Cebada presenta dos tipos mayoritarios de proteínas solubles en alcohol-

agua, las C-hordeínas y las  $\gamma$ -hordeínas (Marchylo y Le Berge, 1980; Shewry, Ellis y col. 1978). Estudios estructurales y de secuenciación de las C-hordeínas (Frode, Kreis y col. 1985; Entwhistle Knudsen, y col. 1991; Field, Tatham y col. 1986; Tatham, Drake y col. 1985) mostraron su estrecha relación con las  $\omega$ -gliadinas. Las  $\gamma$ -hordeínas son cuantitativamente menores que las C-hordeínas, presentando una gran homología con las  $\gamma$ gliadinas (Shewry, Kreis y col. 1985). A su vez en el grano de cebada se encuentran fracciones proteicas que se agregan mediante puentes S-S intercatenarios y de alta homología y similitud estructural con las HMW y LMW gluteninas, denominadas respectivamente B-hordeínas y D-hordeínas (Halford, Tatham y col, 1992; Shewry, Tatham y col. 1990; Colot, Bartels y col. 1989), siendo las B-hordeínas las proteínas de reserva mayoritarias del grano de cebada

Las prolaminas de centeno han sido menos estudiadas, dado que este cereal presenta un menor interés económico y su cultivo es más restringido. Sin embargo su gran homología con las prolaminas de trigo fue claramente establecida. Las fracciones proteicas principales, de acuerdo a su estructura y homología de secuencias, son las y-secalinas, ωsecalinas y las HMW secalinas (Tatham, Shewry y col 1990). La fracción y-secalina es la mayoritaria, presentando dos componentes principales, las y-secalinas de 40 kDa y las ysecalinas de 75 kDa (Shewry, Field y col. 1982; Charbonnier, Tercé-Laforgue y col 1981). Las  $\gamma$ -secalinas de 40 kDa presentan una alta homología y similitud estructural con las  $\gamma$ gliadinas (Tatham and Shewry, 1991), mientras que las  $\gamma$ -secalinas de 75 kDa presentan homología en su extremo N-terminal con las y-gliadinas y y-secalinas de 40 kDa, pero su cadena polipeptídica es mucho más elongada, presentando secuencias C-terminales que no tienen homología con las de ningún otro cereal. A diferencia de las  $\gamma$ -secalinas de 40 kDa, las y-secalinas de 75 kDa presentan algunos restos de cisteína capaces de formar puentes S-S intercatenarios por lo que se agregan en condiciones no reductoras, siendo preferencialmente extraídas por solventes etanólicos en presencia de agentes reductores. Sin embargo, pueden ser parcialmente extraídas por solventes alcohólicos no reductores, junto con las γ-gliadinas de 40 kDa y las ω-secalinas (Shewry, Parmar y col. 1983). Las ωsecalinas son minoritarias y presentan una alta homología con las ω-gliadins y C-hordeínas (Tatham and Shewry, 1991). La fracción de HMW secalinas presenta analogías con las HMW gluteninas y las D-hordeínas (Shewry, Tatham y col. 1988). En centeno no se han encontrado proteínas homólogas con las LMW gluteninas (Tatham y Shewry, 1990). Estas relaciones se resumen en la siguiente tabla.

Tipo de prolaminas	Trigo	Cebada	Centeno
HMW	HMW gluteninas	D - hordeínas	HMW secalinas
Pobres en S	ω-gliadinas	C - hordeínas	ω-secalinas
Ricas en S			
- ancestrales	γ-gliadinas	γ-hordeínas	γ-secalinas (40 kDa)
- derivadas (monoméricas)	gliadinas tipo $\alpha$		
- derivadas (poliméricas)	LMW gluteninas	B hordeínas	
			γ-secalinas (75 kDa)

 Tabla I: Relación entre las prolaminas de los cereales de la tribu Triticeae (reproducido de Tatham y Shewry, 1990)

La divergencia de un género ancestral habría ocurrido primero para el género *Hordeum* (cebada) y posteriormente se separaron los géneros *Triticum* (trigo) y *Secale* (centeno). Los tres géneros presentan homología entre sus prolaminas tipo HMW y pobres en S, así como entre las  $\gamma$ -gliadinas y sus pares ( $\gamma$ -hordeínas y  $\gamma$ -secalinas), las que habrían estado presentes en el ancestro común. También habrían ocurrido fenómenos de elongación de regiones repetitivas, duplicación de ciertos dominios y mutaciones puntuales, diferentes en las distintas especies, originándose las gliadinas tipo  $\alpha$  en trigo, que no presentan homólogas en los otros cereales y las  $\gamma$ -secalinas 75 kDa en centeno, propias de esta especie, sin que se hayan descripto proteínas homólogas en otros cereales (Galili 1997, Tatham y Shewry, 1990).

En paralelo a los análisis estructurales y de biología molecular de las prolaminas se realizaron estudios inmunoquímicos sobre las prolaminas de los distintos cereales. El objetivo de estos trabajos fue establecer las relaciones antigénicas entre las fracciones de prolaminas de las distintas especies taxonómicamente relacionadas. La interacción establecida entre los anticuerpos específicos y sus antígenos correspondientes depende básicamente del reconocimiento de estructuras moleculares. Los estudios inmunoquímicos resultan complementarios a los análisis de biología molecular que revelan la estructura primaria proteica, mientras que aquellos permiten detectar analogías entre conformaciones moleculares que muchas veces no se pueden establecer claramente con la secuencia proteica. Festenstein, Hay y col., (1987) realizaron estudios empleando sueros obtenidos en conejo frente a distintas fracciones purificadas de C-hordeína, B-hordeínas,  $\gamma$ -gliadinas y A-gliadina. El objetivo de estos estudios fue establecer la relación antigénica entre las distintas fracciones analizadas y compararla con los datos disponibles de homología entre las mismas. Fue observada una extensa reactividad cruzada entre las distintas prolaminas. De esta manera, antisueros obtenidos contra  $\gamma$ -gliadina purificada eran capaces de

reconocer distintos componentes no sólo de fracciones relacionadas como  $\gamma$ -secalinas (40 o 75 K) o  $\gamma$ -hordeínas, sino también otras como C-hordeínas u  $\omega$ -gliadinas. Algo similar fue observado con sueros obtenidos frente a B-hordeínas, C-hordeína y A-gliadina. Esto se debe a la presencia de estructuras repetitivas altamente inmunogénicas en las distintas prolaminas como son los dominios repetitivos ricos en prolina. La respuesta policional principalmente se dirige contra esas regiones del inmunógeno, confiriendo al suero inmune resultante la capacidad para interaccionar, en mayor o menor medida, con otras prolaminas que contengan estructuras repetitivas comparables. Esto fue observado en distintos estudios empleando sueros anti-prolaminas (revisado por Skerritt, 1987).

También se han empleado anticuerpos monoclonales en estos estudios, mostrando un comportamiento variable, dependiendo presumiblemente de los epitopes reconocidos por cada anticuerpo (Skerritt y Underwood, 1986, Skerritt y Hill, 1990b). Fueron descriptos anticuerpos monoclonales de reactividad restringida sólo a una clase de prolamina particular y otros presentaron reactividad amplia frente a distinto tipo de prolaminas. Incluso estudios realizados empleando AcMo obtenidos por inmunización con péptidos de secuencia definida, pertenecientes a regiones no repetitivas de distintas gliadinas, presentaron reconocimiento de otras clases de prolamina diferentes de la secuencia empleada en la inmunización (Denery-Papini, Briand y col. 1994). Todos estos estudios pusieron en evidencia la compleja relación antigénica existente entre las distintas prolaminas de las especies de cereales relacionadas y la existencia de estructuras moleculares inmunodominantes en las prolaminas.

La avena es un cereal taxonómicamente más lejano a trigo. Las prolaminas de avena (aveninas), si bien presentan reactividad inmunoquímica frente a sueros obtenidos por inmunización con otras prolaminas (Festenstein, Hay y col. 1987) tienen una similitud estructural menos estrecha con las prolaminas de las triticaceas y presentan una composición aminoacídica ligeramente diferente (con menos contenido de gln y pro) (Egorov, 1988; Egorov, Musolyamov y col. 1994). Por su movilidad electroforética y su estructura primaria pueden ser clasificadas en tres subgrupos, denominados  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ aveninas (Wieser y Belitz 1989). Todas presentan una división en dominios similares, presentando una homología con las  $\gamma$ -prolaminas, con las que estarían filogenéticamente relacionadas (Wieser, 1998). Presentan el dominio repetitivo N terminal y los dominios A y C similares a las prolaminas ricas en S (ver Figura 2). A su vez poseen una región repetitiva entre los dominios A y C con secuencias particulares no homólogas con las de los otros cereales.

Las estructuras primarias de las prolaminas de otros cereales no tóxicos para los pacientes celíacos como las zeinas, kafirinas, oryzinas, no tienen homología con las de los cereales de la tribu *Triticeae* (Shewry y Miflin, 1985)

#### Toxicidad de las distintas proteínas de cereales en enfermedad celíaca

Con el uso de técnicas de separación y análisis de mayor potencialidad, el conocimiento de las distintas prolaminas ha ido aumentando, paralelamente con el conocimiento de la relación entre la enfermedad celíaca y las distintas prolaminas. La asociación entre la aparición de la enfermedad y la ingesta de proteínas de cereales fue establecida en la década del 50 (Dike, Weijers y col., 1953). Sin embargo, precisar cuales de las distintas fracciones de prolaminas resultan tóxicas ha resultado más controvertido. Los estudios de toxicidad se enfrentan a la dificultad consistente en la falta de modelos animales de la enfermedad. Si bien han sido descriptos algunos sistemas de estudio de patologías con algunas características en común con la enfermedad celíaca en perros de raza Irish Setter y en ratas alimentados con sobrecarga de gluten (Stepanková, Tlaskalova y col., 1989; Stepanková, Tlaskalova y col., 1996) ambos modelos no reproducen todos los aspectos de la patología humana, siendo difícil de extrapolar los resultados obtenidos en estos sistemas a la enfermedad celíaca. Esto ha enfrentado a los investigadores al problema ético asociado a la identificación de fracciones tóxicas exponiendo a pacientes a la ingesta de proteínas potencialmente nocivas. Se han desarrollado sistemas experimentales que permiten el estudio in vivo de la toxicidad de prolaminas minimizando la exposición a las proteínas tóxicas. Ensari, Marsh y col., (1993) desarrollaron un sistema de desafío rectal, demostrando que ocurren cambios histológicos específicos al desafiar por aplicaciones tópicas la mucosa rectal con suspensiones de las prolaminas tóxicas. Esto permite correlacionar los cambios en la mucosa con la toxicidad del material con que se desafía, además de presentarse como una alternativa interesante para el estudio de otros aspectos de la patogénesis de la enfermedad celíaca. Otro sistema de estudio posible es el desafio de la mucosa duodenal por vía endoscópica, permitiendo esto poner en contacto la mucosa duodenal con la muestra a testear sólo en una pequeña área, la cual puede ser a posteriori sometida a una biopsia endoscópica para estudios histológicos.

Resultados obtenidos empleando fracciones purificadas de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadina realizando pruebas de instilación local en mucosa duodenal seguida de biopsia revelaron que todas estas fracciones resultaban tóxicas para los pacientes celíacos (Ciclitira, Evans y col. 1984). Estos resultados fueron comprobados en estudios *in vitro*, mediante incubación de biopsias duodenales de pacientes celíacos y medida de cambios histológicos (Howdle, Ciclitira y col. 1984). Estudios posteriores demostraron que las fracciones empleadas resultaron parcialmente impurificadas con componentes de otras fracciones, por lo que estos resultados se hallan cuestionados (Wieser, 1996). Una excepción a esta situación resulta la A-gliadina, una fracción bien definida que contiene algunos polipéptidos de  $\alpha$ gliadina que resulta făcilmente obtenible mediante ultracentrifugación (Bernardin, Kasarda, y col. 1967). Esta fracción ha sido testeada *in vitro* e *in vivo* demostrando su actividad (Falchuk, Nelson y col. 1980). Debido a la dificultad de obtener fracciones purificadas, la gran cantidad necesaria para estos estudios y la necesidad de montar sistemas de trabajo *in vitro* para realizar estos estudios, no se han llevado a cabo estudios sobre fracciones purificadas de otros cereales. Basándose en las relaciones estructurales anteriormente comentadas se supone que todas las fracciones de prolamina monoméricas de trigo, cebada y centeno presentan toxicidad. Las LMW gluteninas, que presentan una alta homología de secuencia con las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas también resultarían tóxicas para los pacientes celíacos (Kasarda, 1996). Es más discutible la toxicidad de las HMW gluteninas y sus homólogas, que presentan secuencias de menor homología con las gliadinas. Tampoco existen datos referentes a la toxicidad de las fracciones homólogas a las LMW gluteninas en otros cereales (Kasarda 1996). Aunque no se han realizado estudios respecto a la toxicidad *per se* de estas fracciones, se sospecha que presentarían toxicidad pues una pequeña fracción de las prolaminas solubles en medios alcohólicos no reductores permanecería agregada con las glutelinas mediante enlaces disulfuro (Lew, Kuzmicky y col. 1992).

#### Estudios de toxicidad empleando proteínas parcialmente digeridas

A fin de simular la situación fisiológica de digestión enzimática de las proteínas de los alimentos e interacción con la mucosa intestinal, se realizaron ensayos de toxicidad empleando la fracción gliadina digerida con pepsina y tripsina. Se determinó que la toxicidad no se perdía incluso cuando los péptidos derivados presentaban una masa molecular menor de 1000 Da (Bronstein, Haeffner y col. 1966). La destrucción de los puentes S-S y los distintos tipos de tratamientos térmicos no alteran la toxicidad, mientras que la degradación total de la gliadina hasta aminoácidos la hace desaparecer (Van de Kamer y Weijers, 1955). Estos resultados pueden ser interpretados claramente en el marco de la hipótesis del origen inmunológico de la enfermedad celíaca planteada anteriormente. Si la enfermedad es desencadenada por un reconocimiento exacerbado de péptidos de gliadina en un contexto de MHC clase II, los epitopes reconocidos por el sistema inmune serán epitopes T, o sea secuencias lineales de 12-15 aa.

#### Estudios de toxicidad empleando péptidos sintéticos

Muchos trabajos se realizaron con el fin de caracterizar la toxicidad de los péptidos derivados de gliadina por hidrolizados enzimáticos parciales (revisado por Wieser, 1996). Jos, de Trand y col. (1983) aislaron un péptido tóxico de un digesto pepto-triptico de una  $\alpha$ -gliadina. Por comparación de secuencias, se observó que dicho péptido se ubicaba entre los aminoácidos 3 y 24 de la secuencia original. Siguiendo procedimientos similares,

fueron aislados muchos otros péptidos tóxicos (De Ritis, Auriccio y col. 1988; Wieser, Belitz y col. 1986), correspondientes a distintos segmentos de distintas fracciones de gliadina (principalmente  $\alpha$  y  $\gamma$  gliadina). Comparando las secuencias de los distintos péptidos que presentaron toxicidad en estudios independientes se hallaron dos secuencias comunes a todos los péptidos tóxicos: PSQQ y QQQP (P=prolina, Q=glutamina, S=serina). Sin embargo, estos tetrapéptidos por si solos no presentan toxicidad, sino que deben estar dentro de ciertas secuencias en polipéptidos de más de 10 aminoácidos. Por otra parte, secuencias de tipo QQQP se encuentran en prolaminas de maíz, arroz y otros cereales e incluso en proteínas no relacionadas, por lo que las secuencias tóxicas deben contener a su vez otros patrones característicos (Kasarda, 1996). Estudios realizados empleando péptidos sintéticos de distintas secuencias en sistemas in vitro e in vivo también demostraron la asociación de estas secuencias con la toxicidad (Mantzaris y Jewell 1991; Sturgess, Day y col. 1994). Sin embargo en estos estudios se demostró que la presencia de estas secuencias no era suficiente para asegurar la toxicidad, sino que sólo ciertos péptidos presentaban actividad. La obtención de péptidos de síntesis en cantidades necesarias para estos estudios es también costosa, por lo que el número de péptidos diferentes testeados hasta el momento no ha sido suficiente para encontrar un patrón general de comportamiento.

La problemática de identificación de las secuencias tóxicas se enfrenta con la complejidad de la fracción prolamina. El alto número de componentes en las distintas especies y la gran cantidad de posibilidades de derivación de péptidos por digestión hace a esta tarea un desafio formidable, que hasta el momento ha sido sólo esclarecido parcialmente. Todos los péptidos que han demostrado actividad tóxica en ensayos tanto in vivo como in vitro poseen secuencias similares a las de gliadinas, no encontrándose dichas secuencias en ninguna otra proteína no relacionada (Kasarda, 1996). Si bien el testeo directo de una secuencia dada en ensayos de toxicidad in vivo o in vitro resulta el modo más contundente de probar su toxicidad, sería imposible chequear por medio de esta metodología todas las posibles combinaciones de secuencias presentes en las prolaminas tóxicas. Diversos enfoques se han aplicado a la resolución del problema, basándose en el posible papel de los péptidos derivados de gliadina en la activación linfocitaria. Así Terreaux, van de Waal y col (1998) han empleado "bibliotecas" de péptidos sintéticos empleando métodos combinatorios, en busca de péptidos que se unan con alta afinidad a la molécula de MHC DQ2 (DQ ( $\alpha$ 1\*0501 $\beta$ 1\*0201)). Haciendo un scanning posicional, se puede comprobar que la presencia de algunos aminoácidos en posiciones específicas favorece la afinidad por el sitio de unión de este alelo de MHC mientras que otros la desfavorecen (Fleckenstein Kalbacher y col. 1996). Esto permite deducir patrones de secuencia que resultarían en péptidos de alta capacidad de unión al alelo DQ2. De esta forma se podrían seleccionar péptidos capaces de ser presentados por dicho alelo para ser ensayados en pruebas de toxicidad.
#### Toxicidad de las prolaminas de avena (aveninas)

Vista la complejidad del sistema proteico y los interrogantes que subvacen respecto a la toxicidad de algunas de las fracciones de proteínas, la conducta terapéutica que se establece es la eliminación de la dieta de todos aquellos alimentos que contengan prolaminas de trigo, avena, cebada y centeno (TACC). La toxicidad de las prolaminas de avena permanece en discusión. Estudios realizados en los años 50 indicaban que estas proteínas tenían una toxicidad menor que las prolaminas de las Triticaceas (Dicke, Van de Kamer y col. 1953). Sin embargo en estos trabajos la toxicidad fue evaluada mediante la sintomatología clínica y pruebas de absorción de grasas (van de Kamer y col, 1955), que resultan de baja confiabilidad para determinar los cuadros de enfermedad celíaca activa. También ensayos realizados in vitro sobre biopsias de pacientes demostraron actividad de la avena como desencadenante de inflamación en la enfermedad celíaca (Leone, Mazzarella y col. 1996). Estudios recientes sometiendo a pacientes en ensavos ciegos a dietas ricas en avena y posterior evaluación por biopsia intestinal y marcadores serológicos no encontraron diferencias entre los grupos control y con ingesta de avena (Janatuinen, Pikkarainen y col. 1995; Srinivasen, Leonard y col. 1996; Holm, Vuolteenaho y col. 1998). Estos estudios han sido criticados por el número de pacientes estudiados (entre 50 y 100), cantidad de avena ingerida (50 g por día) o si el período de dieta estudiado resulta demasiado corto (3 a 6 meses en la mayoría de los casos, sólo Janatuinen y col. estudiaron períodos cercanos al año) para establecer conclusiones respecto a una conducta de por vida. Para dirimir estas cuestiones se necesitan estudios más extensos (hay varios estudios en curso) que puedan contestar los interrogantes planteados. Por el momento la actitud que prevalece es cautelosa, indicando la supresión de la avena en el tratamiento de la enfermedad celíaca. Consecuentemente, los pacientes celíacos deben evitar la ingesta de alimentos que contengan prolaminas TACC.

# El papel de las proteínas tóxicas en los alimentos

Indudablemente resulta complicado el establecer una dieta terapéutica estricta, debido a los múltiples alimentos –e incluso otras sustancias como medicamentos y cosméticos- que tienen en su formulación algún derivado del grano de trigo, en el que indefectiblemente se encontrarán, en mayor o menor proporción las gliadinas tóxicas. Esto se debe a las fantásticas propiedades que aportan las proteínas de trigo a los alimentos. Debido a sus características fisicoquímicas y su gran capacidad para establecer interacciones intermoleculares en medios acuosos, las proteínas de trigo forman una malla tridimensional capaz de impedir la difusión de los gases, generando estructuras esponjosas luego de procesos de calentamiento que son la base de los procesos de panificación (Mac Ritchie, du Cros y col. 1990). Las interacciones que se establecen en la masa son altamente complejas, pero en ella las proteínas del gluten (prolaminas y gluteninas) juegan un papel fundamental (Weegels, Hamer y col. 1992).

El cultivo de trigo y cebada comenzó hace unos 10000 años en la región del kurdistán y la mesopotamia, extendiéndose luego hacia las costas del mediterráneo y hacia Europa hace unos 5000 años. Los griegos ya conocían el arte de la panificación. Durante todos estos años de cultivo se fueron seleccionando las variedades de trigo con mayor contenido de gluten en sus granos, debido a las propiedades de panificación que le aportaba a la harina (Greco, 1997). Estos procesos de selección se incrementaron luego del renacimiento, período a partir del cual se comenzó a generalizar en Europa el consumo de pastas realizadas con harina de trigo (Greco, 1998). Esto ha hecho que las variedades que se cultivan actualmente tengan una excelente calidad para aplicaciones en distinto tipo de alimentos, así como un alto contenido en gliadinas y gluteninas.

Por otra parte, el grado de sofisticación de la industria de los alimentos hace que muchos alimentos se formulen con pequeñas cantidades de harina de trigo, la que aumenta la capacidad de retención de agua, actúa como espesante y por lo tanto estabiliza emulsiones y mejora la textura de muchos productos. También actúa como aglutinante, aumentando en muchos casos la homogeneidad de la matriz del alimento (Popineau y Pineau, 1993, Raymond, Roquette y col. 1993). Estas mejoras se logran con pequeños agregados de harina, a un muy bajo costo, por lo que los hace muy atractivos para los productores de alimentos.

El almidón de trigo es muy empleado con los mismos fines. Los almidones, según la forma de obtención pueden tener entre 0,2 y 5% de proteína (Vogelsang, Granditsch y col. 1998). A su vez se ha determinado que algunas de estas proteínas son parte de las enzimas que intervienen en la síntesis del almidón. Sin embargo estas proteínas *per se* contribuirían a una carga proteica de hasta el 0,3% en el almidón. Todos los almidones con más de este porcentaje de proteínas contendrán indefectiblemente gliadina (Skerrit y Hill, 1992). Por lo tanto los alimentos que contengan almidón de trigo también deben ser evitados en la dieta de los pacientes celíacos. Lo mismo ocurre con el salvado de trigo (Ellis y Ciclitira 1996).

Teniendo esto en cuenta, muchos productos que en primera instancia aparecerían como no relacionados con el trigo podrían contener prolaminas tóxicas. Dependiendo de la marca y producto, embutidos, caramelos, dulces, dulce de leche, conservas enlatadas, snacks, sopas pre-listas, condimentos (mostaza, salsas, etc.) pueden contener gliadinas. De esta manera, los pacientes celíacos en su dieta deben evitar los alimentos que obviamente dada su naturaleza contienen las prolaminas tóxicas como panificados, galletitas, alfajores, fideos y pastas en general, pizzas, cerveza, (así como alimentos caseros tipo empanadas, milanesas, tartas, etc.). Sin embargo antes de ingerir muchos otros productos como los mencionados anteriormente deben asegurarse de que sean libres de los componentes tóxicos. El espectro de alimentos que potencialmente pueden contener las gliadinas tóxicas en muy grande. Se han informado casos de reacciones clínicas frente a medicamentos e incluso cosméticos o pasta dentífrica, todos los que en su formulación incluían almidón de trigo (Miletic, Miletic y col. 1994).

#### Normas internacionales para los alimentos destinados a enfermos celíacos

Teniendo en cuenta el amplio espectro de productos potencialmente nocivos y que la dieta debe ser estricta y de por vida a fin de evitar complicaciones a largo plazo derivadas de la enfermedad, cuanto menor sea el espectro de productos a evitar, menores serán las transgresiones dietarias (Mayer, Greco y col. 1991; Kumar, Walker Smith y col 1988). Con este criterio, muchos países establecieron un sistema de rotulación de los productos libres de gluten, a fin de facilitar el cumplimiento de la dieta de los pacientes celíacos. Sin embargo subyacen muchos interrogantes al respecto. En primer instancia se debe establecer un nivel mínimo debajo del cual un alimento sea considerado libre de gluten, apto para el consumo de enfermos celíacos. La Organización Mundial de la Salud estableció este límite en 1 mg/100 g de alimento en base seca (10 ppm) (WHO Bulletin 1988). Esto está relacionado con estudios de ingesta de distintas cantidades diarias de gliadina. Ciclitira, Evans y col. (1984) observaron que una dieta de 10mg/dia de gliadina no provocaba alteraciones en la mucosa. En otros estudios se observó que con dosis de 100 mg/día se produce un aumento de linfocitos intraepiteliales en la mucosa duodenal (Catassi, Rossini y col. 1993). Sin embargo, dada la susceptibilidad individual, subyacen dudas respecto a la seguridad absoluta de los límites establecidos. Por otro lado muchos productos, por su naturaleza nunca podrían ser consumidos en cantidades que alcancen a las estudiadas por dichos autores. Está en estudio en la Comisión del Codex Alimentarius una nueva normatización (Janssen 1998), la cual actualmente también esta siendo considerada en nuestro país.

#### Métodos de control de alimentos para celíacos

Para asegurarse que un producto presenta una cantidad menor que la establecida como límite para ser considerado libre de gluten y ser apto para consumo para enfermos celíacos se deben contar con métodos de laboratorio adecuados, capaces de detectar en forma específica las proteínas tóxicas en la matrices sumamente complejas y variadas como pueden ser los distintos alimentos.

Por otra parte, los métodos a utilizar deben tener límites de detección lo suficientemente bajos y confiables como para poder medir cantidades de prolaminas tóxicas en los alimentos iguales o menores a los límites establecidos por las autoridades sanitarias. Se han propuesto distintas metodologías para cumplir esta función. Algunos grupos trabajaron en ensayos electroforéticos (López y Valencia 1994a y b) en donde extractos de los alimentos a estudiar eran sometidos a electroforesis tipo SDS-PAGE y se observaba el perfil proteico de los mismos. Estos métodos tienen la desventaja de tener baja capacidad para procesar un alto número de muestras, además su resultado depende de la interpretación del complejo patrón de bandas observado, sin tener una especificidad clara por las prolaminas tóxicas. Por otra parte, aún empleando tinciones sensibles como la tinción de plata no tienen la sensibilidad necesaria establecida por la OMS.

Recientemente las técnicas de espectroscopía de masa MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization) han sido empleadas para la cuantificación de prolaminas en alimentos para celíacos (Méndez, Camafeita y col. 1995). Dichas técnicas se basan en la ionización del material proveniente de extractos alimenticios mediante la técnica MALDI, que consiste en una ionización lograda mediante un pulso de radiación láser sobre la muestra inmersa en una matriz orgánica sensible a la radiación empleada. La energía entregada por el láser vaporiza la matriz. Las moléculas de la muestra, sin importar su tamaño reciben una o unas pocas unidades de carga de parte de la matriz. La muestra así ionizada es analizada por un espectrómetro de masa tipo TOF (time of flight), pudiéndose detectar en forma exacta la masa de las distintas moléculas (ionización simple), así como la cantidad de las mismas (Sporns y Wang, 1998). Si bien la especificidad del método la otorga el tipo de solvente empleado en la extracción, sus autores sostienen que los perfiles que producen los distintos cereales son claramente identificables. Por otra parte no se ha establecido claramente si sensibilidad del mismo es suficiente para cubrir los requerimientos de la OMS. A su vez requiere equipamiento altamente sofisticado y costoso, siendo propuesto su uso como un método de validación de estándares para ser empleados con otra metodología.

Los métodos inmunoquímicos son claramente aceptados en todo el mundo como los más aptos para ser utilizados en el control de alimentos para celíacos. Se basan en el empleo de anticuerpos específicos para las prolaminas tóxicas. Numerosos trabajos han descripto la obtención de dichos anticuerpos tanto sueros como anticuerpos monoclonales (Mills, Brett y col, 1995; Stevenson, McCarthy y col., 1994; Chirdo, Fossati y col 1995,1998). Debido a la marcada similitud estructural entre las distintas prolaminas tóxicas, aun realizando inmunizaciones con una fracción purificada, se obtienen anticuerpos con reactividad contra distintas prolaminas (Brett, Mills y col., 1990; Mills, Burgess, y col 1990, Freedman, Wieser y col 1988; Skerritt y Underwood, 1986). Los anticuerpos antiprolaminas han sido empleados en ensayos de diferentes formatos a fin de detectar prolaminas tóxicas en alimentos. Durante muchos años se emplearon sistemas de inmunodifusión radial (incluso en los organismos de control estatal de nuestro país se siguen empleando). Estos sistemas presentan una baja sensibilidad y su límite de detección es superior al establecido por la OMS, además de presentar algunos resultados falsos positivos (Chirdo, Rumbo y col. 1997). Por todas estas razones este formato de ensayo ha sido cuestionado, siendo claramente inferior a otras técnicas que presentan mayor sensibilidad y capacidad de detección como son las técnicas de ELISA o inmunoblotting.

El inmunoblotting (Janssen, Voortman y col. 1987; Janssen, de Baaij y col. 1994) se basa en el reconocimiento de las proteínas, separadas por electroforesis y transferidas a un soporte inerte, mediante anticuerpos específicos. Según el método de revelado que se emplee será la capacidad de detección de la técnica. Con el uso de técnicas de quimioluminiscencia se pueden lograr muy bajos niveles de detección (Chirdo, Rumbo y col, 1998). Sin embargo son métodos muy laboriosos y de baja capacidad para el manejo de un alto número de muestras. Las técnicas de ELISA son las más empleadas a nivel mundial para el control de alimentos para celíacos (Janssen 1998). Se basan en el reconocimiento de las prolaminas tóxicas mediante anticuerpos específicos. La reacción se evidencia mediante el uso de reactivos específicos para los anticuerpos empleados (un segundo anticuerpo específico o avidina en el caso de emplear sustancias biotiniladas) conjugados a una enzima cuya presencia se detecta mediante una reacción colorimétrica. El ensayo se realiza en microplacas de poliestireno y el color se mide en espectrofotómetros especialmente adaptados para el uso de dichas microplacas. Mediante el uso de estándares adecuados se pueden obtener resultados cuantitativos. Se puede manejar un alto número de muestras y es fácil su automatización (Gorman, Arentzen y col., 1997). Presenta una sensibilidad y capacidad de detección acordes con las sugeridas por la OMS. Además el empleo de sistemas quimioluminiscentes podría mejorar aun más la capacidad de detección en caso de ser necesario. Existen distintos formatos de ensayo propuestos por los distintos grupos. A su vez los anticuerpos empleados pueden ser policionales o monocionales (revisado por Howdle y Losowsky 1990). Troncone, Vitale y col. (1986) describieron un ensayo de cuantificación empleando un suero antigliadina en un formato sandwich. Chirdo, Fossati y col. (1995) emplearon un formato competitivo, sensibilizando las placas con gliadina comercial y usando un suero antigliadina. Distintos grupos emplearon anticuerpos monoclonales antigliadina para la formulación de ensayos de detección. Skerritt y Hill (1990) describieron un ensayo empleando anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos para o-gliadina en un formato de sandwich, utilizando el mismo monoclonal para la captura y la detección. Este ensayo, luego de un estudio en colaboración interlaboratorio donde se evaluó su repetitividad, fue adoptado como método oficial por la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) (Skerritt y Hill 1991). Freedman, Galfre y col. (1987) plantearon un ensayo de ELISA empleando AcMo de

reconocimiento menos restringido en un formato sandwich. También se plantearon distintos ensayos con anticuerpos obtenidos por inmunización con péptidos derivados de gliadina (Ellis, Doyle y col. 1994, Denery Papini, Briand y col 1994). Chirdo, Fossati y col (1998) describieron el empleo del sistema de amplificación biotina-avidina para generar ensayos de alta capacidad de reconocimiento y desarrollaron un ensayo competitivo usando gliadina biotinilada como trazador.

La performance de un sistema de cuantificación dependerá entre otras cosas de la afinidad y especificidad de los anticuerpos empleados. Sin embargo, dada la complejidad del sistema proteico y la problemática de la enfermedad celíaca anteriormente comentada, cabe cuestionarnos qué es lo que se debe medir. Si bien en nuestro país el trigo y sus derivados son los elementos más ampliamente distribuidos en los distintos alimentos, no debemos excluir la posibilidad de que en ciertos alimentos, por su formulación o por simple contaminación cruzada, puedan estar presentes prolaminas de centeno, cebada o avena, por lo tanto sería deseable que los anticuerpos a emplear también reconocieran estas proteínas. Dadas las similitudes estructurales entre las prolaminas de las Triticaceas anteriormente comentadas es posible obtener anticuerpos que reconozcan estructuras comunes a las distintas especies relacionadas con la enfermedad celíaca. Por otra parte no debe existir reconocimiento de proteínas de otras especies vegetales para no incurrir en falsos positivos.

Entre las materias primas más empleadas como sustituto del trigo en los alimentos para celíacos se encuentran el maíz y el arroz, que no son tóxicos, aunque están filogenéticamente relacionados con los cereales tóxicos (ver Figura 2). Esto hace que algunas estructuras proteicas se encuentren presentes en estas especies también estén representadas en los cereales tóxicos. En algunos casos ha sido informada la reactividad cruzada de anticuerpos antigliadina con prolaminas de maíz o arroz (Skerritt y Lew, 1990; Aubretch, Horacseck y col 1998), por lo que el chequeo de la especificidad de los anticuerpos a emplear en los ensayos de control es un paso inicial insoslayable.

Un enfoque que resulta intelectualmente atractivo es el de Ellis, Doyle y col. (1994), quienes obtuvieron un anticuerpo monoclonal inmunizando animales con un péptido sintético de toxicidad probada. El razonamiento detrás de este esquema es que no todas las prolaminas presentan igual densidad de péptidos tóxicos en su secuencia, por lo que al emplear anticuerpos contra la fracción prolamina total se estarán detectando muchas veces estructuras inocuas. Si se pudiese medir en forma directa la cantidad de péptidos tóxicos en un alimento esta medida estaría relacionada directamente con la toxicidad del alimento, siendo la forma más clara de probar su aptitud para el consumo. Sin embargo, el problema de determinar cuales péptidos son tóxicos, subsiste. Estos autores se aseguraron el reconocimiento de un péptido tóxico por el esquema empleado. Por otra parte este sistema adolece de distintos inconvenientes. Por un lado, resta establecer si existen otros

30

péptidos tóxicos que no sean reconocidos por el anticuerpo empleado; además se debe establecer si los anticuerpos generados por este esquema serán específicos de secuencias tóxicas o si reaccionarán con otras secuencias que, sufriendo pequeñas alteraciones en su secuencia pierdan su toxicidad pero sigan siendo reconocidas por el anticuerpo.

Como se aprecia, si bien este enfoque es teóricamente el más acertado, los inconvenientes prácticos que se presentan por el momento hacen que sea imposible establecer fehacientemente si el anticuerpo usado reconoce todas y solamente las secuencias tóxicas. Hasta el momento los procedimientos más empleados son la obtención de anticuerpos contra distintas fracciones de prolaminas como se describiera anteriormente.

# Inconvenientes introducidos por el tratamiento térmico

Todos los métodos inmunoquímicos presentan a su vez un inconveniente teórico que es que muchas veces deben ser aplicados sobre muestras cuya estructura proteica ha sido alterada por los tratamientos realizados durante la preparación del alimento. Siendo la interacción del anticuerpo con su antígeno una interacción fuertemente dependiente del estado conformacional de ambos, cualquier alteración introducida en la estructura del antígeno podrá alterar el reconocimiento del anticuerpo. Muchos alimentos sufren procesamientos complejos que llevan a sus proteínas constituyentes a cambios conformacionales a causa de cambios de pH, tratamientos térmicos, cambios en la polaridad de la matriz, fenómenos de interfase, etc. Todos estos cambios pueden alterar la estructura proteica. En particular el calentamiento produce efectos drásticos sobre las estructuras proteicas, pudiendo, como veremos a lo largo de este trabajo de Tesis, tener distintos efectos sobre la detección de los ensayos inmunoquímicos de cuantificación.

La mayoría de los alimentos que contienen harina de trigo o sus derivados son sometidos a distintos procesos de calentamiento, los cuales dependerán del tipo de producto en cuestión. Entre los distintos tratamientos posibles encontramos el secado a temperaturas bajas (60-100°C) en el caso de las pastas (Manzini y Pavan, 1987), procesos de extrusión, que involucran calentamientos de la pasta del alimento durante tiempos muy cortos a temperaturas entre 80°-250°C con cambios de presión simultáneos para lograr texturas características (Linko, Colonna y col., 1981; Li y Lee, 1996; Li y Lee, 1997). Otro tratamiento muy común al que pueden ser sometidas las proteínas de trigo durante el procesamiento es el horneado a altas temperaturas. En el caso de panificación la temperatura del horno puede llegar hasta 250°C, según el tipo de producto (Zanoni, Peri y col. 1993). Las proteínas, sometidas a estas temperaturas pueden sufrir distintos grados de desnaturalización debido a la ruptura de las interacciones no covalentes que las estabilizan en su conformación nativa (Khechinashvili, Janin y col. 1995). La temperatura de desnaturalización dependerá del tipo de interacciones que estabilicen la estructura nativa. A su vez, dependiendo de la temperatura de calentamiento pueden ocurrir otras alteraciones como formación de dobles enlaces por B-eliminación de agua en residuos de serina o treonina (Greenwood y Munro, 1979), desamidación de asparagina o glutamina o ruptura de enlaces S-S (Volkin, Mach y col. 1995). Como hemos visto, la glutamina es un aminoácido mayoritario en las prolaminas de trigo. Si bien es más resistente a la desamidación térmica que asparagina, dependiendo del tipo de tratamiento térmico al que se someta el alimento se podrían llegar a grados de deamidación importantes. También son catalizadas por el calor las reacciones de condensación tipo Maillard entre residuos ɛ amino de lisina de las proteínas con glúcidos presentes en la matriz del alimento (Zanoni, Peri y col. 1995). Los puentes S-S son lábiles al calentamiento, especialmente a pH alcalino. Pueden romperse por mecanismos de  $\beta$ -eliminación y liberación de sulfuros o también sufrir reacciones de intercambio con restos sulfhidrilo libres. Esta última reacción tiene lugar indudablemente durante la formación de la masa y el horneado (Belitz, Kieffer y col. 1986), siendo en parte responsable del establecimiento de la malla proteica que se forma durante el amasado, principal responsable de las características de los productos panificados (Feillet, Ait-mouth y col. 1989; Schofield, Bottomley y col. 1983, Gao, Ng y col. 1992; Lavelli, Guerreri y col. 1996). Para estos procesos el contenido de agua de la muestra resulta una variable crítica que puede influir en el grado de alteración que sufran las proteínas (Weegels, de Groot y col. 1994 a y b). No solamente durante la panificación existen evidencias de alteraciones en la distribución de puentes disulfuro entre las proteínas de trigo. Estudios realizados sobre extrudados de pastas de trigo muestran que en dicho proceso también ocurrirían intercambios sulfhidrilo-disulfuro formando mallas proteicas entre las distintas gliadinas y gluteninas con los cambios en las propiedades del producto y alteraciones de solubilidad (Li y Lee, 1998). Estas reacciones estarían involucradas en los distintos tipos de tratamiento térmico a los que sean sometidas las proteínas de trigo (Weegls, de Groot y col, 1994).

# **OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL**

Los procesos que alteran las estructuras de las proteínas de los alimentos, consecuentemente influyen en la interacción que se establece entre dichas proteínas y los anticuerpos específicos empleados para su cuantificación. El objetivo de este trabajo de Tesis es estudiar los efectos introducidos por distintos tratamientos térmicos en la inmunodetección de gliadinas, a fin de mejorar los métodos inmunoquímicos de cuantificación de prolaminas en alimentos para pacientes celíacos.

A fin de lograr el cumplimiento de los objetivos generales, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- desarrollar distintas metodologías analíticas y preparativas a fin de lograr aislar y caracterizar fracciones purificadas de prolaminas de distintos cereales. El desarrollo de las distintas metodologías se describe en la Parte I de este trabajo.

- caracterizar los distintos anticuerpos antigliadina con que se cuenta para la realización de ensayos de cuantificación de prolaminas en alimentos aplicando la metodología desarrollada. La caracterización de la reactividad de los distintos anticuerpos antigliadina, así como la optimización de los ensayos de detección se describe en la Parte II de este trabajo de Tesis Doctoral.

- evaluar el efecto del calentamiento sobre la inmunodetección de gliadinas trabajando en sistemas modelo de alimentos. Estos trabajos se describen en la Parte III de este trabajo de Tesis Doctoral.

- aplicar la metodología desarrollada a lo largo del trabajo de tesis en el estudio de otros aspectos de la problemática de la enfermedad celíaca. Los resultados de estos trabajos son suscintamente comentados en el Anexo I de este trabajo de Tesis Doctoral. PARTE I: DESARROLLO DE METODOLOGÍA DE UTILIDAD PARA EL ESTUDIO DE LA PROBLEMÁTICA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA Y SU TRATAMIENTO.

# SECCION I: DESARROLLO DE METODOS DE PURIFICACION DE PROLAMINAS

#### **INTRODUCCION**

Desde que se describió el sistema de proteínas del grano de trigo se apreció su gran complejidad. A medida que se dispuso de técnicas analíticas cada vez más poderosas se fue descubriendo que las extracciones secuenciales tradicionales (Osborne, 1908) producían fracciones con un gran número de componentes y en muchos casos estas fracciones contenían, en pequeña proporción, proteínas pertenecientes a otras fracciones. En paralelo con la aparición de diferentes técnicas de análisis se desarrollaron métodos de separación para proteínas de reserva de los distintos cereales. Esta tarea presenta el formidable desafio constituído por la alta homología entre los componentes de las fracciones glutenina y gliadina, dificultando el desarrollo de métodos de purificación que permitan aislar componentes unitarios.

Tradicionalmente, la electroforesis ha sido una de las principales metodologías utilizadas para el análisis de gliadinas. Ha sido empleada para la caracterización e identificación de cultivares de trigo y la relación entre perfil de proteínas y la calidad de panificación (Bietz y Simpson 1992; MacRitchie, du Cros y col., 1990). A fines de la década pasada fue descripto el uso de un sistema electroforético, especialmente diseñado con fines preparativos, en la purificación de proteínas vegetales (Curioni, Dal Belin Peruffo y col., 1988). La metodología preparativa fue aplicada al sistema de proteínas de reserva de trigo para obtener gluteninas de alto peso molecular mediante electroforesis disociante, en presencia de SDS, (Curioni, Dal Belin Peruffo y col., 1989). También ha sido descripto un sistema a pH ácido para la purificación de gluteninas de bajo peso molecular (Curioni, Morel y col., 1995). Esta metodología es atractiva debido a que a pH ácido las prolaminas presentan una solubilidad aceptable sin sufrir alteraciones estructurales como las que tienen lugar cuando se las expone a solventes orgánicos, en el caso de los fraccionamientos por RP-HPLC, o cuando se realizan separaciones en presencia de SDS.

A fin de obtener fracciones de prolamina purificadas y sin alteraciones en su estructura para poder emplearlas en estudios posteriores se decidió optimizar un sistema de purificación de prolaminas mediante electroforesis a pH ácido.

#### **MATERIALES Y METODOS**

Muestras empleadas: como material de partida para la purificación se emplearon extractos etanólicos de cereales preparados de la siguiente manera. Se extrajo la harina de los cereales (trigo – *Triticum aestivum* L. cv. Oasis, cebada – *Hordeum vulgare* y centeno *Secale cereale*) con etanol acuoso 70% (v/v) (10ml/g de harina). Luego de 1 hora de agitación suave, los extractos fueron centrifugados (10 min, 10000xg, 8°C), separando el sobrenadante para los ensayos de purificación. Los extractos fueron obtenidos en el momento de proceder a la separación.

Electroforesis preparativa: Se empleó un sistema de separación modelo PrepCell 491 de Bio Rad. Se realizaron electroforesis en distintos sistemas de geles, dependiendo del tipo de prolaminas a separar. Para la separación de gliadinas, secalinas y hordeínas se emplearon electroforesis a pH ácido. En este sistema, luego de distintas pruebas respecto a la concentración de poliacrilamida en el gel se decidió emplear geles de poliacrilamida 7% (p/v) usando los reactivos en las mismas proporciones empleadas para los geles analíticos de A-PAGE detalladas en el Anexo II. Se probaron geles preparativos de distinta longitud, a fin de evaluar el cambio en el poder de separación según la longitud del gel empleado. Una vez obtenido el gel de poliacrilamida, se realizó una precorrida en ausencia de muestra empleando buffer 0,012 M de ácido láctico/lactato de potasio pH 3,1 a fin de equilibrar el gel y remover restos de persulfato e iones plata que podrían interferir con la separación de las prolaminas. Las precorridas se realizaron a voltaje constante (200 V) durante 1 h/cm de gel. Luego de varias pruebas se decidió no emplear gel de stacking debido a que su polimerización produce una superficie demasiado despareja que atenta contra la buena separación de la muestra. Dependiendo del tamaño del gel, se sembraron hasta 3 ml de muestra, que consistía en el extracto etanólico diluído 2/3 en etanol acuoso 70% (v/v) saturado en sacarosa, conteniendo buffer 0,036 M ácido láctico/lactato de aluminio pH 3,1. La separación se realizó a voltaje constante (160V durante 30 min luego de la siembra y 250V desde los 30 min iniciales hasta el final de la corrida). La recolección de las muestras a la salida del gel se realizó mediante una bomba peristáltica y un colector de fracciones. Se recolectó a un flujo de 1 ml/h y 30 min/tubo (90 min/tubo luego de las 20 h de corrida en el caso de corridas de más de 20 h). Como solución de recolección se emplearon alternativamente buffer 0,012 M ácido láctico/lactato de aluminio pH 3,1 o ácido acético 0,010 M. Las distintas fracciones obtenidas luego de cada corrida fueron analizadas mediante electroforesis analítica a pH ácido (A-PAGE) y por SDS-PAGE.

Debido a que en el caso de las secalinas algunas fracciones presentaron una movilidad electroforética similar a pH ácido, se optimizó una separación de estas fracciones mediante electroforesis preparativa por SDS-PAGE. Se emplearon geles preparativos en gradiente 10 – 15% de poliacrilamida, empleando los reactivos en las mismas proporciones detalladas para los geles analíticos en SDS-PAGE detallados en el Anexo II. Debido al calor liberado por la reacción de gelificación en estas condiciones, las proporciones de TEMED y persulfato de amonio fueron reducidas a la tercera parte. Una vez gelificada la poliacrilamida se equilibró el gel precorriendo el sistema en ausencia de muestra con el mismo buffer de electrodo usado en la separación de la muestra (tris-HCl 0,01M pH 8,4). Las precorridas se realizaron a voltaje constante (200 V) durante 1 h/cm de gel. No se empleó gel de stacking, por las causas anteriormente descriptas. Las muestras separadas fueron extractos etanólicos mezclados con buffer muestra (ver Anexo II) sin colorante. La separación se realizó a voltaje constante (200 V). La recolección se realizó en forma similar a la descripta para electroforesis preparativa a pH ácido. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante geles analíticos de A-PAGE y SDS-PAGE.

**Electroforesis analítica**: Se empleó un sistema analítico modelo MiniProtean II de Bio Rad. La composición de la mezcla de gelificación y los buffers empleados se detalla en el Anexo II. Para el análisis por A-PAGE se emplearon geles de 7% (p/v) de acrilamida. A fin de equilibrar el gel y remover restos de plata (Ag+) y persulfato de amonio empleados en la gelificación se realizó una precorrida a voltaje constante (160V) empleando buffer 0,012M de ácido láctico/lactato de potasio pH 3,1 durante 2 h. Las muestras a analizar se prepararon mezclando 4/5 de las fracciones obtenidas mediante electroforesis preparativa y 1/5 de buffer muestra para A-PAGE (ver Anexo II). Las muestras se analizaron sembrando 15 µl/calle. Las corridas se realizaron a 200 V constantes (160V mientras el frente de corrida atravesaba el gel de stacking). En todos los casos se realizaron corridas empleando gel de stacking con 3% (p/v) de poliacrilamida. El revelado del gel se realizó empleando Coomasie Brillant Blue R 0,1% (p/v) en ácido tricloroacético 12% (p/v).

Para el análisis por SDS-PAGE se emplearon geles en gradiente 10 - 15% (p/v) de poliacrilamida y un gel de stacking de 3% (p/v) de poliacrilamida. El buffer de electrodo empleado fue tris-glicina (0,15 M; pH 8,0) conteniendo 0,1% dodecilsulfato de sodio (SDS). Las muestras fueron extractos de harina realizados a una relación 1 g/10ml de buffer tris-HCl (0,1 M; pH 6,5) 0,1% (p/v) SDS, 5% (p/v) 2-mercaptoetanol, 0,1mg/ml de azul de bromofenol. En estas condiciones son extraídas todas las proteínas presentes en el grano. La separación se realizó a voltaje constante (120 V durante el paso por el gel de stacking y 200V para el gel de separación). Las muestras a analizar se prepararon mezclando 4/5 de las fracciones obtenidas mediante electroforesis preparativa y 1/5 de buffer muestra para SDS-PAGE (ver Anexo II), a razón de 15 µl/calle. El revelado del gel se realizó mediante incubación de los geles 24 h en Coomasie Brillant Blue R 0,1% (p/v) en una mezcla 6:2:1 de agua, metanol y ácido acético y posterior decoloración en la misma mezcla de solventes libre de colorante.

**Medición de la concentración proteica**: Se realizó empleando el método descripto por Lowry, Rosebrough y col. (1951). Para las muestras de extracción etanólica se llevó a cabo la calibración con un standard de gliadina comercial disuelto en etanol acuoso al 70% y valorado por la técnica de Kjeldahl (Bradstreet, 1965).

#### RESULTADOS

La optimización de las condiciones de separación se realizó empleando extractos etanólicos de harina de trigo. Se emplearon geles preparativos de poliacrilamida 7% (p/v) de 5 cm de longitud. Se realizaron corridas sembrando distinta cantidad de muestra para analizar la capacidad de carga del sistema. En la **Figura 1.1.1** se muestran los resultados del análisis de una separación de un extracto etanólico conteniendo 20 mg de proteína.



Figura 1.1.1: Análisis por A-PAGE de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa empleando un gel de 5 cm de longitud. Calle 1: extracto etanólico de harina de trigo. Calles 2-20 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa. Se indica el tiempo de elución de cada fracción.

En la calle 1 se muestra la separación del mismo extracto etanólico sembrado en la corrida preparativa. Se detallan las distintas regiones de movilidad correspondientes a las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas. Como se puede observar, se obtienen distintas fracciones purificadas a lo largo de la corrida preparativa. El orden de elución del gel preparativo está de acuerdo a la movilidad creciente observada en los sistemas analíticos. Las  $\alpha$ -gliadinas, de mayor movilidad, son las primeras en ser eluídas (entre 6 y 7 h, calles 2-4). Luego son eluídas las  $\beta$ -gliadinas (entre 7 y 9 h, calles 5-10) y las  $\gamma$ -gliadinas (entre 8,5 y 13 h, calles 10-12). Se observa que estas fracciones, son parcialmente separadas, apareciendo como una banda ancha en el sistema analítico, lo que se debe a la presencia de varios componentes en la fracción con movilidades ligeramente diferentes. Las  $\omega$ -gliadinas, de menor movilidad que las otras, son eluidas a tiempos mayores (entre 16 y 40 h, calles 13-20). Se obtienen diferentes fracciones de  $\omega$ -gliadinas, las que pueden ser clasificadas en dos grupos, de acuerdo a su movilidad en estos sistemas. Las gliadinas eluídas entre 16 y

20 h se denominarán gliadina  $\omega$ -rápida, mientras que las eluídas a tiempos mayores serán denominadas  $\omega$ -lenta. Así, a las 16 h de corrida son eluídas las primeras gliadinas  $\omega$ -rápida (calle 13). Posteriormente son eluídas diferentes fracciones de  $\omega$ -rápida (calles 14-18, entre 16 y 20 h). Las  $\omega$ -lentas son eluídas bastante tiempo después, a las 28-40 h de corrida. Se observa un gran aumento de los tiempos de elución para las fracciones de menor movilidad. Esto a su vez conlleva a una mejor capacidad de separación del sistema preparativo para las fracciones de menor movilidad.



**Figura 1.1.2:** Sistema de electroforesis preparativa empleado para la purificación de prolaminas. Se detalla el mecanismo de circulación de buffer de recolección en la parte inferior del gel. Para una mejor visualización el buffer de electrodo y el de recolección se representan en colores diferentes.

Empleando geles preparativos de 5 cm de longitud se probaron distintas soluciones de elución dado que el equipo empleado permite colectar la muestra eluída en un buffer distinto al buffer de electrodo. En la **Figura 1.1.2** se observa una representación del sistema electroforético, donde se muestra el sistema de cámaras separadas que permite seleccionar el buffer de recolección de la muestra. Se observó que el tipo de buffer empleado no afecta el poder de resolución de la separación, sin embargo sí influye en la cantidad de muestra recuperada. Empleando ácido acético como solución de elución se recupera menos del 5% de la proteína sembrada (valor estimado en base a la cuantificación de la proteína recuperada realizada sobre un "pool" de las fracciones eluídas). Al usar buffer ácido láctico/lactato de aluminio 0,012M pH 3,1 la recuperación supera el 50%. Esta diferencia puede deberse a precipitación de gliadinas a la salida del gel preparativo. Como se puede apreciar en el detalle de la Figura 1.1.2, una membrana de diálisis colocada en la base del gel impide que las proteínas sigan migrando impulsadas por el campo eléctrico. En este punto las proteínas, debido al diseño particular del equipo empleado, son

arrastradas por un flujo tangencial de solución de elución hacia el ducto recolector. El empleo de ácido acético como eluyente, a pesar de ser un buen solvente para prolaminas, implica un cambio de medio para las proteínas, lo que puede provocar su agregación. De hecho, fue observado un material insoluble en la base del gel cada vez que se empleó ácido acético como buffer de elución. Este material agregado fue mucho menor o no fue observado cuando se empleó el buffer lactato para esta función. Este buffer, al ser el mismo que el buffer de electrodo, no produce ningún cambio en el medio, minimizando los fenómenos de agregación a la salida del gel. Esto puede explicar la gran diferencia en la cantidad de proteína recuperada cuando se empleó el sistema de buffers láctico/lactato de aluminio como solución de elución.

A su vez se realizaron pruebas de la capacidad de separación que presenta el sistema preparativo empleando geles a pH ácido, con cantidades crecientes de proteína. Los resultados mostrados en la Figura 1.1.1 fueron obtenidos con siembras de 20 mg totales de proteína (dosada por el método de Lowry en el extracto etanólico de harina). Se probaron cantidades crecientes de proteína, incrementando de a 10 mg la carga total. Resultados similares a los mostrados fueron observados al separar 30 mg de proteína total. La resolución de la separación fue disminuída al sembrar 40 mg de proteína. El uso de cantidades mayores de proteína empeoró aun más la calidad de la separación, observándose incluso precipitados proteicos dentro del gel de separación. Esto puede deberse a que, cuando la muestra se introduce en el gel impulsada por el campo eléctrico, un aumento de la masa de proteína sembrada produce un aumento de la concentración proteica local en el interior del gel. Este aumento local de concentración proteica puede ser el responsable de los fenómenos de agregación observados. En experiencias posteriores se trabajó sembrando siempre una masa de proteína menor a 30 mg.

Con el objeto de analizar la variación de la capacidad de separación con el largo del gel preparativo se realizaron separaciones empleando geles de distinta longitud. A fin de aumentar la capacidad de resolución del sistema se probaron geles preparativos de 10 cm de longitud (correspondiente a 80 ml de poliacrilamida 7% p/v).

El análisis de las fracciones obtenidas a partir de un gel de estas características es mostrado en la **Figura 1.1.3**. En la calle 1 se muestra la separación del extracto etanólico empleado en la electroforesis preparativa. Como se puede observar, se obtiene un gran número de fracciones diferentes. Las  $\alpha$ -gliadinas son eluídas entre las 9,3 y 10,6 h de corrida (calles 2-4). Distintas mezclas de  $\beta$ -gliadinas son obtenidas entre las 11,3 y 13,5 h de corrida (calles 5-11). Las  $\gamma$ -gliadinas son obtenidas entre las 13 y 16 horas de corrida (calles 11-15). Entre las 24 y 30 horas de corrida son eluídas distintas fracciones de  $\omega$ rápida (calles 16-21). Se evidencia la mayor capacidad de resolución que se obtiene al aumentar el tamaño del gel de separación debido a que se obtiene un mayor número de fracciones diferentes que con geles de 5 cm. En muchos casos se separan componentes que no podían ser separados en los otros sistemas, como por ejemplo los correspondientes a la fracción  $\omega$ -rápida. A su vez se observa el aumento en los tiempos de elución de las distintas fracciones, debido a la mayor distancia que estas deben recorrer dentro del gel antes de ser eluídas. Este fenómeno es más notable en las fracciones de menor movilidad.



Tiempo de elución (h)

Figura 1.1.3: Análisis por A-PAGE de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa empleando un gel de 10 cm de longitud. Calle 1: extracto etanólico de harina de trigo. Calles 2-21 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa. Se indica el tiempo de elución de cada fracción.



Figura 1.1.4: Análisis por A-PAGE de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa empleando un gel de 2 cm de longitud. Calle 1: extracto etanólico de harina de trigo. Calles 2-16 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa. Se indica el tiempo de elución de cada fracción.

Las  $\omega$ -rápidas son eluídas en distintas fracciones entre 28 y 40 h de separación. Las corridas fueron finalizadas luego de 45 h de separación sin que hubiesen sido eluídas las  $\omega$ -lentas, que presumiblemente continuaban retenidas en el gel de separación debido a su muy baja movilidad electroforética.

Se emplearon también geles de separación de menor longitud. La Figura 1.1.4 muestra el análisis de las fracciones obtenidas a partir de un gel preparativo de 2 cm de longitud. Como puede observarse, las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas son eluídas entre 3 y 6 h de corrida en fracciones que son mezclas de muchos componentes de distinta movilidad (calles 2-8). Se observa claramente una pérdida de la resolución de la separación al emplear geles de tan pequeña longitud. Sin embargo, las  $\omega$ -rápidas y  $\omega$ -lentas son eluídas separadamente, sin que se observen contaminantes de otras fracciones, entre las 6 y 8 h las  $\omega$ -rápidas y 10 y 15 h las  $\omega$ -lentas. A pesar de la corta longitud del gel empleado, y la pérdida de resolución que esto conlleva, se pueden obtener fracciones purificadas de  $\omega$ -rápidas y  $\omega$ -lentas en tiempos bastante menores que con geles de mayor longitud. Debido a la baja movilidad de las  $\omega$ -gliadinas, estas son fácilmente separables de las otras fracciones aun con geles preparativos de poca longitud.

Fracción	Tiempo de retención (h)		
	Gel de 10 cm	Gel de 5 cm	Gel de 2 cm
α gliadinas	9,3-10,6	6-6,6	3-3,3
β gliadinas	11,3-14	7-9	3-5
γ gliadinas	13,3-18	8-12	3,3-5
ω- rápida	24-32	16-22	6-9
$\omega$ -lenta	>42	28-39	10-14

Tabla 1.1.1: Dependencia del tiempo de retención de cada fracción con la longitud del gel de separación

De esta forma, la elección de la longitud del gel de separación se puede realizar según el tipo de fracción que se desee obtener. La **Tabla 1.1.1** resume los tiempos de separación de las distintas fracciones según la longitud del gel empleado. Geles de mayor longitud son útiles para obtener fracciones purificadas de gliadinas de mayor movilidad como  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ -gliadinas, mientras que para obtener fracciones purificadas de  $\omega$ -gliadinas en menores tiempos operativos los geles de menor longitud resultan más adecuados. Por otra parte, este sistema de separación permite obtener en una sola operación fracciones purificadas de los distintos grupos de gliadinas, partiendo de un material crudo que contiene a todos los componentes de la fracción gliadina. Se obtienen mezclas de pocos

componentes de movilidad similar, que pueden ser empleadas como material de partida para otras técnicas de separación a fin de completar la separación en los componentes. El sistema presenta suficiente versatilidad para emplearlo en la purificación de la fracción de gliadina que se desee. La longitud del gel de separación es una de las variables críticas a ser optimizadas para balancear, el poder de separación deseado, la duración de la operación y el grado de pureza con que se desea obtener la fracción a purificar.



Figura 1.1.5: Análisis por A-PAGE de las fracciones de hordeínas obtenidas por electroforesis preparativa. Calle 1: extracto etanólico de cebada. Calles 2-10 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa.

El sistema de electroforesis preparativa a pH ácido también puede ser empleado para la purificación de prolaminas de otros cereales. En la Figura 1.1.5 se observa el análisis por A-PAGE de una separación de hordeínas empleando un gel preparativo de 4 cm de longitud. La separación se realizó a partir de extractos etanólicos de cebada. En la calle 1 se observa la separación del extracto etanólico. En estos geles, las hordeínas se separan de acuerdo a su movilidad decreciente en dos grandes grupos, las  $\gamma$ -hordeínas y las C-hordeínas. Las y-hordeínas son las proteínas de cebada que por su secuencia se las agrupa en la familia de las prolaminas tipo  $\gamma$ -, mientras que las C-hordeínas se agrupan con las prolaminas pobres en azufre, teniendo como homólogas a las o-gliadinas, entre otras (Shewry, Tatham y col. 1986). Dado que el extracto etanólico se preparó directamente con harina de cebada, en la región de las y-hordeínas pueden encontrarse albúminas o globulinas extraíbles por el etanol. Debido a una menor cantidad de componentes de movilidades altas, el empleo de geles preparativos de 4 cm produce buenos resultados en la purificación de estas proteínas. El empleo de geles de mayor tamaño no llevaría a una mejora significativa en el fraccionamiento, sino que además insumiría mayor tiempo de operación. De esta forma, distintas fracciones de  $\gamma$ -hordeínas,

de mayor movilidad son obtenidas entre 6 y 12 h de separación (calles 2-4). Se obtienen fracciones denominadas  $\gamma$ -hordeína-1 y  $\gamma$ -hordeína-2, correspondientes a las calles 2 y 4 respectivamente. Mezclas de distinta proporción de C-hordeínas son obtenidas entre 18 y 26 h de separación (calles 5-10).



**Figura 1.1.6:** Análisis por A-PAGE de las fracciones de secalinas obtenidas por electroforesis preparativa. Calles 1 y 8: extracto etanólico de centeno. Calles 2-7 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa.

La separación de secalinas por medio de geles preparativos a pH ácido se realizó empleando geles de 4 cm de longitud. En la **Figura 1.1.6** se muestra el análisis mediante A-PAGE de las fracciones obtenidas. En las calles 1 y 8 se muestra el análisis del extracto etanólico. Se pueden observar dos fracciones principales, correspondientes, como se indica en la Figura 1.1.6, a las  $\gamma$ -secalinas y  $\omega$ -secalinas (Shewry, Parmar y col., 1983). Estas prolaminas son homólogas a las  $\gamma$ -gliadinas y  $\omega$ -gliadinas de trigo respectivamente (Shewry, Tatham y col., 1986). Se eligió un gel separativo de 4 cm dado que el patrón de proteínas a separar es relativamente sencillo, con una diferencia apreciable de movilidad entre sus componentes principales. Mediante electroforesis preparativa a pH ácido se pudieron obtener en forma aislada fracciones de  $\gamma$ -secalinas y  $\omega$ -secalinas (Figura 1.1.6, calles 2 y 4-7 respectivamente).



Figura 1.1.7: Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de secalinas y hordeínas obtenidas por electroforesis preparativa. Se indica la masa molecular al margen del gel. Calle 1: extracto etanólico de centeno. Calle 2:  $\omega$ -secalinas. Calle 3:  $\gamma$ -secalina35 Calle 4: marcadores de peso molecular. Calles 5 y 9: extracto etanólico de cebada. Calle 6: C-hordeína. Calle 7:  $\gamma$ -hordeína 2. Calle 8:  $\gamma$ -hordeína-1.

La composición de cada fracción de hordeínas y secalinas purificadas fue analizada mediante SDS-PAGE (Figura 1.1.7). En las calles 1-3 se analizaron distintas muestras de centeno, mientras que en las calles 5-9 se muestra el análisis de muestras de cebada. En la calle 1 corresponde al extracto etanólico de centeno. Se observan tres componentes mayoritarios de pesos moleculares aproximados entre 47 y 75 kDa. Estos componentes corresponden a las  $\gamma$ -secalinas, el de menor peso molecular, las  $\omega$ -secalinas de masa molecular intermedia (alrededor de 60 kDa) y un componente de mayor masa molecular. Este componente es una fracción propia de las prolaminas de centeno denominado ysecalina de 75 kDa (Tatham, Shewry y col., 1990). Esta fracción no presenta homólogos en otros cereales. A su vez, en la misma calle 1 se observan componentes minoritarios de menor masa molecular, correspondientes, presumiblemente, a albúminas extraídas parcialmente por el etanol. Ha sido descripto (Shewry, Parmar y col., 1983) que la ysecalina de 75 kDa (γ-secalina75) presenta una movilidad similar a las ω-secalinas al ser analizadas mediante A-PAGE. Esto se puede corroborar al analizar la fracción de osecalina obtenida por A-PAGE preparativo (calle 2). Esta fracción, que resultaba homogénea en el análisis de A-PAGE (Figura 1.1.6 calles 4-7) presenta dos componentes de distinta masa molecular, correspondiendo uno a las o-secalinas (masa molecular aproximada, 60 kDa) y otro a la fracción y-secalina75. Por otro lado, las y-secalinas obtenidas por A-PAGE preparativo (Figura 1.1.5 calle 2) se mostraron homogéneas y de masa molecular aproximada de 40 kDa en el análisis de SDS-PAGE (Figura 1.1.7, calle 3). El análisis de las fracciones de cebada muestra que el extracto etanólico esta constituído

por varios componentes de masas moleculares entre 35 y 70 kDa (Figura 1.1.7 calles 5 y 9). La fracción mayoritaria corresponde a las  $\gamma$  y B-hordeínas, de masas entre 35 y 45 kDa, mientras que las bandas de mayor peso corresponden a las C-hordeínas. Se aprecia también la presencia de una fracción de entre 15 y 20 kDa, que podría corresponder presumiblemente a hordeínas de bajo peso molecular o a albúminas y globulinas parcialmente extraídas por el etanol (Shewry, Field y col. 1982). En la calle 6 se muestra el análisis de la fracción C-hordeína. Se observa la presencia de dos bandas mayoritarias de pesos aproximados 55 y 65 kDa, típicos de las C-hordeínas y una tenue banda de masa aproximada en 40 kDa. Esta banda podría corresponder a una leve contaminación con B-hordeínas. En la calle 7 se observa el análisis de la fracción  $\gamma$ -hordeína-2, que presenta componentes de alrededor de 40 kDa de masa molecular, mientras que la fracción  $\gamma$ -hordeína-1 presenta un componente mayoritario de 20 kDa de masa.



Figura 1.1.8: Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa empleando un sistema desnaturalizante en un gel en gradiente 10-15% de poliacrilamida de 4 cm de longitud. Calles 1 y 16: marcadores de peso molecular. Calles 2-18 fracciones colectadas a lo largo de la electroforesis preparativa.

A fin de obtener por separado las fracciones  $\omega$ -secalina y  $\gamma$ -secalina75, que no pueden ser separadas mediante A-PAGE, se realizó una electroforesis preparativa empleando un gel en gradiente 10-15% de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PREP-PAGE), a fin de obtener una separación de acuerdo a la masa molecular de los distintos componentes. La adaptación de la técnica de formación de gradientes y SDS-PAGE al sistema preparativo fue realizada sin inconvenientes. Se eligió trabajar con un gel de 4 cm de longitud dada la baja movilidad de la fracción de 75 kDa que se deseaba aislar. En la **Figura 1.1.8** se muestra el análisis de las fracciones obtenidas de esta forma. En las calles 2-4 se observa la presencia de fracciones de baja masa molecular (3-5 horas de corrida). La fracción  $\gamma$ -secalina45 se obtiene entre las 9-15 h de corrida (calles 7-15). Antes de que haya sido totalmente eluída la fracción  $\gamma$ -secalina 45, comienza a ser eluída la fracción  $\omega$ -secalina (calles 12-14), por lo que si bien la  $\gamma$ -secalina 45 se obtiene en forma purificada, también se obtiene una mezcla de ambas fracciones,  $\gamma$ -secalina 45 y  $\omega$ -secalina. La fracción  $\gamma$ -secalina75 se puede obtener aislada luego de las 19 h de corrida (calles 17-18). En resumen, mediante esta técnica pueden ser separadas tres fracciones, las  $\gamma$ secalinas45 (calles 7-10) las  $\omega$ -secalinas, mezcladas con  $\gamma$ -secalina45 (calles 13-14) y las  $\gamma$ secalinas75 (calles 17-18). El sistema preparativo empleando SDS-PAGE resultó de sencilla implementación y permitió obtener fracciones aisladas de  $\gamma$ -secalina75 purificada. Para la obtención de las  $\omega$ -secalinas aisladas deberían emplearse geles preparativos de mayor poder de separación o emplear como material de partida de la purificación la mezcla de  $\omega$ -secalina 75 obtenida por A-PAGE preparativo.

#### CONCLUSIONES

Se desarrolló una metodología de purificación de prolaminas que permite obtener fracciones purificadas en cantidades del orden de los miligramos. Esta metodología, que emplea los principios electroforéticos de larga tradición en el análisis de prolaminas, puede ser usada como un método de obtención de fracciones purificadas a partir de un material crudo en un solo paso de separación. Si se desea un grado de pureza mayor, las fracciones así obtenidas pueden ser separadas por otras técnicas que empleen otros principios de separación tales como RP-HPLC o SDS-PAGE preparativo, como se mostró en esta sección. La variación de la longitud del gel de separación resulta una variable experimental sencilla de controlar que permite seleccionar la capacidad de separación del sistema de acuerdo a la complejidad del patrón de proteínas a separar.

Dentro de la problemática de la enfermedad celíaca planteada en esta Tesis Doctoral, el poder contar con fracciones purificadas de distintas prolaminas es de utilidad en distintos aspectos. La caracterización de la especificidad de anticuerpos anti-prolamina puede ser realizada en forma sencilla si se cuentan con prolaminas purificadas, como se discutirá en la Parte II. A su vez, las fracciones purificadas podrían emplearse en planes de inmunización tendientes a obtener antisueros o anticuerpos monoclonales contra alguna fracción en particular. Estas fracciones también son de utilidad para el estudio de la estabilidad térmica de los distintos componentes de la fracción gliadina, tendientes a establecer ensayos de cuantificación de prolaminas en alimentos que sean mínimamente afectados por el tratamiento térmico de la muestra, como se verá en la Parte III, el contar con fracciones purificadas será de crucial importancia. Por otro lado, aún hay muchos aspectos de la patogénesis de la enfermedad celíaca que no han sido esclarecidos. En especial respecto a las diferencias que pueden existir en la respuesta frente a las distintas fracciones de gliadina. El estudio de esta respuesta diferencial sólo se puede llevar a cabo contando con metodologías de purificación de prolaminas como la descripta en este capítulo. El establecimiento de una respuesta humoral diferencial frente a ciertas fracciones puede conducir a mejoras en los métodos de diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca, como se verá en el Anexo I. A su vez, pueden existir diferencias en el procesamiento antigénico que sufren las distintas prolaminas, lo que puede condicionar aspectos de la patogenia de la enfermedad. Estos aspectos serán estudiados en sistemas in vitro, para lo cual se emplearán distintas fracciones de gliadinas purificadas siguiendo los métodos desarrollados y descriptos en este capítulo.

# SECCION II: OPTIMIZACION DEL ANÁLISIS DE PROLAMINAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR. APLICACION A DISTINTOS CEREALES

# **INTRODUCCION**

Como se mencionara previamente, el análisis de proteínas de reserva de cereales presenta un gran desafio para la bioquímica de alimentos. La presencia de un gran número de componentes, de estructura y propiedades fisicoquímicas similares resulta de una alta complejidad, debiendo emplearse técnicas analíticas de gran poder de separación para lograr una buena caracterización.

En años recientes la electroforesis capilar, ha ganado difusión, por su gran versatilidad y alta eficiencia de separación en distintos sistemas (Perrett y Ross, 1992). La técnica se basa en el empleo de capilares de sílica fundida de pequeño diámetro, en donde se realiza la separación electroforética (Monning y Kennedy, 1994). Las dimensiones del sistema permiten operar con voltajes del orden de los kilovoltios a bajas corrientes (del orden de los microamperes). En estas condiciones son evidenciadas aun muy pequeñas diferencias de movilidad electroforética, permitiendo la separación de componentes no separables por metodologías convencionales. La presencia de cargas superficiales fijas en el capilar (los grupos silanol en los capilares de sílica fundida, aunque también pueden emplearse capilares modificados que presenten otra carga superficial) genera una migración de contraiones móviles que a su vez origina un flujo osmótico del solvente soporte. Este flujo electroendosmótico puede ser empleado como impulsor de sustancias neutras, las cuales pueden ser también separadas mediante la adición de elementos que interaccionen diferencialmente con ellas. El empleo de distintos aditivos a los sistemas de separación permite separar sustancias por distintos principios fisicoquímicos, confiriendo una gran versatilidad al sistema de separación. Existen familias de técnicas relacionadas como la electroforesis capilar micelar (MECK), electroforesis capilar quiral, etc. (Blanc, Schaufelberger y col. 1997).

La electroforesis capilar ha sido aplicada exitosamente a la separación de prolaminas. Werner, Wikwtowik y col. (1995) describieron por primera vez una técnica de electroforesis capilar aplicada a la separación de gliadinas. Emplearon un sistema de electroforesis de frente libre a pH 8,5; usando un reversor de flujo electroendosmótico de manera tal que las gliadinas eran eluidas del sistema en el mismo orden en que migraban en el sistema de electroforesis analítico A-PAGE. Posteriormente se describió el uso de buffers lactato de pH ácido, muy similares a los empleados en A-PAGE. Sin embargo, los mejores resultados analíticos fueron obtenidos por Lookhart y Bean (1995c) quienes adaptaron un sistema de buffer fosfato pH 2,5 con un aditivo (hidroxipropilmetilcelulosa,

HPMC) que otorga viscosidad al medio y ejerce un efecto de tamiz molecular. En estas condiciones se obtiene una separación de las gliadinas de acuerdo a su relación carga/masa. A pH bajo los grupos ionizables de la sílica se encuentran protonados, de manera que el flujo electroendosmótico se ve minimizado. En trabajos posteriores estos autores demostraron la aplicación del sistema de electroforesis capilar a prolaminas de avena y arroz (Lookhart y Bean 1995a) y optimizaron los aditivos a emplear en el sistema de separación de gliadinas (Lookhart y Bean, 1996).

A fin de contar con un método de análisis de prolaminas de alta performance se procedió a optimizar la separación de gliadinas por electroforesis capilar empleando un sistema de buffers fosfato pH 2,5 similar al descripto por Lookhart y Bean (1996). Se puso énfasis en optimizar el poder de separación y minimizar los tiempos de operación regulando las condiciones de voltaje y temperatura de la corrida y el porcentaje de HPMC añadido. Una vez optimizadas las condiciones de trabajo se correlacionaron los distintos picos del perfil de separación empleando fracciones purificadas por el sistema preparativo descripto anteriormente, con el patrón de bandas obtenidos por técnicas tradicionales como el A-PAGE. De esta manera, una vez identificados los picos en el electroferograma, se puede aplicar la electroforesis capilar para la caracterización de fracciones de gliadina. También se aplicó el sistema a otros cereales.

#### **MATERIALES Y METODOS**

**Muestras analizadas:** para los experimentos de optimización de la separación por electroforesis capilar y caracterización de perfiles de distintas prolaminas, se trabajó con extractos etanólicos directos de cereales obtenidos de la misma forma que se describió anteriormente. Antes de ser inyectados en el equipo de electroforesis capilar los extractos fueron centrifugados 5 min a 10000xg, 8°C y luego filtrados a través de filtros de 0,22 μm. Las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa fueron inyectadas en el equipo de electroforesis capilar los extractos de cereales obtenidas a través de filtros de 0,22 μm.

Electroforesis capilar: Las electroforesis se realizaron empleando un equipo P/ACE 2000 de Beckman (USA). Se utilizaron capilares de sílica fundida de 25  $\mu$ m de diámetro interno (Thermal Separations USA), de una longitud total de 28 cm (18 cm hasta el detector). Las corridas fueron registradas mediante un detector UV de arreglo de diodos entre 190 y 300 nm. Los resultados mostrados corresponden a 214 nm, donde se observa la mejor relación señal/ruido. Se probaron distintos voltajes de separación. Los capilares nuevos, antes de ser empleados fueron acondicionados por lavados sucesivos en HCl 1M, NaOH 1M y agua, según el protocolo descripto por Lookhart y Bean (1996). Las corridas analíticas se realizaron empleando buffer fosfato 0,1M pH 2,5 20% acetonitrilo. Se probaron distintos agregados de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Antes de cada corrida el capilar fue lavado sucesivamente con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M, buffer fosfato 0,1 M pH 2,5 y buffer de corrida. La muestra se inyectó por presión, seleccionando el modo de alta presión durante 5 segundos. Los datos de la corrida fueron almacenados y exportados para ser procesados mediante software SigmaPlot (Jandel Scientific, USA). Todas las corridas mostradas han sido normalizadas con fines comparativos.

**Electroforesis analítica:** con fines comparativos se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (A-PAGE) siguiendo la técnica descripta anteriormente.

# RESULTADOS

#### Optimización de las condiciones de separación

Se realizaron corridas en distintas condiciones a fin de seleccionar aquellas que producían la mejor separación en los menores tiempos. Las variables modificadas fueron el voltaje y la temperatura de la corrida y el contenido de HPMC del buffer de separación.

**Determinación del voltaje máximo de separación**: El voltaje máximo tolerable depende de las características del sistema de buffers empleado. Para establecerlo se deben realizar pruebas aumentando el voltaje y testeando la corriente que circula por el sistema. La relación se debe mantener lineal mientras el sistema permanezca equilibrado. El calor generado por la circulación de corriente debe ser disipado por el sistema de refrigeración. Frente a un aumento excesivo del voltaje de separación, el sistema no alcanza a equilibrarse provocando aumentos de temperatura que redundan en aumentos en la movilidad iónica y por lo tanto en la corriente circulante, no permitiendo el equilibrio. La pérdida de la linealidad Voltaje vs corriente en el sistema empleado ocurre a los 22 kV. Se seleccionó la condición de 20 kV para ser empleada como máximo voltaje aplicable en las distintas corridas.

Determinación de la temperatura de separación: La temperatura de la corrida puede ser regulada a través del sistema de refrigeración. El aumento de la temperatura disminuye la viscosidad del medio y aumenta las movilidades de las distintas especies, redundando en menores tiempos de separación. Sin embargo, aumentos de temperatura pueden desequilibrar el sistema y provocar además la generación de burbujas de acetonitrilo que impedirían el paso de corriente eléctrica por el sistema, interrumpiendo la corrida. Se seleccionó la temperatura de 40°C como temperatura de corrida (todos los resultados mostrados corresponden a dicha temperatura de corrida).

**Optimización de las condiciones de separación:** La Figura 1.2.1 muestra los resultados de algunas de las condiciones analizadas en la separación de un extracto etanólico de trigo. Como se puede observar, los mayores voltajes producen separaciones de igual calidad, pero en menores tiempos (comparar electroferogramas a y b con c y d). El agregado de HPMC, al aumentar la viscosidad del medio, mejora la resolución de las separaciones de proteínas pues ejerce un efecto de tamiz molecular. Sin embargo, al aumentar la viscosidad se produce un retraso en la migración de las distintas proteínas. La concentración usualmente empleada en estas separaciones (Lookhart y Bean, 1995a;

Lookhart y Bean, 1996; Werner y Wiktowikz, 1995) es de 0,05% (p/v). El uso del mismo aditivo a concentraciones de 0,03% (p/v) no altera la capacidad analítica del sistema, pero disminuye el tiempo de análisis, como se observa en la Figura 1.2.1 (comparar calles a y c con b y d). Las condiciones de corrida mostradas en la Figura 1.2.1 d, voltaje constante 20 kV y 0.03% (p/v) de HPMC resultaron las de mejor performance en menor tiempo de análisis y fueron empleadas en el resto de los análisis mostrados en esta tesis.



Figura 1.2.1: Separación por electroforesis capilar de un extracto etanólico de harina de trigo. Se realizaron corridas en distintas condiciones. Las variables optimizadas son el contenido de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y el voltaje de la corrida. Se muestran corridas realizadas a voltaje constante: a- Voltaje: 15 kV, HPMC 0.05%. b- Voltaje 15 kV, HPMC 0.03%. c- Voltaje: 20 kV, HPMC 0.05%.

# Caracterización del perfil de separación obtenido

A fin de identificar los distintos picos obtenidos en el análisis de gliadinas, se analizaron fracciones purificadas por electroforesis preparativa, las que también fueron analizadas por A-PAGE. La Figura 1.2.2 muestra el análisis de distintas fracciones de gliadina mediante electroforesis capilar. Estas fracciones corresponden a la separación obtenida en un gel preparativo de 5 cm, cuyo análisis fue mostrado en la Figura 1.1.1 En la Figura 1.2.2 se detalla la correspondencia con las calles de la Figura 1.1.1.



**Figura 1.2.2:** Análisis por electroforesis capilar de las distintas fracciones obtenidas en una separación por electroforesis preparativa. Se detalla la correspondencia con las calles de la Figura 1.1.1. Calle 1: extracto etanólico de harina de trigo empleado como material de partida en la electroforesis preparativa. Calles 2-20: fracciones de gliadina obtenidas por electroforesis preparativa.

Como puede observarse, hay una buena correlación entre la movilidad de las gliadinas observada en A-PAGE y en electroforesis capilar. Las fracciones de mayor movilidad en el sistema convencional también muestran la mayor movilidad en electroforesis capilar (la fracción compleja que migra entre 3 y 3,5 min en electroforesis capilar corresponde a albúminas y globulinas que son parcialmente extraídas por el etanol acuoso y por su gran movilidad escapan del gel analítico en las condiciones empleadas para el análisis de A-PAGE (Lookhart y Bean, 1995b; Bietz y Simpson, 1992). Este análisis permite diferenciar los distintos tipos de gliadinas en el complejo patrón producido por electroforesis capilar. Vemos que las  $\alpha$ -gliadinas corresponden a los primeros picos del ferograma (4,8-5,5min), las  $\beta$ -gliadinas por su parte corresponden a los picos de mayores tiempos de corrida (5,5-7min) mientras que las  $\gamma$ -gliadinas y  $\omega$ -gliadinas producen picos a tiempos mayores (7-9 min y 9-20 min respectivamente). En el sistema de electroforesis capilar nuevamente se manifiesta la gran diferencia de movilidades existente entre las  $\omega$ -gliadinas y las otras fracciones dado que las primeras son claramente definidas, ocupando más de la mitad del ferograma.

El empleo de un gran número de distintas fracciones purificadas para este análisis permite asegurar que en las condiciones de análisis de electroforesis capilar todo el perfil de gliadinas puede ser analizado, incluídos los componentes más lentos de la fracción  $\omega$ . Esta es otra diferencia con los métodos descriptos hasta el momento, que realizaban corridas de electroforesis capilar de menor duración, de manera que algunos componentes de la fracción  $\omega$  no eran observados (Lookhart y Bean, 1995b). La optimización realizada permite emplear el método para la caracterización de todos los componentes de la fracción gliadina. Esto es importante pues para caracterizar los componentes de una muestra desconocida se tiene la seguridad que todos ellos serán detectados, aun los de menores movilidades.

El análisis comparativo de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa mediante electroforesis capilar y A-PAGE a su vez nos evidencia la mayor capacidad de resolución de la electroforesis capilar, dado que muchas fracciones que por A-PAGE aparecen como una banda son resueltas en varios picos por electroforesis capilar (ver calles 2-10). Por otra parte, esta metodología permitiría realizar análisis cuantitativos integrando las áreas de los distintos picos y calcular las cantidades relativas de los distintos componentes de la fracción gliadina en una muestra dada.

La separación de prolaminas por electroforesis capilar siguiendo la metodología descripta, mostró una alta reproducibilidad. Los picos mayores observados en el extracto etanólico de harina mostraron un CV menor al 2% en cinco corridas realizadas en la misma columna en días sucesivos. Los perfiles observados siempre fueron similares. Esta cualidad, sumada a su gran poder de separación hacen de la electroforesis capilar una metodología de gran utilidad en el campo del análisis de prolaminas. Además debe tenerse

55

en cuenta la poca cantidad de muestra necesaria para el análisis (menos de 1  $\mu$ l) y el bajo volumen de reactivos empleados (del orden de los  $\mu$ l por corrida, incluyendo los lavados). Todas estas características erigen a la electroforesis capilar como una técnica de análisis que tendrá una papel cada vez más protagónico en los laboratorios dedicados al análisis de alimentos.

# Empleo de la electroforesis capilar para la diferenciación de cultivares de trigo

La caracterización del perfil de gliadinas de una muestra de harina ha sido, a su vez, empleada tradicionalmente como método para la identificación de distintas variantes genéticas de trigo, llamadas cultivares (Bietz y Simpson, 1992). Cada cultivar de trigo presenta, entre otras características diferenciales, un grupo particular de proteínas de reserva en sus granos. Pequeñas diferencias en cantidades relativas o secuencia proteica en alguno de sus componentes hace que el análisis del perfil de gliadinas de una variedad dada produzca un registro propio y característico de cada cultivar, que se emplea como identificatorio del mismo a modo de "huella digital". Esto resulta de utilidad directa pues muchos cultivares reciben usos diferentes por parte de la industria de los alimentos (algunos son de mejor calidad para panificación, otros para la preparación de galletas, galletitas, etc.). Dado el gran interés existente, distintas técnicas han sido empleadas para la identificación de cultivares de trigo. Entre las técnicas cromatográficas, la de mayor poder de resolución y actualmente más utilizada para este fin es la RP-HPLC (Bietz, 1986). En muchos laboratorios, especialmente en nuestro país, se emplean a tal fin técnicas electroforéticas. Las más empleadas son A-PAGE (Bietz y Simpson, 1992) y SDS-PAGE (Abdel Aal, Salama y col., 1996). Dada su gran performance analítica, a esta batería de técnicas podría sumarse la electroforesis capilar.

A fin de probar la capacidad de la misma en la caracterización de cultivares, fueron analizadas distintas variedades cultivadas en la provincia de Buenos Aires. La Figura 1.2.3 muestra los resultados del análisis por A-PAGE de doce cultivares diferentes.



Figura 1.2.3: Análisis por A-PAGE de extractos etanólicos de distintos cultivares de trigo. Calle 1:cv. Imperial. Calle 2: cv. Cacique. Calle 3: cv. Yapeyú. Calle 4: cv. Pericón. Calle 5: cv. Guazú. Calle 6: cv. Federal. Calle 7: cv. Charrúa. Calle 8: cv. Candil. Calle 9: cv. Isla Verde. Calle 10: cv. Liquen. Calle 11: cv. Puntal. Calle 12: cv. Pincén.

Como se puede apreciar, la mayoría presentan patrones claramente diferenciables. Sin embargo, algunos de ellos son casi indistinguibles por esta metodología, tal es el caso de los cultivares Candil e Isla Verde (calles 8 y 9 respectivamente). En la Figura 1.2.4 se muestran los electroferogramas de los mismos cultivares. Se pueden detectar diferencias entre todos los cultivares en todas las regiones del análisis. Para apreciar mejor la región de las  $\alpha$ ,  $\beta$ - y  $\gamma$ -gliadinas, esta se muestra ampliada en la Figura 1.2.5.



Figura 1.2.4: Análisis por electroforesis capilar de extractos etanólicos de distintos cultivares de trigo. Se detalla el nombre de cada cultivar en el electroferograma correspondiente.



Figura 1.2.5: Detalle de la región correspondiente a los 3-8 minutos de análisis de los electroferogramas de los extractos etanólicos de distintos cultivares de trigo. Se detalla el nombre de cada cultivar en el electroferograma correspondiente.
Nuevamente podemos encontrar un claro paralelismo en el comportamiento de las gliadinas en los dos sistemas de análisis. Así, por ejemplo, vemos que los cultivares Guazú, Liquen, Puntal y Pincén en el análisis por A-PAGE presentan una intensa banda en la región  $\alpha$  (calles 5, 10,11 y 12), mientras que por electroforesis capilar se detectan varios picos de movilidades parecidas e intensa absorbancia. Por otra parte, los demás cultivares en el análisis de A-PAGE presentan bandas más separadas en la misma región y a su vez muestran picos bien resueltos por electroforesis capilar.

En la región  $\gamma$  se observa que los cultivares Yapeyú, Isla Verde, Candil, Liquen y Puntal presentan dos bandas mayoritarias en el análisis de A-PAGE (calles 3, 8, 9, 10 y 11), mientras que los mismos cultivares así como Pericón (calle 4) presentan picos mayoritarios de igual intensidad en la región correspondiente a las  $\gamma$ -gliadinas en la separación por electroforesis capilar. A su vez se observa una correlación en las movilidades relativas de dichos picos en ambos sistemas (notar por ejemplo la posición de los mismos en el caso del cultivar Liquen, que corresponde a la calle 10 del análisis por A-PAGE). Los otros cultivares presentan un pico mayoritario en la región  $\gamma$ , flanqueado de picos menores.

En la región  $\omega$  se observa en el análisis por A-PAGE que los cultivares Cacique, Guazú, Federal, Charrúa, Pincén y Puntal (calles 2, 5, 6, 7, 11 y 12) presentan dos bandas mayoritarias en la región  $\omega$ -rápida. A su vez, en el análisis por electroforesis capilar presentan dos picos notorios y algunos picos menores en la región  $\omega$ -rápida en los distintos electroferogramas. Por otra parte, el análisis por electroforesis capilar muestra diferencias entre cultivares que eran casi indistinguibles por A-PAGE, como los cultivares Candil e Isla Verde, permitiendo una correcta diferenciación entre ambos cultivares.

La metodología desarrollada permite una rápida obtención del patrón de gliadinas, a partir de un extracto etanólico de harina, que puede ser empleado para la caracterización o identificación del cultivar a analizar. El gran poder de resolución, sumado a la capacidad de automatización, hace de esta metodología una herramienta muy adecuada para su uso en el laboratorio de bioquímica de cereales dedicado a la caracterización de cultivares de trigo.

### Empleo de electroforesis capilar para la separación de prolaminas de otros cereales

La electroforesis capilar ha sido empleada exitosamente en la separación de prolaminas de otros cereales como arroz y avena (Lookhart y Bean, 1995a). A fin de comprobar la performance de la separación optimizada sobre prolaminas de otros cereales de interés, se analizaron extractos etanólicos de muestras de cebada, centeno y avena. Los resultados se muestran en la **Figura 1.2.6**.



Figura 1.2.6: Análisis por electroforesis capilar de extractos etanólicos de trigo, cebada, centeno y avena.

Como se puede observar, mediante electroforesis capilar se obtiene una muy buena resolución en todos los cereales analizados. Con el objeto de realizar el estudio comparativo, estos extractos fueron también analizados por A-PAGE, cuyos resultados se muestran en la Figura 1.2.7.



Figura 1.2.7: análisis por A-PAGE de extractos etanólicos de avena (calle 1), cebada (calle 2), centeno (calle 3) y trigo (calle 4).

Se observa nuevamente el paralelismo entre las movilidades de los distintos componentes en ambos sistemas. Las aveninas, que presentan tiempos de migración entre 4 y 5,5 minutos en electroforesis capilar, migran con un Rf mayor que las  $\alpha$ -gliadinas. Se observa a su vez que por electroforesis capilar se logra una mejor resolución, ya que se detectan ocho picos mayoritarios y varios picos menores, mientras que el número de bandas observadas por A-PAGE es menor. La separación de hordeínas por electroforesis capilar muestra a su vez una buena resolución, observándose gran número de picos, siendo mayoritarios los de mayor tiempo de migración, que corresponderían a las fracciones de menor movilidad, como las C-hordeínas. Las secalinas también fueron separadas por electroforesis capilar produciendo numerosos picos.

A fin de identificar alguno de los componentes de cada fracción de prolamina, se procedió de manera similar a lo realizado con las gliadinas, analizando fracciones purificadas por electroforesis preparativa. El análisis por electroforesis capilar de secalinas se muestra en la **Figura 1.2.8**.



Figura 1.2.8: análisis por electroforesis capilar de fracciones de secalina purificadas mediante electroforesis preparativa.

Se observa que la fracción  $\gamma$ -secalina presenta una mayor movilidad que la  $\omega$ secalina, como era de esperar, dadas sus movilidades en el sistema A-PAGE. Para este análisis se recurrió a capilares de 50 µm de diámetro interno, a fin de aumentar la capacidad de detección del sistema dado que las fracciones se encontraban a baja concentración. Esto obligó a usar menores voltajes de separación con el consecuente aumento de los tiempos de análisis. A su vez se requirieron mayores tiempos de inyección. Esto puede redundar en un ensanchamiento de los picos de las fracciones, como se puede apreciar en la figura. Por otra parte, las fracciones pueden estar formadas por más de una especie, las que a pesar de no resolverse en el análisis de electroforesis capilar colaboran al ensanchamiento del pico observado. Sin embargo, en el electroferograma del extracto etanólico pueden distinguirse dos regiones, las correspondientes a las  $\gamma$ -secalinas (hasta los 20 min en la Figura 1.2.8) y otra correspondiente a las  $\omega$ -secalinas. Alguno de los tres picos mayoritarios observados podría corresponder a la  $\gamma$ -secalina75. Sin embargo, la fracción  $\gamma$ -secalina75 obtenida por SDS-PAGE preparativo no puede analizarse por EC ya que al contener SDS la movilidad de la misma esta alterada, no siendo equiparable a la separación del extracto etanólico, en donde el principio de separación se basa en la relación carga/masa.



Figura 1.2.9: Análisis por electroforesis capilar de fracciones de hordeína purificadas mediante electroforesis preparativa.

En la Figura 1.2.9 se muestra el análisis de las distintas fracciones de hordeínas. Se observa que las  $\gamma$ -hordeínas son detectadas entre 10 y 20 min de análisis (Figura 1.2.6 electroferograma 3). En este caso también se usaron capilares de 50 µm de diámetro interno. Las C-hordeínas son detectadas luego de los 20 min de corrida, apareciendo resueltas en 5 picos mayoritarios. La separación de las C-hordeínas por A-PAGE resulta en general difícil pues no se resuelven con facilidad debido a fenómenos de agregación, resultando en la aparición de una gran banda ancha en lugar de separarse en bandas menores mejor definidas, como se observa en la Figura 1.1.4 o 1.2.7. Se observa que las albúminas y globulinas presentes en el extracto etanólico son detectadas a los 5 min de corrida aproximadamente. La fracción  $\gamma$ -hordeína-1 que presenta el menor tiempo de migración es detectada a los 10 min de corrida. Esto confirma que corresponde a una de las  $\gamma$ -hordeínas, a pesar de tener una masa molecular baja, como se mostró en la Figura 1.1.7. La fracción  $\gamma$ -hordeína-2 presenta una movilidad diferente a la anterior, siendo detectada a los 15 minutos de corrida. No puede descartarse un solapamiento parcial de estas dos fracciones. La fracción C-hordeína presenta tres picos mayoritarios entre 20 y 35 min de análisis.

## **CONCLUSIONES**

Se optimizaron las condiciones de análisis de prolaminas por electroforesis capilar. La técnica desarrollada fue aplicada con éxito en todos los sistemas de prolaminas estudiados. En pocos minutos se obtiene un patrón de prolaminas del cereal a analizar de una muy alta resolución. A su vez, se probó la utilidad de la técnica en la diferenciación de cultivares de trigo, presentando una capacidad de discriminación superior a los métodos electroforéticos convencionales. Esto permitiría realizar registros de los distintos cultivares permitiendo emplear la electroforesis capilar para la identificación de los mismos, lo que tendría una aplicación directa en las industrias de alimentos que emplean estos cereales como materia prima.

En el caso particular de este trabajo de tesis, la metodología analítica desarrollada reviste importancia para la caracterización de las fracciones de prolamina purificadas las que posteriormente serán empleadas para los distintos fines anteriormente descriptos. A su vez esta metodología podrá ser aplicada directamente a muestras de panificados tratados térmicamente a fin de estudiar como los procesos de calentamiento afectan a la solubilidad de las distintas fracciones de gliadina en los solventes empleados para su extracción previa al análisis inmunoquímico de la muestra.

# SECCION III: OPTIMIZACIÓN DE LA ELECTROTRANSFERENCIA PARA LA REALIZACIÓN DE INMUNOBLOTTING DE GELES DE A-PAGE

#### **INTRODUCCION**

La combinación de técnicas de separación electroforéticas con una posterior etapa de reacción inmunoquímica es el fundamento de las técnicas de inmunoblotting. Estas técnicas son de gran utilidad para la caracterización de componentes de mezclas complejas. Esto se logra mediante el uso de anticuerpos específicos para algún componente en especial de la mezcla. También resultan de utilidad en el estudio de la especificidad de un anticuerpo dado frente a los distintos componentes de una mezcla antigénica. El uso de esta metodología en ambas modalidades es de utilidad para los objetivos planteados en esta tesis.

La muy difundida técnica de SDS-PAGE permite una buena separación de prolaminas, siendo aceptable para muchos fines. Se la ha empleado para análisis inmunoquímicos por imnunoblotting y caracterización e identificación de cultivares de trigo. Sin embargo, esta técnica no permite una buena separación de las distintas gliadinas, dado que las  $\alpha$ ,  $\beta$  y y-gliadinas presentan pesos moleculares similares (33-45 kDa). La separación electroforética a pH ácido (A-PAGE) logra una buena resolución de las diferentes clases de gliadinas, y es ampliamente utilizada. No obstante, la mayoría de los estudios de gliadinas por inmunoblotting fueron realizados empleando separaciones por SDS-PAGE en lugar de A-PAGE. Esto se debe a que la metodología de SDS-PAGE es muy sencilla de realizar y muy reproducible. Los blottings luego de A-PAGE son dificultosos dado que se debe realizar la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa en condiciones no desnaturalizantes, lo que causa en muchos casos agregación proteica durante la transferencia, originando revelados de mala calidad, con presencia de manchas que dificultan la interpretación de los resultados. A fin de poder contar con un sistema adicional de caracterización de anticuerpos, se procedió a optimizar el sistema de transferencia de gliadinas separadas por A-PAGE a nitrocelulosa. Con este objeto se emplearon diferentes buffers de transferencia y se seleccionaron las condiciones que produjeron los resultados de mejor resolución y mayor repetibilidad.

## **MATERIALES Y METODOS**

Muestras empleadas: Se utilizaron extractos etanólicos de harina de trigo cv. Oasis obtenidos como fuera descripto en la parte 1.2

**Electroforesis analítica**: Las muestras se separaron en geles por A-PAGE como fuera descripto en la parte 1.2. Se emplearon geles de 1 mm de espesor, sembrados con peine continuo, para facilitar las posteriores transferencias.

**Electrotransferencia:** Luego de la separación electroforética, el gel fue cortado en tiras, las cuales fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en un sistema TransBlot System de Bio Rad. Se emplearon distintas soluciones y distintas condiciones para la transferencia según se detalla en la **Tabla 1.3.1**.

	Buffer	pH	Condición de transferencia	Conductividad [Ω <sup>-1</sup> ]			
1	0,010 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,70	300 mA 40V 20 min	1,05 10 <sup>-3</sup>			
2	0,010 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,70	300 mA 40V 40 min	1,05 10 <sup>-3</sup>			
3	0,010 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,70	230 mA 30V 40 min	1,05 10 <sup>-3</sup>			
4	0,010 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,40	300 mA 20V 40 min	2,44 10 <sup>-3</sup>			
5	0,050 M ácido láctico	2,65	300 mA 40V 40 min	1,10 10 <sup>-3</sup>			
6	0,012 M láctico/lactato de potasio	3,20	300 mA 40V 40 min	1,20 10 <sup>-3</sup>			
7	0,010 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2,30	300 mA 20V 40 min	2,80 10 <sup>-3</sup>			
8	0,122 M ácido acético	2,85	300 mA 80V 40 min	0,52 10 <sup>-3</sup>			

Tabla 1.3.1: Condiciones de transferencia analizadas

La conductividad de los buffers fue medida empleando una celda de conductimetría sumergida (Cole Parmer, CA, USA). Cada una de las tiras de gel fue transferida en distintas condiciones. Como la separación fue en todos los casos de la misma muestra, en el mismo gel, el patrón de bandas proveniente del gel será idéntico en todos los casos. A su vez todos los revelados posteriores del westernblot se realizaron en forma simultánea empleando la misma preparación de reactivos. De esta manera, las diferencias observadas en el revelado serán atribuibles solamente a los diferentes procesos que tengan lugar durante la transferencia.

Análisis de westernblot: la nitrocelulosa fue bloqueada por incubación durante 16 h a 4°C en leche en polvo al 2% p/v en buffer tris-HCl pH 7,4 (TBS). Posteriormente se incubó

durante 1h a 37°C en presencia de suero de conejo antigliadina obtenido y caracterizado por integrantes de nuestro grupo (Chirdo, Fossati y col., 1995). Dicho suero se empleó diluido 1:400 en TBS-tween 20, 0,05% v/v (T-TBS). Luego se incubó por 1 h 37° C con un anticuerpo anti- $\gamma$ -globulina de conejo conjugado con peroxidasa (Bio Rad) 1:400 en T-TBS. Finalmente se reveló por inmersión en 2-cloronaftol 1mg/ml 12% v/v metanol en TBS. La reacción de revelado se detuvo mediante inmersión en agua destilada. Entre cada paso de incubación la nitrocelulosa fue lavada tres veces con T-TBS.

## RESULTADOS

Se realizaron diversos ensayos de transferencia empleando distintos buffers y distintas condiciones de voltaje, intensidad de corriente y tiempo de transferencia. Los resultados se muestran en las **Figuras 1.3.1 y 1.3.2**.



Figura 1.3.1: Análisis por westernblot de proteínas de trigo separadas por A-PAGE y transferidas a nitrocelulosa en distintas condiciones. Las condiciones 1-8 son las detalladas en la Tabla 1.3.1



Figura 1.3.2: Tinción de las proteínas remanentes en el gel de A-PAGE luego de la electrotransferencia. Calle 1: separación de proteínas sin transferir. Calles 2-9: corresponde a las muestras transferidas en las condiciones 1-8 detalladas en la Tabla 1.3.1 respectivamente.

La Figura 1.3.1 muestra los resultados del inmunoblot y la 1.3.2 la tinción de proteínas remanente en el gel luego de la transferencia. Cada calle corresponde a un tratamiento de transferencia diferente. La numeración corresponde a las condiciones especificadas en la Tabla 1. Las calles 1-3 corresponden al empleo de buffer fosfato pH 2,7 como buffer de transferencia y presentan la mejor definición de las bandas de gliadina, sin la presencia de manchas. Los tres tratamientos dejaron una baja cantidad de gliadinas no transferidas en el gel. La calidad de la resolución del blot no se ve afectada por cambios en el tiempo de la operación (calles 1-2) ni por un descenso en el voltaje (calle 3). La calle 4 corresponde al empleo de un buffer fosfato a pH 2,4 como buffer de transferencia y muestra un patrón de bandas de menor resolución en el westernblot. El descenso del pH, si bien aumenta la movilidad, no redunda en una mejor resolución. Por otra parte se observa la aparición de manchas, artefacto típicamente detectado en este tipo de transferencias. En la calle 5 se puede observar el blot obtenido empleando ácido láctico como buffer de transferencia, como fue descripto por Friis y Schaffer-Nielsen (1985). Se observa una menor definición en las bandas que la lograda en las condiciones 1-3, con tendencia a mostrar manchas irregulares de aparición aleatoria debido a agregados parciales de gliadina durante la transferencia. En la calle 6 se muestran los resultados obtenidos al emplear un buffer láctico/lactato de potasio (similar a los empleados para la separación electroforética) como buffer de transferencia. Se observan pocas manchas, pero la resolución no fue tan buena como en los casos 1-3. La calle 7 presenta el resultado obtenido al emplear ácido fosfórico pH 2,3 en la transferencia. Se observa una muy mala resolución y una gran cantidad de gliadina remanente en el gel (Figura 1.3.2, calle 7). El blot que se observa en la calle 8 fue obtenido empleando ácido acético 0,122 M como buffer de transferencia, como fuera descripto por Skerritt y Lew (1985). No se logra una buena resolución en las bandas a pesar de quedar poca gliadina remanente en el gel (Figura 1.3.2, calle 8).

El resultado del blotting es fuertemente dependiente del procedimiento empleado en la transferencia. La composición del buffer de transferencia resulta crucial para lograr una buena resolución. Buffers de igual pH e igual conductividad presentaron distinta eficiencia para producir una transferencia de resolución adecuada. De los buffers probados, el de fosfato de potasio pH 2,7 fue el que produjo los mejores resultados. A su vez, para buffers de la misma composición, el pH resulta también de importancia, pues la calidad de los resultados se ve alterada al cambiar el pH de trabajo (por ejemplo a pH 2,4 como fue mostrado en la Figura 1.3.1, calle 4).

## CONCLUSIONES

Se analizó el comportamiento del sistema de inmunoblotting empleando distintos buffers de transferencia. Se seleccionó un sistema de buffers que logra mejores resultados que los producidos siguiendo las técnicas descriptas hasta el momento. Esta metodología permite el análisis por inmunoblotting de prolaminas separadas por A-PAGE. Siendo éste un sistema capaz de separar las gliadinas en sus distintas clases, el empleo de inmunoblotting mediante esta técnica será de suma utilidad en el estudio de la especificidad de los anticuerpos antigliadina. En un único análisis se puede determinar cual de las distintas gliadinas es reconocida por el anticuerpo en estudio, facilitando la caracterización de anticuerpos antigliadina. A su vez esta metodología permitirá caracterizar la respuesta inmune humoral antigliadina desencadenada en los pacientes celíacos, a fin de determinar si hay un reconocimiento preferencial de alguna clase de gliadinas, como se describe en el Anexo I.

PARTE II: CARACTERIZACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTIGLIADINA Y DESARROLLO DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE GLIADINAS EN ALIMENTOS.

## **INTRODUCCION**

Los métodos inmunoquímicos son actualmente los más empleados para la detección de proteínas nocivas en alimentos para enfermos celíacos. El uso de anticuerpos específicos para dichas proteínas, capaces de detectarlas con alta afinidad en mezclas complejas de componentes, permite alcanzar los niveles de detección sugeridos por el *Codex Alimentarius* para considerar un alimento como apto para el consumo por pacientes celíacos (Janssen, 1998). Para el desarrollo de dichos métodos es necesario un estudio detallado de la especificidad de los anticuerpos a emplear, dado que han sido descriptos casos de reactividad contra proteínas no relacionadas con la enfermedad. Por otra parte los anticuerpos pueden presentar distinto patrón de reactividad frente a las prolaminas tóxicas, debido a las pequeñas diferencias estructurales entre prolaminas. La caracterización de la especificidad de los anticuerpos a emplear frente a distintas fracciones de prolaminas de distintas especies permite conocer las fracciones que serán reconocidas en los ensayos de detección.

En esta Parte de la Tesis Doctoral se describen los pasos seguidos para la purificación y caracterización de los distintos anticuerpos antigliadina empleados en ensayos de cuantificación. También se describe la optimización de ensayos de detección que se emplearán para los estudios del efecto del tratamiento térmico en la reactividad de las gliadinas.

#### **MATERIALES Y METODOS**

### Producción de anticuerpos monoclonales:

**Cultivo de hibridomas:** Se disponía de hibridomas obtenidos en nuestro laboratorio (Chirdo, Fossati y col., 1998). Se partió de los hibridomas congelados, almacenados en nitrógeno líquido en una mezcla en relación 9:1 de suero fetal bovino (FCS) y dimetilsulfóxido (DMSO). Cada vial contenía 2-4  $10^6$  células. Para cultivar las células así congeladas se procedió a un descongelado rápido por inmersión en baño de agua a 37° C e inmediatamente un lavado con 10 ml de medio GKN preenfriado a 4°C. Posteriormente se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 con 10% de FCS, penicilina-streptomicina y se transfirieron a placas de 24 fosas marca Nunc, incubándose en estufa a 37° C con presión parcial de CO<sub>2</sub> regulada al 5%, hasta lograr el número deseado de células.

**Producción de ascitis:** Se inocularon cinco ratones BALB/c por cada hibridoma, con 0,5 ml de 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Pristane, ICN Chemicals). Luego de 7 a 10 días fueron inyectados vía intraperitoneal con 1-2  $10^6$  células de los hibridomas respectivos. A las dos semanas aproximadamente y luego cada 24-48 h se punzó el abdomen de los animales, en condiciones asépticas, para colectar el líquido ascítico. Se dejó coagular 1 h a 37°C y se centrifugó 20 min a 300xg. Los líquidos ascíticos fueron luego congelados en alícuotas a 20°C bajo cero hasta su uso.

**Purificación de AcMo: precipitación con sulfato de amonio:** Los AcMo fueron precipitados del líquido ascítico por tratamiento con  $(NH_4)_2SO_4$  al 50% de saturación. Con este fin se añadió desde bureta por goteo lento un volumen de solución saturada de  $(NH4)_2SO_4$  igual al volumen de ascitis a procesar. Esta operación se realizó bajo agitación constante en baño de agua-hielo. Se incubó durante 2 h a 4 °C y luego se centrifugó a 5000xg durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en distintos buffers según el uso posterior.

Marcado con biotina: Los AcMo fueron conjugados empleando un éster reactivo de biotina (Lane, 1988). Para esto, los AcMo fueron resuspendidos en buffer borato 0,1M pH 8,8 y dializados contra el mismo buffer. La concentración proteica de la suspensión fue cuantificada mediante el método descripto por Lowry, Rosebrough y col. (1951). Diez ml de solución fueron incubados durante 4 h con agitación suave a temperatura ambiente con éster de n-hidroxisuccinimido-biotinamidocaproato (Sigma, USA) en una relación de 100  $\mu$ g de

éster/mg de anticuerpo. La reacción se detuvo por el agregado de NH4Cl 1M (20µl/250µg de éster). Para eliminar la biotina libre se realizó una diálisis exhaustiva frente a PBS. Finalmente el anticuerpo biotinilado fue almacenado a -80°C hasta su uso.

La misma técnica fue empleada para el biotinilado de gliadina, la cual será empleada para la realización de ensayos de ELISA de cuantificación de gliadinas. Se empleó gliadina comercial resuspendida en NaOH 0,01M. El resto de los pasos se realizaron como fuera descripto anteriormente.

## Caracterización de la reactividad de los anticuerpos obtenidos.

A fin de obtener una caracterización de la reactividad de los anticuerpos se emplearon metodologías complementarias. Por un lado se realizaron análisis de westernblot de extractos totales de proteínas de los distintos cereales a estudiar. Por otro lado se emplearon extractos de distintos cereales y fracciones de prolaminas de varios cereales obtenidas por electroforesis preparativa, con los que se realizaron ensayos de ELISA indirecto frente a los anticuerpos a caracterizar.

#### Estudio de la reactividad por ELISA

La caracterización se realizó empleando distintos extractos proteicos y fracciones purificadas de la siguiente manera:

**Procedimientos de extracción:** Se realizaron extractos de harina de grano de las siguientes especies: trigo (*Triticum aestivum*), cebada, centeno, avena, maíz, arroz, soja, girasol, mijo y sorgo. Se trabajó a una relación de 10 ml de solvente por gramo de harina a extraer. Las prolaminas fueron obtenidas por extracción secuencial. Se realizaron lavados con solución de NaCl 0,15N (tres de una hora de duración a temperatura ambiente y uno durante toda la noche a 4°C). Luego se procedió a tratar el residuo con etanol 70% (v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se obtuvieron luego de una centrifugación a 10.000xg durante 15 minutos a 10°C en una centrífuga Sorvall.

Medición de la concentración proteica: Se realizó empleando el método descripto por Lowry, Rosebrough y col. (1951). Para las muestras de extracción etanólica se llevó a cabo la calibración con un estándar de gliadina comercial disuelto en etanol acuoso al 70% y valorado por la técnica de Kjeldahl (Bradstreet, 1965).

Estudios electroforeticos de los extractos: A fin de determinar su composición, los extractos etanólicos de las distintas muestras fueron analizados por electroforesis SDS-PAGE. Se

siguió el procedimiento de separación en gradiente de poliacrilamida descripto por Laemmli (1971), empleando un gradiente de 10 a 15% (p/v) de acrilamida, como fuera descripto en la Parte I de este trabajo de Tesis.

Para los estudios de ELISA también se emplearon fracciones de prolaminas de trigo, cebada y centeno purificadas por electroforesis preparativa, como fuera descripto en la Parte I. Dichos extractos una vez caracterizados fueron cuantificados mediante el método de Lowry y almacenados a -80°C hasta su empleo.

#### Empleo de los extractos en ELISA

Titulación de anticuerpos monoclonales por ELISA: Se sensibilizaron placas Nunc Maxisorb con una suspensión de los antígenos para analizar a una concentración de 1 µg/ml (100 µl/fosa). Los antígenos empleados fueron extractos etanólicos de los distintos cereales y fracciones purificadas de prolaminas, obtenidas por electroforesis preparativa, como fuera descripto en la Parte I. La sensibilización se realizó incubando las placas con la suspensión antigénica correspondiente toda la noche a 4 °C. Posteriormente se bloquearon con una solución de leche en polvo al 3% (p/v) en PBS 1 h a 37 °C. Luego se incubó con diluciones crecientes del anticuerpo a testear en leche en polvo 1% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v) en PBS (T-PBS), durante 1 h a 37 °C. Posteriormente se incubó con suero de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) 1:1500 en T-PBS leche 1% (p/v) (en el caso de la caracterización del suero de conejo antigliadina, se empleó un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de marca BioRad diluido 1:1500 en el mismo diluyente). Entre los distintos pasos de incubación se lavaron las placas tres veces, con T-PBS durante 3 min. El revelado se realizó en buffer citrato pH 5,0 empleando agua oxigenada (1 µl/ml) y ortofenilendiamina (1 µl/ml) como desarrolladores de color. La reacción se detuvo por agregado de 40 µl de ácido sulfúrico 4N. La DO de cada fosa fue leída en un equipo lector de microplacas Tecan modelo SpectraRainbow a 492nm.

## Análisis de westernblot

Separación electroforética: A-PAGE: Se realizó en geles de poliacrilamida al 7% (p/v) a pH 3,1; según el procedimiento descripto en la Parte I. Esta electroforesis en condiciones nativas permite diferenciar entre las distintas fracciones de gliadinas. Se empleó un equipo de electroforesis Mini-Protean (Bio Rad). Los análisis fueron realizados sobre los extractos etanólicos de harina de trigo, diluidos 1:2 en buffer muestra (buffer de ácido láctico y lactato de aluminio pH 3,1; sacarosa 30% (p/v), violeta de metilo 0,1mg/ml).

**SDS-PAGE:** se siguió el procedimiento de separación en gradiente de poliacrilamida descripto por Laemmli (1971), empleando un gradiente de 10 a 15% (p/v) de acrilamida, con un gel de stacking de 4% (p/v) de poliacrilamida, como fuera descripto en la Parte I. Este análisis se empleó para el estudio por westernblot de la reactividad de los AcMo antigliadina frente a proteínas de trigo, cebada, centeno, avena, maíz, arroz y mijo.

**Electrotransferencia**: para el caso de proteínas separadas por SDS-PAGE se siguió el procedimiento descripto por Towbin (1979). Se empleó como buffer de transferencia buffer tris-HCl (0,1M pH 8,5) 20% (v/v) metanol. La transferencia se realizó en un equipo Transblot System de Bio-Rad (USA) a 70V, 250 mA durante 50 min. Los geles separados por A-PAGE fueron transferidos siguiendo la técnica optimizada como fuera descripto en la Parte I, empleando buffer fosfato pH 2,7 0,01 M.

Análisis de westernblot: las membranas de nitrocelulosa con los antígenos transferidos fueron bloqueadas por incubación durante 16 h a 4°C en leche en polvo al 2% (p/v) en buffer tris-HCl pH 7,4 (TBS). Posteriormente se incubó durante 1h a 37°C en presencia de sobrenadante de cultivo de los hibridomas productores de anticuerpos antigliadina diluído 1:20 en TBS-tween 20, 0,05% (v/v) (T-TBS) (en el caso del suero de conejo antigliadina se incubó 1:8000). Luego se incubó por 1 h 37° C con un anticuerpo anti-globulina de ratón conjugado con peroxidasa (Bio Rad) 1:400 en T-TBS (en el caso del suero antigliadina se empleó el mismo suero anticonejo conjugado con peroxidasa empleado para los ELISAs, diluido 1:500). Entre cada paso de incubación la membrana de nitrocelulosa fue lavada tres veces con T-TBS. Finalmente se reveló empleando un reactivo quimioluminiscente (Amersham) empleando placas radiográficas fotosensibles. El tiempo de exposición de la placa fotosensible varió entre 5 y 90 s.

## Optimización de ELISA de cuantificación empleando gliadina biotinilada.

A fin de realizar los estudios de la influencia del tratamiento térmico sobre la reactividad de las gliadinas se procedió a optimizar distintos ensayos de cuantificación.

Se sensibilizaron placas Nunc Maxisorb de alta capacidad de unión con distintas diluciones de los AcMo a emplear (100  $\mu$ l/fosa) en PBS. La sensibilización se realizó toda la noche a 4°C. Luego se bloquearon los sitios de adsorción inespecífica incubando 1 h 37°C en PBS leche en polvo al 3% (p/v). Posteriormente se incubó 1 h 37°C con diluciones de gliadina estándar o de las muestras a analizar en T-PBS leche en polvo 1% (p/v) adicionada con gliadina biotinilada 1  $\mu$ g/ml (esta concentración fue determinada mediante ensayos de captura con un suero antigliadina empleado en condiciones saturantes). Luego se incubó con streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma Immunochemicals, USA) diluída 1:2000

en T-PBS leche en polvo 1% durante 1 h 37°C. Entre los distintos pasos de incubación se lavaron las placas tres veces con T-PBS durante 3 min. El revelado se realizó en buffer dietanolamina 20% (p/v) -HCl pH 9,8 1mg/ml de p-nitrofenilfosfato. La reacción de desarrollo de color fue detenida mediante el agregado de 50  $\mu$ l de EDTA 2% (p/v). La densidad óptica de cada fosa fue medida en un equipo lector de microplacas Tecan modelo SpectraRainbow a 405nm.

#### RESULTADOS

#### Purificación de los AcMo y marcado con biotina

Se trabajó con cuatro hibridomas secretores de anticuerpos anti-gliadinas, 2A1C4, 3B4H1, 1C4D9 y 1B4E9 (los cuales serán nombrados por sus tres primeros caracteres). Se obtuvieron al menos 20 ml de líquido ascítico rico en anticuerpo monoclonal por hibridoma. A fin de purificar los AcMo presentes en el suero se precipitó el mismo con sulfato de amonio y luego fueron biotinilados, con el objeto de realizar ensayos de desplazamiento y ensayos de cuantificación tipo sandwich. Para confirmar que los anticuerpos fueron biotinilados en forma adecuada, se realizó una titulación por ELISA indirecto sensibilizando la placa con una suspensión de gliadina comercial y revelando con streptavidina-fosfatasa alcalina.



Figura 2.1: Titulación mediante ELISA indirecto de los distintos AcMo biotinilados frente a una suspensión 1  $\mu$ g/ml de gliadina comercial. El tiempo de revelado fue de 20 min.

Los resultados se muestran en la Figura 2.1. Se observa que los cuatro AcMo fueron biotinilados en forma adecuada, dado que se obtienen curvas de titulación con una absorbancia que satura la lectura óptica para bajas diluciones. El anticuerpo 3B4 resultó el anticuerpo biotinilado de mayor actividad.

## Caracterización de la reactividad por ELISA indirecto

Paralelamente fueron estudiados los cuatro AcMo y un suero de conejo antigliadina, empleado por nuestro laboratorio en ensayos de cuantificación de gliadinas en alimentos (Chirdo, Fossati y col, 1995). Se realizaron ensayos de ELISA indirecto sensibilizando la placa con extractos etanólicos de distintas especies vegetales.



Figura 2.2: Análisis por SDS-PAGE de extractos etanólicos de distintos cereales. Calles 1 y 8: marcadores de peso molecular. Calle 2: trigo. Calle 3: cebada. Calle 4: centeno. Calle 5: avena. Calle 6: maíz. Calle 7: arroz.

En la Figura 2.2 se muestra el análisis por SDS PAGE de los extractos empleados. Se observa que cada uno presenta prolaminas de distinto peso molecular. En la calle 2 se observan las gliadinas. La fracción principal extraída corresponde a  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - gliadinas (masas moleculares entre 30 y 40 kDa) con una presencia minoritaria de  $\omega$ -gliadinas de masas mayores. No se observan fracciones de HMW gluteninas (masa molecular mayor a 70 kDa). En la calle 3 se muestra el extracto de centeno con las tres fracciones de secalina principales, la  $\gamma$ -secalina45, la  $\omega$ -secalina y la  $\gamma$ -secalina75. En la calle 4 se muestran las hordeínas,

principalmente C-hordeínas, de masa mayor a 45 kDa y las  $\gamma$ -hordeínas, con masas entre 40 y 15 kDa. Las aveninas se muestran en la calle 5. Se observan componentes de masas cercanas a los 40 kDa y algunos componentes de bajo peso molecular. Las zeinas (maíz) se muestran en la calle 6. El componente principal corresponde a una masa de aproximadamente 25 kDa. Esta composición es la esperable de acuerdo a los datos bibliográficos. En la calle 7 se muestra el análisis de la fracción prolamina de arroz. Dada la baja concentración de la muestra, se observan en forma muy tenue solamente unas bandas en la región de 40 kDa.



Figura 2.3: Titulación de los distintos AcMo mediante ELISA indirecto frente a los distintos cereales. Las placas fueron sensibilizadas con las suspensiones antigénicas a 1  $\mu$ g/ml. El desarrollo de color fue detenido a los 20 minutos.

centeno

avena

maíz arroz En la Figura 2.3 se observan los resultados de la caracterización de los distintos anticuerpos por ELISA indirecto frente a distintas especies vegetales. Ninguno de los anticuerpos analizados presenta reactividad frente a los cereales no relacionados con la enfermedad celíaca (arroz, maíz, mijo, sorgo) ni frente a otras especies vegetales como soja, trigo sarraceno o girasol. Se observa que el suero antigliadina reconoce trigo, centeno y cebada con buena intensidad y avena con intensidad un poco menor. Entre los AcMo se observa que 1B4 presenta reactividad contra trigo, cebada y centeno casi con igual intensidad, siendo un poco mayor la reactividad contra centeno. El AcMo 1C4 presenta reactividad contra prolaminas de centeno, trigo y cebada, siendo la reactividad decreciente en ese orden. Por último, el AcMo 3B4 presenta reconocimiento de prolaminas de trigo y con menor intensidad de avena, siendo muy baja la reactividad contra las otras especies analizadas.

Para la caracterización de las reactividades frente a las distintas subclases de prolaminas se emplearon fracciones purificadas por electroforesis preparativa. Se emplearon 5 fracciones de gliadina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ -rápida y  $\omega$ -lenta), cuyos perfiles de electroforesis capilar y A-PAGE se muestran en la **Figura 2.4**. Como se puede observar, las distintas fracciones no presentan contaminación cruzada con componentes presentes en las otras.

A su vez, para la caracterización de reactividad de los anticuerpos frente a prolaminas purificadas de otros cereales, se emplearon cuatro fracciones distintas de secalinas ( $\gamma$ 45,  $\omega$ + $\gamma$ 75,  $\gamma$ 45+ $\omega$  y  $\gamma$ 75) cuyos perfiles de electroforesis capilar y A-PAGE fueron mostrados en las Figuras 1.1.6-1.2.8. También fueron empleadas 4 fracciones de hordeína (1-hor, 2-hor, Chor y C-hor2), cuyos perfiles de A-PAGE y EC se mostraron en las Figuras 1.1.4-1.2.9.



Figura 2.4: Parte A: Análisis por A-PAGE de las distintas fracciones purificadas de gliadina. Calles 1 y 7: extracto etanólico de harina de trigo. Calle 2:  $\alpha$ -gliadina. Calle 3:  $\beta$ -gliadina. Calle 4:  $\gamma$ -gliadina. Calle 5:  $\omega$ -rápida. Calle 6:  $\omega$ -lenta. Parte B: Análisis por electroforesis capilar de las mismas fracciones analizadas en la parte A.



Figura 2.5: Titulación de los distintos AcMo mediante ELISA indirecto frente a las fracciones de gliadina purificadas. Las placas fueron sensibilizadas con las suspensiones antigénicas a 1  $\mu$ g/ml. El desarrollo de color fue detenido a los 20 min.

En la Figura 2.5 se muestran los resultados de los análisis de especificidad de los distintos anticuerpos frente a las diferentes fracciones de gliadina purificadas. En dicha Figura se observa que el suero de conejo presenta una amplia reactividad, reaccionando casi con igual

intensidad frente a las cinco fracciones de gliadina empleadas, reconociendo epitopes presentes en las  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadinas. 1B4 por su parte presenta una buena reactividad contra todas las fracciones, siendo solamente un poco más débil el reconocimiento de  $\alpha$ -gliadina. 1C4 presenta la mayor reactividad contra  $\gamma$ -gliadina, siendo menor el reconocimiento de  $\beta$  y  $\omega$ gliadinas y muy baja la reactividad contra  $\alpha$ -gliadina. 2A1 presenta alta reactividad contra  $\gamma$  y  $\omega$  gliadina, siendo baja la reactividad contra  $\beta$ -gliadina y casi nula la reactividad contra  $\alpha$ gliadina. 3B4 presenta un patrón de reconocimiento amplio siendo buena la reactividad contra todas las fracciones de gliadina testeadas.



Figura 2.6: Titulación de los distintos anticuerpos mediante ELISA indirecto frente a fracciones purificadas de hordeínas. Las placas fueron sensibilizadas con las suspensiones antigénicas a 1  $\mu$ g/ml. El desarrollo de color fue detenido a los 20 min.

La Figura 2.6 muestra los resultados de los ensayos de ELISA realizados sensibilizando la placa con las distintas hordeínas purificadas. Sólo se muestran los anticuerpos que presentaron reactividad contra los extractos de cebada. Se observa que 1B4 presenta, al igual que contra las gliadinas, un reconocimiento amplio, siendo reconocidas las

fracciones de C-hordeína,  $\gamma$ -hordeína-1 y  $\gamma$ -hordeína-2 con igual intensidad. La reactividad de 2A1 es diferente frente a las distintas fracciones. Presenta un buen reconocimiento de Chordeínas siendo este menor frente a  $\gamma$ -hordeína-2 y menor aun frente a  $\gamma$ -hordeína-1. El suero antigliadina presenta buena reactividad frente a las tres fracciones testeadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos frente a gliadinas, ya que la reactividad del suero y de 1B4 es amplia, mientras que la de 2A1 es restringida en ambos sistemas. A su vez este último anticuerpo reconoce con buena intensidad a las homólogas  $\omega$ -gliadinas y C-hordeínas y con baja reactividad a las  $\gamma$ -hordeínas y  $\alpha/\beta$  gliadinas. La fracción  $\gamma$ -hordeína-1 presentaba un peso molecular bajo (Figura 1.1.7), siendo inusual para prolaminas. Sin embargo sus propiedades de solubilidad, movilidad electroforética a pH ácido y la reactividad inmunoquímica observada frente a los distintos AcMo estudiados indican su similitud con las demás prolaminas de cebada.



Figura 2.7: Titulación de los distintos anticuerpos mediante ELISA indirecto frente a fracciones purificadas de secalinas. Las placas fueron sensibilizadas con las suspensiones antigénicas a 1  $\mu g/ml$ . El desarrollo de color fue detenido a los 20 minutos.



La Figura 2.7 muestra los resultados de los análisis frente a las secalinas purificadas. Solamente fueron analizados aquellos anticuerpos que presentaron reactividad frente al extracto etanólico de centeno. Se observa que el suero de conejo presenta reactividad frente a las 5 fracciones empleadas. 1B4 presenta buena reactividad frente a  $\gamma$ -secalina y  $\omega$ -secalina obtenidas por A-PAGE preparativo, mientras que la reactividad es baja frente a las fracciones obtenidas por SDS-PAGE preparativo. 1C4 presenta una mayor reactividad frente a  $\gamma$ -secalina obtenida por A-PAGE preparativo, siendo menor la reactividad frente a ω-secalina obtenida de la misma manera. La reactividad frente a las fracciones obtenidas por SDS-PAGE preparativo es baja. 2A1 presenta una buena reactividad frente a todas las fracciones analizadas. Nuevamente se observa la concordancia con la reactividad mostrada frente a gliadinas, ya que tanto 1B4 como el suero, que reconocían a todas las subclases de gliadinas también reconocen a las distintas secalinas. 1C4, que reconocía con mayor intensidad las γ-gliadinas, también reconoce con mayor intensidad a sus homólogas, las γ-secalinas, mientras que las ω-secalinas son reconocidas con afinidad intermedia, como lo eran las o-gliadinas. 2A1 presentaba un buen reconocimiento frente a las  $\gamma$  y  $\omega$  gliadinas, reconociendo con intensidad a sus homólogas de centeno, las  $\gamma$  y  $\omega$  secalinas. A su vez se observa que tanto 1B4 como 1C4 no reconocen las fracciones obtenidas por SDS-PAGE preparativo. Esto puede deberse a que las alteraciones estructurales introducidas por el SDS destruyen los epitopes reconocidos por estos anticuerpos. Esto no ocurre en el caso de las estructuras reconocidas por 2A1 y por el suero antigliadina, que mantienen buenos niveles de reactividad frente a estas fracciones. Se observa que tanto 2A1 como el suero reconocen con gran intensidad la fracción y-secalina75, comprobando de esta manera su analogía estructural con las otras prolaminas.

Los estudios mediante ELISA indirecto realizados sobre extractos de distintos vegetales permiten identificar cuáles son las especies reconocidas por los anticuerpos analizados. A su vez el contar con fracciones purificadas de distintos cereales permite caracterizar la reactividad de los anticuerpos frente a los distintos componentes en una forma rápida, sencilla y semicuantitativa, dado que usando el formato de titulación se puede obtener una idea de la intensidad relativa con que son reconocidas las diferentes fracciones analizadas.

### Análisis de la reactividad por Westernblot

El análisis de las especificidades de reconocimiento mediante westernblot se complementa con los ensayos de ELISA. Estos estudios permiten individualizar los componentes reactivos presentes en una mezcla antigénica compleja luego de una separación electroforética. Se realizaron estudios frente a proteínas totales de distintas especies vegetales.

Los extractos fueron obtenidos empleando el buffer muestra de SDS-PAGE como solvente de extracción. Este buffer, que contiene SDS y 2-ME tiene una gran capacidad para solubilizar los distintos componentes de la muestra (habitualmente a estos extractos se los denomina "proteínas totales"), de manera que los extractos analizados presentan un número mucho mayor de componentes que los extractos etanólicos empleados para los análisis de ELISA. El westernblot luego de SDS-PAGE es una metodología universalmente empleada para la caracterización de reactividades. Sin embargo, la presencia de agentes disociantes en el medio introduce modificaciones en la estructura proteica pudiendo afectar la antigenicidad de la misma.



Figura 2.8: Análisis por SDS-PAGE de extractos de proteínas totales de distintos cereales. Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2: trigo – cultivar Pericón. Calle 3: trigo – cultivar Guazú. Calle 4: trigo – cultivar Oasis. Calle 5: trigo – cultivar Isla Verde. Calle 6: cebada. Calle 7: centeno. Calle 8: avena. Calle 9: arroz. Calle 10: maíz.

La Figura 2.8 muestra la separación electroforética de los distintos extractos que se emplearán en el análisis por westernblot. En las calles 2-5 se muestran extractos de distintos cultivares de trigo. En la calle 6 se muestra un extracto de cebada. En las calles 7, 8, 9 y 10 se muestran los extractos totales de centeno, avena, arroz y maíz respectivamente. Debe notarse que en todos los casos se observa un gran número de proteínas, correspondiendo a las distintas fracciones de albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Si bien no es posible asignar regiones de peso molecular a cada grupo, se puede coincidir en que la presencia de bandas de masas mayores de 70 kDa corresponde a glutelinas de alto peso molecular; las prolaminas normalmente se presentan en la región de 30 - 40 kDa (aunque como vimos anteriormente se

las puede encontrar en otras regiones) y la ubicación de las albúminas y globulinas es más amplia (Bietz y Simpson, 1992).



2A1 immunoblotting



Figura 2.9: Análisis por westernblot de extractos de proteínas totales de cereales separados por SDS-PAGE. Se analizan los distintos AcMo. Se empleó un sistema de revelado mediante quimioluminiscencia.

La Figura 2.9 presenta los resultados de los análisis de westernblot luego de la separación por SDS-PAGE de las proteínas totales de varios cultivares de trigo (calles 1-4), cebada (calle 5), centeno (calle 6), avena (calle 7), arroz (calle 8) y maíz (calle 9). Se observa

que 1C4 reconoce principalmente gliadinas de la región de 30-40 kDa, una banda de cebada de unos 55 kDa y varias proteínas de centeno. No se detecta reactividad contra avena, maíz ni arroz. El AcMo 2A1reconoce proteínas de trigo (calles 1-4), cebada (calle 5) y centeno (calle 6) con buena intensidad. En trigo las proteínas reconocidas con mayor intensidad se ubican en la región de 30-40 kDa, mientras que en cebada y centeno la reactividad es amplia y diferente a la observada para los otros anticuerpos. No se detecta reactividad contra avena, maíz ni arroz. 3B4 muestra una reactividad restringida contra la región 30-40 kDa de trigo (calles 1-4). No se detecta reactividad contra ninguno de los otros cereales analizados. El AcMo 1B4 muestra buena reactividad contra cebada (calle 5) y trigo (calles 1-4), no observándose reactividad frente a centeno, avena ni los otros cereales analizados. Los resultados, en general, coinciden con lo observado en los ensayos de ELISA.

Es importante destacar que no se observó reactividad contra ninguna proteína de los cereales no relacionados con la enfermedad celíaca lo que invalidaría el uso de los distintos anticuerpos en ensayos de control de alimentos. La fracción proteica analizada por western luego de un SDS-PAGE contiene un mayor número de componentes que la analizada por ELISA. Aun así no se observó reactividad frente a maíz y arroz. Si embargo esto puede explicar la aparición de reactividad de 1C4 frente a proteínas de cebada (lo cual no fue observado por ELISA). En este caso podría ocurrir que los componentes reactivos no sean extraídos con etanol y si lo sean con el buffer muestra empleado para el análisis por westernblot. Por otro lado, alguna de las reactividades observadas por ELISA no fueron detectadas por westernblot. Por ejemplo no se encontró reactividad de 3B4 frente a proteínas de avena o de 1B4 frente a proteínas de centeno, reactividades que son claramente evidenciables por ELISA. Esto nos muestra que ambos análisis son complementarios, pues si bien en muchos casos dan la misma información, reforzando la confianza en lo determinado, en otros casos la aplicación de una sola técnica redundaría en una pérdida de información.

El análisis por westernblot luego de la separación mediante A-PAGE de gliadinas permite conocer la reactividad del anticuerpo analizado frente a las distintas gliadinas. Dado que la técnica de A-PAGE presenta una alta capacidad de separación de los diferentes componentes de la fracción gliadina y que en este sistema las distintas fracciones migran en regiones claramente identificables, el análisis por westernblot permite conocer en forma detallada cuales de las fracciones de gliadina son reconocidas por un anticuerpo dado. La optimización de la técnica de transferencia descripta en la Parte I fue crucial para que este tipo de análisis pudiera realizarse.

Este tipo de análisis además permite aumentar la precisión obtenida por los ensayos de ELISA de fracciones purificadas, ya que muchos componentes de las fracciones purificadas pueden individualizarse en las separaciones electroforéticas por A-PAGE, pudiendo caracterizar por westernblot la reactividad frente a subcomponentes de las distintas fracciones que no podrían ser individualizados en los ensayos de ELISA.



Calles: 1- Extracto etanólico separado por A-PAGE 2- Inmunolotting empleando 1B4 3- Inmunolotting empleando 2A1 4- Inmunolotting empleando 1C4 5- Inmunolotting empleando 3B4

Figura 2.10: Análisis por westernblot de gliadinas separadas por A-PAGE. Se empleó el sistema de transferencia descripto en la Parte I.

En la **Figura 2.10** se observa el análisis mediante westernblot de la separación por A-PAGE de un extracto etanólico de harina frente a los distintos anticuerpos estudiados. Como se puede observar 3B4 presenta un patrón amplio de reconocimiento, mostrando reactividad contra todas las subclases de gliadina. La reactividad de 2A1 esta circunscripta a las regiones de  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadina. 1C4 presenta una reactividad apreciable contra  $\gamma$  y  $\beta$ -gliadina y en menor medida contra  $\omega$ -gliadina. 1B4 presenta también una reactividad contra todas las subclases de gliadina. En este caso la concordancia con los resultados de los ensayos de ELISA de fracciones purificadas es casi total, reforzando de esta forma la certeza de la caracterización.

Mediante la aplicación de las técnicas de ELISA y westernblot en distintas condiciones se logró una caracterización de la especificidad de los anticuerpos anti-prolamina que se resume en la **Tabla 2.I**. Se puede observar que los distintos anticuerpos presentan distinto perfil de reactividad. En general se observa una correlación entre las distintas fracciones reconocidas por los anticuerpos y la homología descripta entre las distintas especies de cereales. Como fuera descripto en la Introducción del presente trabajo de Tesis Doctoral, las distintas prolaminas tienen una estructura particular, alternando dominios ancestrales conservados en mayor o menor grado por las distintas clases de prolaminas con dominios Nterminales compuestos por secuencias repetitivas. Estos dominios son en general ricos en

	cereales <sup>1</sup>						gliadinas <sup>2</sup>			secalinas <sup>3</sup>				hordeinas⁴			
	trigo	cebada	centeno	avena	maiz	arroz	α	β	γ	ω	γ45	ω+γ75	γ45+ω	γ75	γ-1	γ-2	С
1B4	+++	+++	+++				. ++	+++	+++	+++	+++	+++		1	<b>+</b> ++	+++	+++
1C4	+++	+/-5	+++				+/-	++	+++	++	┿┿┽	+/-		1	nd	nd	nd
2A1	+++	+++	++				+/-	+/-	+++	+++	++	++	++	++	+/-	+/-	+++
3B4	***			++			+++	+++	+++	+++	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sc-a-gli	+++	+++	+++	++			+++	+++	<b>+</b> ++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

<sup>1</sup>- Corresponde a los análisis de ELISA sobre los extractos etanólicos de los distintos cereales y el westernblot de

proteínas totales <sup>2</sup>- Corresponde a los análisis de ELISA sobre las fracciones purificadas y el westernblot de las gliadinas separadas por A-PAGE

<sup>3</sup>- Corresponde a los análisis de ELISA sobre las fracciones purificadas. Las fracciones  $\gamma$ -45+w y  $\gamma$ -75 fueron obtenidas por SDS-PAGE preparativo por lo que contienen SDS residual.

<sup>4</sup>- Corresponede a los análisis de ELISA sobre las fracciones purificadas por A-PAGE preparativo

<sup>5</sup>- Los resultados por ELISA son negativos, pero se observa una banda de reconocimiento por westernblot.

Tabla 2.1. Resumen de la reactividad de los distintos anticuerpos caracterizados

prolina y condicionan la estructura terciaria de la proteína. Entre las distintas variantes de cada tipo de prolaminas se pueden encontrar leves variaciones en la secuencia del patrón repetitivo, produciendo sutiles alteraciones estructurales. Las prolaminas pobres en azufre (o-gliadinas en trigo, ω-secalinas en centeno y C-hordeínas en cebada) presentan una situación particular dado que el dominio de secuencia repetitiva ocupa prácticamente la totalidad de la molécula. Estas estructuras son altamente inmunogénicas. Todos los anticuerpos aquí caracterizados reconocen con buena intensidad las distintas prolaminas pobres en azufre, estando dirigidos presumiblemente contra epitopes propios de las secuencias repetitivas. Las sutiles variaciones entre las distintas secuencias repetitivas consenso entre las distintas prolaminas explicarían la reactividad diferencial de los distintos anticuerpos. Los AcMo 1B4 y 3B4 presentan una reactividad alta frente a todas las fracciones de gliadina, tanto en ELISA como por westernblot después de una separación por A-PAGE, estando dirigidos presumiblemente contra epitopes repetitivos presentes en las distintas subclases de gliadina. Los AcMo 2A1 y 1C4 presentan una reactividad más restringida, siendo más reactivos contra γ-gliadinas. Sin embargo, la

reactividad observada frente a los distintos cereales es muy diferente entre los AcMo estudiados. 3B4 no reconoce prolaminas de cebada o centeno, mostrando una reactividad apreciable frente a aveninas por ELISA, reactividad no observada por westernblot luego de una separación por SDS-PAGE. Esta desaparición de reactividad puede deberse a que el SDS distorsiona las estructuras reconocidas por este anticuerpo o a las diferencias en los límites de detección de ambas técnicas. En cambio 1B4 no reconoce las aveninas, pero si presenta una amplia reactividad contra las distintas secalinas y hordeínas. Es notable que por blotting luego de SDS-PAGE el reconocimiento de las secalinas es tenue, mientras que por ELISA las secalinas presentan la mayor reactividad. Esta reactividad se pierde cuando las fracciones son obtenidas mediante SDS-PAGE preparativo. Esto puede deberse a que cantidades residuales de SDS causan alteraciones estructurales afectando el reconocimiento. 1C4 presenta reactividad contra secalinas, no reconociendo las distintas hordeínas y aveninas. Se observa un comportamiento similar a 1B4 frente a las fracciones que contienen SDS residual. 2A1 en cambio, reacciona con las distintas secalinas y hordeínas, aún aquellas obtenidas por SDS-PAGE preparativo. El suero antigliadina presenta una reactividad generalizada, reconociendo con buena intensidad las distintas fracciones de gliadina, secalina y hordeína y con menor intensidad las aveninas. La reactividad encontrada refleja las diferencias de homología entre las distintas secuencias de los dominios repetitivos de las diferentes prolaminas. En el caso del suero también estarían presentes anticuerpos dirigidos contra los dominios no repetitivos de las gliadinas empleadas en la inmunización.

La metodología empleada permite conocer la reactividad de los distintos AcMo frente a fracciones de prolamina purificadas. Mediante los ensayos de ELISA se puede obtener una medida cuantitativa del grado de reactividad frente a las distintas preparaciones antigénicas empleadas. La caracterización así realizada permite conocer cuales fracciones serán reconocidas por los ensayos de cuantificación en los que se empleen los AcMo.

## Optimización de ensayos de ELISA de captura empleando los distintos anticuerpos antigliadina.

A fin de estudiar la influencia del tratamiento térmico de las muestras en la cuantificación inmunoquímica de prolaminas, se optimizaron ensayos de cuantificación empleando los AcMo caracterizados. Se empleó un diseño de ensayo de captura y competición con gliadina biotinilada. De esta forma las gliadinas provenientes de la muestra compiten en fase fluída con un trazador que es la misma gliadina. Esto ofrece una ventaja teórica con respecto a los ensayos de cuantificación que usan sensibilización de la placa con gliadina y

PARTE II

competición con gliadina en fase soluble. Dicha ventaja consiste en que en el formato de captura, el anticuerpo podrá unirse al trazador o la muestra que se hallan en la misma fase, sin alteración en su estructura, mientras que en el sistema de competición con gliadina sensibilizada en la fosa la competición se establece entre la gliadina de la muestra y la adsorbida, pudiendo ésta sufrir alteraciones estructurales por el proceso de adsorción y por lo tanto pudiendo perder en este proceso alguno de los epitopes que resulten críticos para el reconocimiento por parte de los AcMo. El formato de ensayo de cuantificación con gliadina biotinilada fue desarrollado en nuestro laboratorio (Chirdo, Fossati y col. 1998). La optimización realizada consistió en ajustar las condiciones del ensayo empleando los anticuerpos anteriormente producidos, purificados y caracterizados. Para ello se deben encontrar las condiciones óptimas de sensibilización, las cuales dependerán de las características del anticuerpo a emplear.



Figura 2.11: Análisis de las condiciones de sensibilización en ensayos de captura de gliadina biotinilada empleando los distintos anticuerpos. En cada caso se detallan las concentraciones empleadas en la sensibilización. En color azul se destaca la condición de sensibilización seleccionada para los ensayos posteriores.
En la Figura 2.11 se observan las curvas de densidad óptica de los ensayos realizados sensibilizando la placa con distintas cantidades del anticuerpo, en presencia de cantidades crecientes de gliadina sin biotinilar como competidora. En todos los ensayos la reacción de desarrollo de color fue detenida a los 30 min (excepto para el 1B4 que se dejo desarrollar color hasta los 60 min). Se observa que la densidad óptica resultante aumenta al aumentar la cantidad de anticuerpo sensibilizante, hasta llegar a un punto de saturación en donde la sensibilización deja de ser limitante. Como condición de trabajo para posteriores ensayos se elige la condición en la que la densidad óptica obtenida es máxima, manteniendo la cantidad de anticuerpo empleada en el ensayo al nivel más bajo posible. Esta condición ha sido destacada en cada caso en la Figura 2.11.



Figura 2.12. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de gliadina en el sistema captura-competición con gliadina biotinilada. Para el desplazamiento se empleo una solución de gliadina comercial suspendida en etanol 70% (v/v) y cuantificada mediante la técnica de Kjeldahl. Se muestra el promedio de cinco curvas de cuantificación realizadas en experimentos independientes.

Una vez fijadas las condiciones de sensibilización se procedió a realizar ensavos de competición con gliadina no biotinilada a fin de ajustar la curva de referencia. A tal fin se empleó una solución de gliadina comercial (Sigma, USA) diluída en etanol acuoso 70% (v/v) y cuantificada por el método de Kjeldahl, solución que resultó óptima para emplear como estándar en ensayos de cuantificación. Las curvas de competición obtenidas con cada anticuerpo se muestran en la Figura 2.12. En todos los casos se observa una baja dispersión, que tiende a aumentar en los extremos de la curva. Se obtiene un rango de detección de casi cuatro órdenes de magnitud en los cinco sistemas, siendo todos ellos aptos para ser empleados como sistemas de cuantificación. Las pendientes de las curvas de cuantificación son similares, alejándose del promedio solamente los ensayos de 1C4 (pendiente 1,68) y 3B4 (pendiente 2,22). La sensibilidad es comparable entre los distintos ensayos. La concentración a la que se obtiene un valor de la función logit igual a cero corresponde a la situación en que la absorbancia obtenida es la mitad de la absorbancia máxima (la cual se obtiene, por tratarse de un ensayo de competición en ausencia de competidor). La curva de 1C4 es la más desplazada hacia la derecha, presentando un logit 0 para una concentración de antígeno igual a 1 µg/ml, indicando que las absorbancias obtenidas son cercanas al máximo de absorbancia aun a niveles medios de competidor. Las otras curvas presentan un logit 0 a valores cercanos a los 100 ng/ml.

### CONCLUSIONES

Se logró la caracterización de la reactividad de los cuatro anticuerpos monoclonales antigliadina y del suero antigliadina empleando técnicas complementarias. Por un lado mediante ensayos de ELISA indirecto, utilizando fracciones de prolaminas de diferentes cereales y por westernblot, se determinó la especificidad de los distintos anticuerpos por las prolaminas tóxicas para los pacientes celíacos. Por otra parte mediante el empleo de fracciones de prolamina purificadas en ensayos de ELISA se pudo caracterizar la especificidad de los anticuerpos por las distintas fracciones. Estudios por westernblot luego de A-PAGE confirmaron estos resultados. La reactividad de los anticuerpos frente a las prolaminas purificadas coincide con la homología entre las prolaminas de distintos cereales descripta en la literatura. La falta de reactividad frente a otras especies vegetales como maíz, arroz o soja, comunmente empleadas como sustitutos en alimentos para facientes celíacos hace que estos anticuerpos sean aptos para usarse en sistemas de detección para control de alimentos para pacientes celíacos.

Se optimizaron ensayos de cuantificación de prolaminas empleando los distintos anticuerpos. Estos ensayos tienen un formato de captura con el anticuerpo a emplear y posterior competición entre la muestra y gliadina biotinilada empleada como trazador, por lo que son aptos para estudiar el efecto del tratamiento térmico sobre la conformación de las prolaminas de una muestra de alimento como los que se desarrollarán en la Parte III.

PARTE III: ESTUDIOS DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO EN LA CUANTIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA DE GLIADINAS.

# **INTRODUCCIÓN**

Como se mencionara en la introducción general, los tratamientos térmicos pueden introducir distintos cambios estructurales en las proteínas, los cuales pueden ser intrínsecos de la estructura proteica como la desnaturalización o reacciones químicas como desaminación o  $\beta$ -eliminación de disulfuros. Por otra parte el calentamiento modifica también el tipo de interacciones entre la proteína y la matriz del alimento, pudiendo causar agregación proteica, reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro intermoleculares, reacciones de condensación tipo Maillard, etc. Todos estos cambios pueden alterar el comportamiento de los sistemas de detección de prolaminas en alimentos. En esta parte del trabajo de Tesis Doctoral se abordará el estudio de los efectos de distintos tratamientos térmicos en la interacción con anticuerpos específicos y en la performance de ensayos de cuantificación.

Dada la complejidad del sistema de prolaminas en alimentos se iniciaron los estudios en un sistema modelo de una proteína única en solución. Los resultados se describen en la sección I.

Los estudios sobre las prolaminas se realizaron en dos etapas diferentes. Un primer sistema de estudio fue emplear prolaminas purificadas tratadas térmicamente en solución a baja concentración, lo que permite medir los efectos del calentamiento sobre la estructura proteica minimizando las interacciones con otros componentes. Los resultados de estos estudios se describen en la sección II.

Finalmente los estudios de calentamiento en sistemas de alimentos, que involucran todas las interacciones intermoleculares entre proteínas y otros elementos presentes en la matriz del alimento se describen en la sección III.

# SECCIÓN I - ESTUDIOS EN UN SISTEMA MODELO: OVALBÚMINA

### INTRODUCCION

Los estudios de tratamiento térmico se comenzaron en un sistema modelo de una única proteína en solución acuosa, en el que se pudiera hacer el seguimiento por técnicas inmunoenzimáticas, químicas y fisicoquímicas de los cambios conformacionales inducidos por tratamientos térmicos. Estos trabajos permitieron optimizar las distintas técnicas y establecer una correlación entre los cambios estudiados por los diferentes métodos.

La proteína elegida para utilizar como sistema modelo fue ovoalbúmina. Esta es una fosfoproteína, componente principal de la clara del huevo, formada por una única cadena polipeptídica de 385 aminoácidos, y un peso molecular de 44 kD (Cheftel, Cuq y col., 1989). Presenta seis restos de cisteína, dos de ellos (restos 73 y 120) forman un puente disulfuro interno. Pertenece a una superfamilia de proteínas de amplia distribución en la naturaleza, llamadas serpinas, entre las que se encuentran inhibidores de las serín proteasas de plasma, proteínas ligadoras de hormonas, etc. Se ha estudiado su estructura tridimensional como modelo de estudio de las serpinas. Se encontró que posee el 30% de sus aminoácidos formando alfa-hélices y el 32% formando hojas beta-plegadas. Por difracción de rayos X se ha logrado establecer su conformación al estado cristalino con una resolución de 1,95 Å (Stein, 1990). En dispersión acuosa, esta estructura se ve alterada por cambios en el pH o variaciones en la temperatura. Es ampliamente usada por la industria alimenticia debido a sus propiedades funcionales (capacidad de retención de agua, formación de espumas, poder antioxidante, capacidad de gelificación, etc.) (Froning, 1994). Es importante la caracterización completa de los procesos que tiendan a alterar la conformación de la proteína, pues muchas de sus propiedades funcionales de interés dependen de su conformación. Por estas causas ha sido ampliamente estudiada. Han sido descriptos, entre otros, los efectos de la proteólisis sobre sus propiedades funcionales (Doi, Koseki y col., 1987), la influencia del pH y los tratamientos térmicos sobre su conformación en diferentes soluciones salinas (Koseki, Kitabake y col., 1988; Hegg, Martens y col., 1979; Hayakawa y Nakai, 1985), etc.

Por la simplicidad de su estructura, su buena solubilidad y la presencia de grupos sulfhidrilos, la ovalbúmina resultó un sistema conveniente para usar como modelo de seguimiento de los cambios conformacionales debidos a tratamientos térmicos, previo al inicio de trabajos en sistemas complejos como son los alimentos.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Muestras y tratamientos térmicos:** Para los distintos ensayos se empleó ovoalbumina (OVA) (Sigma Chemicals, St. Louis, USA). Las muestras resuspendidas en PBS a la concentración adecuada para cada ensayo fueron calentadas durante distintos tiempos en baño termostatizado. Se emplearon baños termostáticos Haake 2000 y Haake F3. Los tratamientos se realizaron en tubos plásticos de 1,5 ml de capacidad. Nunca se trabajó con volúmenes de muestra mayores de 0,5 ml. Concluído el tiempo de tratamiento, las muestras fueron enfriadas por inmersión en baño de agua-hielo. La temperatura del interior de la muestra fue registrada mediante el empleo de termocuplas de Cu-constantán y un registrador Gilson, a fin de calcular el tiempo efectivo del tratamiento isotérmico.

Todo proceso de calentamiento implica transferencia de calor del medio termostatizado a la muestra a procesar. Estos fenómenos no son instantáneos, por lo que siempre existe un estado transitorio previo al equilibrio con la temperatura exterior. La duración de este período depende de las características del sistema experimental, del tipo de material del recipiente que contiene la muestra, el espesor de las paredes del mismo y el volumen de aquella. Se observó un pequeño retraso en la llegada a la temperatura del baño. Por lo tanto se realizó una corrección teniendo en cuenta este desfasaje. Para el análisis e interpretación de los demás resultados se empleó el tiempo corregido, como tiempo de tratamiento, por ser un valor más cercano al tiempo efectivo durante el cual la muestra fue expuesta a una temperatura dada. Los enfriamientos luego de cada tratamiento siempre fueron rápidos (en general por inmersión en baño de agua-hielo), por lo que no fueron tenidos en cuenta para la corrección.

Calorimetría Diferencial de Barrido: Las corridas se realizaron en un equipo Du Pont, con celda modelo 910 a distintas velocidades de calentamiento (2, 4, 7, 10, 15, 20 °C/min). Las muestras se cargaron en cápsulas herméticas de aluminio Du Pont. Se colocaron entre 15 y 20 µl de soluciones de OVA 33% p/v. La masa de proteína colocada se determinó luego de las corridas por secado y diferencia de pesada con la cápsula vacía. Las corridas se hicieron usando como referencia una cápsula doble de aluminio vacía.

De los termogramas se obtienen datos (área de pico, temperatura de inicio de la transición (To), temperatura de pico (Td), etc.) que debidamente procesados nos permiten conocer la temperatura de la transición y el cambio de entalpía de la misma. Las ecuaciones empleadas son las siguientes:

Tp=Td-Bc-TLC

donde: TLC=(Ro.Sx.h)/Sy Ro=b/a (tomado de los termogramas de calibración de In: ver figura 1) Sx=sensibilidad en x [mv/cm] Sy=sensibilidad en y [mv/cm] h=altura de pico [cm] Bc=corrección por retardo térmico [mv] Td=temperatura de pico leída [mv] Tp=temperatura de pico corregida [mv]

Se calculó la entalpía de desnaturalización de las diferentes muestras usando la fórmula:  $\Delta H=a.Sx.E/(Sy.B)$ 

donde: a=area de pico [cm<sup>2</sup>] E=factor de calibración B=velocidad de corrida [°C/min] Sx, Sy definidos anteriormente

Las áreas de pico se midieron con un detector Jandel Scientific usando un programa lector de áreas. Los parámetros de calibración del equipo se obtuvieron de los termogramas de Indio puro (15,00 mg contra referencia de cápsula vacía), a las mismas velocidades que se corrieron las muestras.

Con los datos así obtenidos se calcularon las constantes de velocidad de desnaturalización a distintas temperaturas mediante el método de Ozawa (1970), graficando  $\ln(\beta/T^2)$  vs 1/T de donde se obtuvieron los parámetros Z y Ea de la ecuación de Arrhenius. Suponiendo una cinética de desnaturalización de primer orden se calcularon los tiempos de vida media de la proteína para distintas temperaturas de tratamiento y con estos la fracción desnaturalizada a distintos tiempos de tratamiento a esa temperatura, usando las siguientes fórmulas:

 $k=Z^{*}exp(-Ea/(R^{*}T))$ tm=2.303/k f=(1/2)<sup>t/tm</sup> donde:

k: constante de velocidad de reacción de desnaturalización  $[min^{-1}]$  a la temperatura T [°K] Z: factor preexponencial  $[min^{-1}]$ 

Ea: energía de activación [Joule/mol]

R: constante de los gases [Joule/K.mol]

tm: tiempo de vida media de la proteína nativa [min] a la temperatura T

f: fracción de proteína desnaturalizada luego de un tratamiento a T °K durante t min

A fin de constatar la validez de estos parámetros, se realizaron corridas de muestras previamente tratadas térmicamente. La fracción de área remanente del pico corresponde a la fracción nativa luego del calentamiento. Los tratamientos de las distintas muestras de OVA se realizaron sumergiendo las cápsulas de aluminio previamente selladas en un baño termostatizado Haake F3, a la temperatura y tiempo deseados. Posteriormente las cápsulas fueron enfriadas por inmersión en baño de agua/hielo. Dado el pequeño tamaño de las cápsulas, se despreciaron los tiempos de calentamiento y enfriamiento.

Medición de sulfhidrilos expuestos: Se usó la técnica de Ellmans, con algunas modificaciones (Ellmans, 1959). El reactivo empleado fue el ácido 5,5'ditiobis (2 -nitrobenzoico) (DTNB) de Sigma Chemicals, St Luis, a una concentración de 4 mg/ml en metanol. Se agregó 50  $\mu$ l de este reactivo a 1 ml de soluciones de OVA tratadas térmicamente (1 mg/ml en PBS). Se dejó reaccionar durante un tiempo mínimo de 20 min y luego se midió absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro UV-VIS de doble haz Shimadzu UV 150-02, para cuantificar el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) liberado. Para el cálculo de los SH expuestos se empleó el E (absorbancia molar) medida en el equipo en las condiciones de trabajo, usando clorhidrato de cisteína en condiciones limitantes. El valor medido fue de 13900 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, concordante con datos bibliográficos (Degani y Patchornik, 1971). A los valores medidos contra PBS se les descontaron blancos de DTNB en PBS y de OVA tratada. La concentración proteica se calculó midiendo la absorbancia de las muestras a 280 nm en el mismo equipo. Se usó el E280 de OVA de bibliografía (Lalignat, Dumay y col., 1991): 26900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Se realizó un experimento control con OVA 1mg/ml en condiciones desnaturalizantes enérgicas (urea 8M, SDS 0,1%) que se procesó como las demás muestras.

Hidrofobicidad superficial: Hay distintas técnicas que permiten cuantificar la presencia de grupos hidrofóbicos expuestos en la superficie proteica. El método empleado fue el descripto

por Kato y Nakai (1980). Como sonda fluorescente se empleó ácido anilinonaftalensulfónico (ANS, Aldrich Chemical Co).

A diferentes alícuotas de 3 ml de OVA de distinta concentración proteica (0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 y 8,0 mg/ml) se les agregó 50  $\mu$ l de ANS 8mM en PBS. Se midió luego la fluorescencia a 484 nm con una excitación UV a 364 nm en un equipo Perkin Elmer 2000. Antes de realizar las mediciones se ajustó la sensibilidad del detector de manera tal de medir 900 unidades de fluorescencia para una muestra de ANS 13,6  $\mu$ M en metanol.

La hidrofobicidad superficial se calculó como la pendiente al origen de la gráfica intensidad de fluorescencia (IF) en función de la concentración proteica. Los tratamientos térmicos, las medidas de concentración proteica, y control del calentamiento se realizaron como se describió para las técnicas de sulfhidrilos.

**Detección de OVA por ELISA**: Se realizó un ELISA competitivo, con placas Nunc Maxisorb sensibilizadas con una solución de OVA en PBS a una concentración de 1  $\mu$ g/ml, incubadas toda la noche a 4°C. La placa fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 3% (p/v). Se realizó una preincubación de una dilución adecuada de un suero de conejo anti OVA (PBS, leche en polvo 1% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v); dilución final del suero 1:300.000, previamente obtenida por titulación por ELISA) con soluciones de OVA en PBS de concentración conocida para realizar la calibración, mezcladas en volúmenes iguales e incubadas 2h a 37°C. La competición se realizó colocando 100 µl de estas mezclas preincubadas en las fosas sensibilizadas, durante 30 min a 37°C. Luego se incubó con una dilución de un anticuerpo comercial anti-inmunoglobulinas de conejo, conjugado con la enzima peroxidasa. Finalmente de reveló con una solución de ortofenilendiamina 1 mg/ml, agua oxigenada comercial diluida 1:1000 en buffer citrato pH 5,0. Se leyeron las absorbancias a 490 nm en un equipo lector de placas de ELISA EIA Strip Reader.

# RESULTADOS

Calorimetría Diferencial de Barrido: Cuando se aplica esta técnica, la muestra se somete a un calentamiento programado y se mide la diferencia de calor absorbido entre la muestra y una referencia de capacidad calorífica similar, que no presenta transiciones entre las temperaturas de trabajo. Este calor corresponde al necesario para que ocurra alguna transformación en la muestra: desnaturalización proteica, agregación, gelatinización, fusiones u otros cambios que impliquen intercambios de calor con el entorno (Harawalker, 1990).

En nuestro sistema de trabajo los picos obtenidos (**Figura 3.1.1**) son originados por la desnaturalización de la OVA. Las termogramas de la muestra sin tratamiento térmico previo presentan una endoterma con una temperatura del máximo (tp) = 89,7 + 0,2 °C y una temperatura de inicio de endoterma (to) = 75,6 + 0,2 °C, con un  $\Delta H = 4,4 + 0,4$  cal/g.



**Figura 3.1.1:** Termogramas de OVA tratada térmicamente y sin tratar. Se muestran los parámetros; to: temperatura de inicio de endoterma, tp: temperatura de endoterma. a y b empleados para obtener la constante R, utilizada en el método de Ozawa.

Al analizar muestras sometidas a un tratamiento térmico previo, se observó una disminución del área de pico (Figura 3.1.1) y un corrimiento de la tp, lo que es atribuible a la desnaturalización causada por dicho tratamiento; de la diferencia de áreas se puede calcular la fracción de proteína desnaturalizada por el tratamiento. De esta forma se puede observar que luego de un tratamiento a 90 °C 5 min prácticamente no se observa endoterma, por lo que la totalidad de la proteína ha sido desnaturalizada por dicho tratamiento, mientras que un tratamiento de 80°C 15 min genera una desnaturalización parcial de la OVA.

Para determinar la cinética de desnaturalización de OVA se empleó el método cinético descripto por Ozawa (1970). Por aplicación de dicho método se obtuvo la recta que se representa en la **Figura 3.1.2**, donde se graficó el ln de la velocidad de corrida dividido por la temperatura de pico elevada al cuadrado en función de la inversa de la temperatura de pico.



Figura 3.1.2: Recta de regresión obtenida a partir de corridas a distinta velocidad de calentamiento, como se describe en el método cinético. La pendiente es igual a -Ea/R y de la ordenada al origen se calcula el factor preexponencial Z.



Figura 3.1.3: Fracción nativa remanente vs tiempo de tratamiento, para distintas temperaturas de tratamiento. Empleando las constantes de velocidad de desnaturalización y tiempos de vida media (suponiendo cinética de primer orden) para diferentes temperaturas, se calcula la fracción remanente luego de cada tratamiento.

A partir de la misma se calculan los parámetros Z y Ea de la ordenada al origen y pendiente respectivamente, como se describió en la sección de metodología. Con estos valores se calcularon las distintas k de velocidad de desnaturalización para diferentes temperaturas, según la ecuación de Arrhenius, y los tiempos de vida media, suponiendo que el proceso de desnaturalización sigue una cinética de primer orden. En la **Figura 3.1.3** se representan los valores de fracción nativa remanente en función del tiempo de calentamiento para distintas temperaturas, calculados a partir de los parámetros cinéticos de desnaturalización.



Figura 3.1.4: Porcentaje de desnaturalización en función de la temperatura del tratamiento para un tiempo de exposición de cinco minutos (parte a) o treinta minutos (parte b). Se comparan los valores predichos por la ecuación de Arrhenius ( $\bigcirc$ ) con los obtenidos experimentalmente por calentamiento de las muestras y medición del área de pico en el DSC ( $\square$ ).

En la Figura 3.1.4 se representan los valores predichos por los parámetros obtenidos por el método cinético, contrastados con los valores hallados por medición de áreas de muestras tratadas térmicamente. En la Parte a las muestras fueron tratadas térmicamente durante 5 min., mientras que en la Parte b la duración del tratamiento térmico fue de 30 min. Se observa una pequeña diferencia entre el valor predicho y el hallado para una dada temperatura, especialmente en los tratamientos de menor duración. Esto puede deberse a que los ciclos de calentamiento y enfriamiento no hayan sido instantáneos. Esto sería más significativo a tiempos cortos, lo que explicaría la mejor concordancia de las curvas experimental y predicha a 30 min. En este caso no se pudo realizar el seguimiento térmico de la muestra por la dificultad que plantea medir la temperatura en el interior de la cápsula. Sin embargo la concordancia es satisfactoria y nos permite calcular la fracción desnaturalizada luego de someter la muestra a determinadas condiciones tiempo-temperatura. Empleando la ecuación de Wynne-Jones-Eyring (Harawalker, 1990) se calcularon los parámetros termodinámicos de activación. Los valores hallados fueron: Ea: 89,98 kcal/mol; Z: 1,4 10<sup>56</sup> min<sup>-1</sup>. Los parámetros termodinámicos de activación calculados a la tp fueron:  $\Delta S^*=$  0,197 Kcal/mol;  $\Delta H^*=$  89,26 Kcal/mol;  $\Delta G^*=$  17,78 Kcal/mol. Estos valores son inferiores a los informados por Grinberg, Burova y col. (1990). Esta diferencia podría ser atribuída al pH de la muestra. Estos autores trabajaron con un buffer de pH 2,9. La OVA es más inestable en esas condiciones que en el buffer de pH 7,4 empleado en nuestras experiencias.

Hidrofobicidad superficial: Las diferentes técnicas de medición de la hidrofobicidad superficial se encuadran dentro de dos grandes grupos, las que usan el fenómeno de "apagado" como parámetro a medir y las que aplican las llamadas sondas fluorescentes. La técnica aquí empleada pertenece al segundo tipo de mediciones. La sonda usada, ANS, presenta un significativo aumento de la fluorescencia a 485 nm cuando se asocia a grupos aromáticos como los de los aminoácidos tirosina, fenilalanina o triptofano presentes en las proteínas. De esta manera, el aumento de la intensidad de fluorescencia de este compuesto en presencia de proteínas en solución se puede tomar como un índice del número de aminoácidos aromáticos expuestos en la superficie proteica (Cardamone, 1992).

Hay diferentes métodos para cuantificar la hidrofobicidad superficial con técnicas como la empleada, desde estudios de interacción proteína-ligando hasta la definición de parámetros sencillos proporcionales al número de sitios hidrofóbicos expuestos (Lalignat, Dumay y col., 1990). Se eligió la medición de la hidrofobicidad superficial (Ho) por una de estas técnicas: Ho corresponde a la pendiente al origen de la gráfica de Intensidad de Fluorescencia en función de la Concentración Proteica, a una concentración de sonda constante, pues se deseaba obtener un parámetro proporcional a la cantidad de grupos hidrofóbicos superficiales, lo que se asocia directamente a la conformación proteica.

Los resultados (Figura 3.1.5) muestran un comportamiento lineal de la intensidad de fluorescencia frente a diferentes concentraciones proteicas, con una correlación superior a 0.999.

Las mediciones se realizaron en condiciones en las cuales la sonda fluorescente no alcanzó a quedar en cantidades limitantes, por lo que no llegó a observarse un achatamiento de la curva a altas concentraciones proteicas.



Figura 3.1.5: Intensidad de Fluorescencia en función de Concentración Proteica. La concentración de ANS fue de 105 µM. Cada grupo de muestras sufrió un tratamiento equivalente.



Figura 3.1.6: Hidrofobicidad superficial en función del tiempo para diferentes temperaturas.

La Ho de la OVA sin tratar es de 32 Unidades de Hidrofobicidad (UH), donde UH equivale a unidades de fluorescencia en las condiciones de medida/mg de proteína. Se observó un aumento neto de la hidrofobicidad superficial con los distintos tratamientos térmicos (Figura 3.1.6), tanto al incrementar la temperatura para un tratamiento a un tiempo fijo, como procediendo de manera inversa. Estos tratamientos ocasionan un cambio conformacional con mayor exposición de sitios hidrofóbicos que en la proteína nativa estaban inicialmente en el interior de la estructura, lo que se traduce en una mayor capacidad para asociarse a la sonda empleada. Se observa que los tratamientos que producen un mayor aumento de la hidrofobicidad

superficial son aquellos que presentan un alto grado de desnaturalización como se puede comprobar con los resultados obtenidos por DSC.

Sulfhidrilos expuestos: En general las distintas técnicas de medición de grupos sulfhidrilo se basan en el uso de reactivos que reaccionan con grupos SH y liberan sustancias mensurables espectrofotométricamente. Los resultados dependerán de la reactividad del agente empleado y del grado de exposición de los sulfhidrilos en la proteína (Fernández Diez, 1964).

En nuestro caso el DTNB reacciona intercambiando su enlace disulfuro con sulfhidrilos proteicos, liberando un producto coloreado, el TNB, cuantificable por lectura de absorbancia a 412 nm. No reacciona con la proteína nativa, lo que indica que los sulfhidrilos no se hallan expuestos sino plegados hacia el interior hidrofóbico de la OVA.



Figura 3.1.7: Sulfhidrilos expuestos en función del tiempo de exposición a distintas temperaturas de tratamiento.

Como se aprecia en las **Figura 3.1.7**, los distintos tratamientos térmicos son más o menos efectivos para aumentar la exposición de estos sulfhidrilos, lo que dependerá del grado de desplegamiento que provoquen. Se observa que el aumento de sulfhidrilos se logra tanto con el aumento del tiempo de exposición a una temperatura dada, como a un tiempo de tratamiento fijo, aumentando la temperatura de tratamiento.

Un desplegamiento total de la proteína debería provocar la exposición de cuatro sulfhidrilos por molécula (Doi, Kitabake y col., 1989), lo que no se obtiene en las condiciones de trabajo, a pesar de lograrse una desnaturalización total, como se corrobora con las mediciones calorimétricas. Esto puede ser causado por una oxidación de los grupos sulfhidrilo a la

temperatura de tratamiento, por un ocultamiento parcial de los restos sulfhidrilo por agregación proteica o por el efecto combinado de ambos fenómenos (Arntfield, 1991; Hayakawa y Nakai, 1985). Controles realizados con OVA desnaturalizada en presencia de urea 8M y SDS 0,1% dieron un resultado de 4,1 +/- 0,15 grupos SH por molécula, lo que era esperable dado que en estas condiciones el grado de desenrrollamiento de la proteína es máximo.

Con las distintas técnicas empleadas se pudo caracterizar la desnaturalización térmica de la OVA. Los cambios conformacionales introducidos por el calentamiento presentan una correlación con los diferentes parámetros estudiados. A partir de las mediciones realizadas se obtuvo una representación del comportamiento del sistema según sea sometido a diferentes condiciones tiempo-temperatura. En la **Figura 3.1.8** se grafica el comportamiento del sistema en función de las diferentes condiciones experimentales. Los cambios en la estructura terciaria introducidos tienen influencia directa sobre las propiedades determinadas, de allí la gran correlación que se observa entre las tres gráficas. En todos los casos encontramos una aguda transición en la zona de temperaturas entra 80 y 85 °C y un cambio abrupto para tiempos muy pequeños a temperaturas superiores.



Figura 3.1.8: Parte a: Representación de la función fracción de proteína desnaturalizada frente a las variables tiempo y temperatura, según los parametros de la ecuación de Arrhenius. Parte b: Hidrofobicidad superficial en función del tiempo y la temperatura de tratamiento. La función se representó a partir de los puntos experimentales obtenidos. Parte c: Sulfhidrilos expuestos en función del tiempo y temperatura de tratamiento. Representada a partir de los puntos obtenidos experimentalmente.

En la **Figura 3.1.8 Parte a** se observa la fracción de proteína desnaturalizada predicha a partir de la ecuación de Arrhenius, que presenta un aumento abrupto, para llegar rápidamente a un máximo de 100% de desnaturalización, lo que significa que a partir de una cierta temperatura, alrededor de los 80°C todos los tratamientos con un tiempo de exposición suficiente (del orden de minutos) producen una desnaturalización prácticamente total.

La **Parte b** presenta características similares a la anterior. El hecho de que la meseta presente un decrecimiento hacia temperaturas y tiempos mayores se debe a que en estas condiciones aparecen fenómenos de agregación proteica que hacen que la sonda fluorescente tenga menos sitios de unión disponibles, con la consecuente disminución aparente de la hidrofobicidad superficial.

Los sulfhidrilos expuestos también presentan un comportamiento tiempo-temperatura comparable, con un patrón de cambio muy agudo en la zona de temperaturas cercanas a los 85°C (Parte c).

De estos resultados se deduce que OVA presenta grandes cambios conformacionales cuando es sometida a temperaturas superiores a los 80 °C durante tiempo suficiente, lo que repercute sobre las diferentes propiedades evaluadas.

### Reactividad inmunoquímica de OVA tratada térmicamente

En la Figura 3.1.9 se representa la variación de la reactividad inmunoquímica de la OVA tratada térmicamente medida por el ensayo de ELISA descripto, en función del tiempo de tratamiento, para distintas temperaturas de tratamiento. Tratamientos a temperaturas menores a 70 °C no modifican la reactividad inmunoquímica medida por ELISA. Para temperaturas mayores se observa, en todos los casos, un aumento progresivo de la reactividad con el tiempo de tratamiento. Este aumento es seguido por un descenso de la misma, existiendo así para cada temperatura, un tiempo de tratamiento que produce la máxima reactividad inmunoquímica.

Cuanto mayor es la temperatura de tratamiento se observa una mayor variación en la reactividad y un acortamiento de los tiempos de tratamiento que otorgan el máximo de reactividad. Tratamientos a temperaturas entre 70 y 80 °C presentan aumentos de 3 a 7 veces de la reactividad inmunoquímica para diferentes tiempos, con un suave descenso posterior (Figura 3.1.9a). El tratamiento a 85 °C provoca el máximo aumento de la reactividad, llegando a casi 20 veces del valor de reactividad original. El descenso posterior es abrupto, alcanzándose, para tratamientos mayores de 15 minutos, el 5 % de la reactividad original.

Tratamientos a temperaturas superiores presentan un comportamiento similar, como se observa en la Figura 3.1.9b. En estas condiciones se mantiene la tendencia del acortamiento del

tiempo de máxima reactividad pero se observa que el aumento en la misma no es tan pronunciado como en tratamientos a menores temperaturas. La pérdida de reactividad es tanto más pronunciada, llegando a valores inferiores al 3% del correspondiente a la muestra sin tratar para tiempos de tratamiento inferiores a cinco minutos.



Figura 3.1.9 : Dependencia de la reactividad inmunoquímica medida por ELISA con el tiempo de tratamiento a diferentes temperaturas. Parte a: tratamientos a 70°, 80° y 85 °C. Parte b: tratamientos a 90°, 95° y 100°C. Cada punto de la misma es el promedio de cinco mediciones realizadas en muestras independientes en distintos ensayos para iguales condiciones de tratamiento

La Figura 3.1.10 nos muestra la variación de la reactividad inmunoquímica frente a las variables tiempo y temperatura de tratamiento. Se observa un comportamiento diferente al descripto para el grado de desnaturalización. Para condiciones tiempo-temperatura cercanas a los 85°C y del orden de los minutos, se observan las mayores reactividades, presentando aumentos de hasta 10 veces respecto a la del estado nativo. Tratamientos poco desnaturalizantes no alteran la reactividad y tratamientos muy prolongados o a temperaturas mayores de 90°C inducen una pronunciada caída de la reactividad, hasta valores cercanos a cero.

La reactividad inmunoquímica no presenta una correlación lineal con el grado de desnaturalización, como se observa en la Figuras 3.1.9 y 3.1.10. Los tratamientos parcialmente desnaturalizantes causan un gran aumento de la reactividad. Para tratamientos totalmente desnaturalizantes la reactividad encontrada es muy variable, observándose una fuerte caída para los tratamientos más enérgicos. Este comportamiento contrasta claramente con las otras variables estudiadas.



Figura 3.1.10: Variación de la reactividad inmunoquímica con las distintas condiciones tiempotemperatura de tratamiento.

Durante el tratamiento térmico la ovalbúmina va adquiriendo distintas conformaciones, presentando alteraciones incluso en su estructura secundaria (Hegg, Martens y col., 1979). Tratamientos suaves aumentan la exposición de epitopes reconocidos por el suero empleado, aumentando la reactividad inmunoquímica. Tratamientos enérgicos conducen a la desaparición de prácticamente todos los epitopes conformacionales reconocidos por el mismo y favorecen la agregación, lo que explica la caída en la reactividad observada. Este fenómeno ha sido descripto por Wolberg, Liu y col. (1970) empleando seroalbúmina bovina como proteína de estudio y hemaglutinación como método de detección. Hasta el presente no se ha descripto un estudio del efecto del calentamiento en distintas condiciones tiempo temperatura sobre la reactividad inmunoquímica de ovalbúmina. Los estudios realizados por Breton, Phan Thanh y col. (1988a) caracterizaron, empleando distintas técnicas inmunoquímicas, la reactividad de OVA nativa o tratada durante 30 min. a 100 °C. Hallaron que en ciertos formatos de ensavo la reactividad de la OVA tratada frente al suero empleado era mayor que la correspondiente a la proteína nativa. Optimizaron un ELISA de detección de OVA en productos específicos (Breton, Phan Thanh y col., 1988b) o de control de procesos de calentamiento (Varshney y Paraf 1990). Sajdok, Pozárková y col. (1989) llevaron a cabo un estudio de la variación de la reactividad inmunoquímica con el tratamiento térmico a diferentes pHs. Informaron un descenso en la reactividad con el calentamiento. Sin embargo estudiaron un número restringido de condiciones tiempo-temperatura y emplearon una técnica de menor sensibilidad, rocket inmunoelectroforesis.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio presentan algunas diferencias con la literatura. Se han estudiado una amplia gama de tratamientos térmicos capaces de introducir un variado grado de desnaturalización, desde pequeñas alteraciones hasta una desnaturalización total. Esto permitió observar los cambios en la inmunodetección introducidos por calentamientos muy diversos, observándose un aumento en la cantidad cuantificada en muestras que sufrieron calentamientos suaves, los que introducen un bajo grado de desnaturalización. Tratamientos más enérgicos producen mayor grado de desnaturalización y una consecuente baja en la inmunodetección. Este tipo de comportamiento es el más documentado en la literatura en el sistema ovalbúmina (Breton, Phan Thanh y col. 1988a; Sajdok, Pozárková y col. 1989), no existiendo información respecto al aumento de la reactividad por desnaturalización leve como la observada en nuestro laboratorio. Este comportamiento ha sido observado en sistemas de proteínas de soja, habiendo sido descriptos aumentos en la inmunoreactividad luego de tratamientos térmicos leves, (Plumb, Lambert y col., 1995).

# CONCLUSIONES

Con las distintas técnicas empleadas se pudo caracterizar la desnaturalización térmica de la OVA. Se observa que la misma sufre alteraciones conformacionales de gran magnitud cuando es sometida a distintos procesos de calentamiento. El desenrrollamiento de la estructura proteica es gradual y dependiente del tratamiento térmico. Esto provoca una exposición creciente de los restos aminoacídicos que se hallan en el interior de la estructura nativa. El trabajo en el sistema modelo permitió optimizar las distintas técnicas de calentamiento y de medición de parámetros relacionados con la conformación proteica. A su vez estos resultados nos muestran claramente las grandes diferencias que pueden observarse en la cuantificación inmunoquímica, a causa de las alteraciones estructurales introducidas por el calentamiento.

# SECCIÓN II - EL SISTEMA GLIADINAS: ESTUDIOS DE CALENTAMIENTO EN FASE SOLUBLE

#### INTRODUCCION

Para estudiar las influencias del tratamiento térmico sobre la inmunodetección de gliadinas debemos considerar que este sistema presenta dos grandes diferencias con el modelo anteriormente descripto. Una primer gran diferencia consiste en que los estudios con ovalbúmina implicaban la interacción entre los anticuerpos y una única proteína, homogénea y soluble en soluciones salinas. En el sistema gliadinas, la interacción de los anticuerpos empleados en los distintos ensayos se establece con un amplio grupo de proteínas que, como se discutió en la Parte II, presenta analogías estructurales y homología parcial. Otro factor que aumenta la complejidad de la problemática es que previamente a la detección inmunoquímica se deben extraer las proteínas tóxicas de la matriz del alimento, proceso que también se puede ver afectado por el tratamiento térmico del alimento. Estes dos cuestiones serán abordadas en las secciones II y III que se discuten a continuación.

Las gliadinas, como se indicó previamente, son un gran número de proteínas que poseen estructuras relacionadas. Esto hace que las propiedades analizadas sean un promedio de las mismas en el total de la población molecular estudiada, haciendo dificil la interpretación de los resultados experimentales. El calentamiento puede introducir cambios en la estructura de las gliadinas que terminen afectando su inmunoreactividad. Para diferenciar este evento de los fenómenos de alteraciones en la extracción de la matriz del alimento se recurrió a sistemas de calentamiento de gliadinas en fase soluble, siguiendo procedimientos similares a los descriptos para el sistema modelo de ovalbúmina. De esta forma se puede determinar la magnitud de las alteraciones sobre la reactividad introducidas por alteraciones en la estructura proteica, sin tener en cuenta las posibles interacciones con la matriz del alimento durante el calentamiento. Esta aproximación experimental tiene la desventaja de someter a la proteína a un tratamiento térmico en un medio totalmente diferente a la matriz del alimento, pero constituye a la vez una forma de estudiar los efectos del calentamiento sobre la conformación proteica en forma independiente de los efectos del mismo en la extracción de las gliadinas de la matriz del alimento.

El objetivo de este estudio es la evaluación de la estabilidad térmica de las fracciones de gliadina purificadas, a fin de determinar si existe alguna fracción de marcada estabilidad,

que pudiera constituirse en un blanco ideal de los ensayos de cuantificación para alimentos procesados o si los cambios de reactividad con el tratamiento térmico son homogéneos para las distintas fracciones purificadas.

# **MATERIALES Y METODOS**

**Muestras y tratamientos térmicos:** Las muestras analizadas fueron extractos etanólicos de harina de trigo (*T. aestivum*, cv. Oasis) obtenidos como fuera descripto anteriormente. También se analizaron fracciones de gliadina purificadas por electroforesis preparativa, como fuera descripto en la Parte I. Los tratamientos térmicos se realizaron por inmersión en baños termostatizados, como fuera descripto para el sistema ovalbúmina. El control de temperatura se realizó como se describió en la Sección I de esta Parte.

Determinación de la concentración de gliadinas por ELISA: Se realizó como fuera descripto en la Parte II, empleando un formato de captura y competición con gliadina biotinilada. Los ensayos se realizaron empleando como agente sensibilizante, alternativamente, a los cuatro anticuerpos monoclonales cuya caracterización fue descripta en la Parte II o a la fracción gama globulina de conejo, purificada por FPLC de intercambio aniónico, de un suero de conejo antigliadina.

Las condiciones de cada ensayo fueron las descriptas en la Parte II. Se optimizaron a su vez las condiciones de cuantificación frente a cada fracción realizando curvas de desplazamiento con las distintas fracciones de gliadina purificadas.

### **RESULTADOS**

Con el objeto de caracterizar la estabilidad térmica de cada una de las fracciones de gliadina purificadas se realizaron ensayos de cuantificación de muestras de fracciones purificadas sometidas a distintos procesos de calentamiento. Para este tipo de ensayos se debe contar con sistemas de cuantificación en donde en lugar de emplear una mezcla de gliadinas como estandar, se empleen como referencia gliadinas de la misma clase a estudiar, en concentraciones conocidas. Esto se debe a que en muchos casos, como se discutió previamente, la afinidad relativa de un anticuerpo por las distintas fracciones de gliadina es diferente, de manera que si se trabaja con fracciones purificadas, las condiciones de competición serán comparables sólo si esta se realiza con fracciones de la misma composición. Para tal fin se deben realizar curvas de desplazamiento empleando como referencia las distintas fracciones purificadas.

Los perfiles del análisis por electroforesis capilar y A-PAGE de las distintas fracciones de gliadina purificada empleadas para los estudios de calentamiento en fase soluble se pueden apreciar en la Figura 2.4, ya que son los mismos que los empleados en la caracterización de los anticuerpos.



Figura 3.2.1. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de fracciones de gliadina purificadas empleando un ELISA de captura-competición con gliadina biotinilada con el AcMo 1B4 como anticuerpo de captura.



Figura 3.2.2. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de fracciones de gliadina purificadas empleando un ELISA de captura-competición, con gliadina biotinilada, con el AcMo 1C4 como anticuerpo de captura.



Figura 3.2.3. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de fracciones de gliadina purificadas empleando un ELISA de captura-competición, con gliadina biotinilada, con el AcMo 2A1 como anticuerpo de captura.



Figura 3.2.4. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de fracciones de gliadina purificadas empleando un ELISA de captura-competición, con gliadina biotinilada, con el AcMo 3B4 como anticuerpo de captura.



Figura 3.2.5. Curvas de desplazamiento con distintas concentraciones de fracciones de gliadina purificadas empleando un ELISA de captura-competición, con gliadina biotinilada, con el suero antigliadina purificado como anticuerpo de captura.

En las **Figuras 3.2.1 a 3.2.5** se muestran las curvas de desplazamiento (modificadas por la transformación logit, (Tijjsen, 1987)) de los distintos anticuerpos con las fracciones de gliadina purificadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$ -rápida. Para el desplazamiento se emplearon fracciones de gliadina purificadas y cuantificadas mediante la técnica de Lowry. Se muestra un promedio de 6 determinaciones, con el desvío estandar correspondiente, realizadas en experimentos independientes. En los casos en que el anticuerpo a emplear es de baja afinidad por una fracción dada, se amplió el rango de concentraciones de la curva de cuantificación a fin de observar desplazamiento.

Las curvas de calibración obtenidas empleando el AcMo 1B4 frente a las distintas fracciones de gliadina purificadas (Figura 3.2.1) presentan una pendiente similar. Este anticuerpo presenta una reactividad equivalente frente a las distintas fracciones, como se demostró en la Parte II, de manera que las distintas fracciones causan un desplazamiento similar en el ensayo competitivo con gliadina biotinilada.

El anticuerpo 1C4 (Figura 3.2.2) presenta diferencias en las curvas de desplazamiento obtenidas con las distintas fracciones. Este anticuerpo presenta una baja reactividad contra  $\beta$ -y  $\omega$ -gliadinas, siendo aun menor para  $\alpha$ -gliadina. Por esta razón, para la realización de la curva de desplazamiento se emplearon suspensiones de gliadina más concentradas que en los otros casos. La curva de  $\alpha$ -gliadina y la de  $\beta$ -gliadina se realizaron con diluciones seriadas a partir de suspensiones de 20 µg/ml y la de  $\omega$ -gliadinas a partir de una dilución de 50 µg/ml. Las diferencias de reactividad comentadas se reflejan en las características de las curvas obtenidas. En el caso de  $\alpha$ -gliadina, debido a la baja reactividad, la mayor concentración de gliadina empleada no llega a producir un logit = 0, mientras que para  $\gamma$ -gliadina el logit = 0 se obtiene a las menores concentraciones (cercanas a 2 mg/ml).

El anticuerpo 2A1 presenta una reactividad diferencial frente a las distintas fracciones, lo que también se ve reflejado en las curvas de competición obtenidas (Figura 3.2.3). Las curvas de las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$ -gliadina están más desplazadas hacia la derecha, presentando valores de logit = 0 entre 100 ng/ml y 1 mg/ml, reflejo de la menor reactividad contra dichas fracciones. El comportamiento frente a  $\gamma$  y  $\omega$ -gliadina es diferente, mostrando un valor de logit = 0 para valores cercanos a 1 ng/ml, indicando que menores concentraciones de estas fracciones pueden producir desplazamiento del trazador biotinilado del 50%.

Las curvas obtenidas con el anticuerpo 3B4 frente a las distintas fracciones de gliadina son similares (Figura 3.2.4). Este anticuerpo presenta una reactividad comparable frente a las distintas fracciones. Lo mismo ocurre con las curvas obtenidas con las distintas fracciones empleando el suero antigliadina purificado como anticuerpo de captura (Figura 3.2.5).

En todos los casos se obtienen ensayos con un rango de cuantificación aceptable, que permitirá el estudio de las efectos introducidos por el calentamiento en las distintas fracciones purificadas de gliadina.

A tal efecto se realizaron ensayos de calentamiento de las fracciones diluidas en PBS a la concentración de análisis. La concentración de las fracciones purificadas empleada para cada ensayo dependió de las característica del mismo, dado que según de que anticuerpo o que fracción se tratase, la sensibilidad del ensayo era diferente. Siempre se emplearon las menores concentraciones posibles para minimizar las pérdidas de reactividad por agregación proteica. De todas formas, las máximas concentraciones de trabajo estuvieron en 1µg/ml de proteína. En todos los ensayos se preparó una única dilución de trabajo de la fracción a estudiar y la misma fue analizada en el ensayo en seis fosas diferentes. En cada caso se realizó una curva de calibración del ensayo empleando la misma fracción en estudio, con la cual se calculó el valor de referencia de la fracción sin tratar, y los valores obtenidos para cada una de las muestras luego de los distintos tratamientos. Se analizaron tres fosas para cada una de las fracciones térmicos. Los ensayos se repitieron al menos cinco veces para cada una de las fracciones estudiadas.

La Figura 3.2.6 muestra el promedio de los 5 replicados de cada ensayo. Los resultados se refirieron siempre a la muestra sin tratamiento térmico a la que se asignó el valor de 100% de reactividad, de manera que las diferencias en la cuantificación introducidas por el tratamiento térmico se manifiestan como aumentos o disminuciones porcentuales comparadas con la muestra control. Las barras de error representan la dispersión interensayo, que en promedio es del 20%. Existe una fuerte dependencia de comportamiento según con qué AcMo se realice el ensayo.

Se observa que el empleo de 1B4 como anticuerpo de captura muestra aumentos en la reactividad para las muestras de  $\alpha/\beta$  gliadina tratadas. Este aumento de reactividad es mayor para tratamientos no muy enérgicos (70 u 80°C durante 1 min), pudiendo llegar hasta aumentos del 100% en la reactividad. Tratamientos a temperaturas mayores no producen aumentos tan significativos, tendiendo al valor control para tratamientos a 100°C. El comportamiento en este ensayo de las fracciones  $\gamma$  y  $\omega$  es diferente, ya que su reactividad tiende a mantenerse inalterada o disminuir levemente con los distintos tratamientos. La mayor caída en la reactividad la sufre la fracción  $\omega$  para un tratamiento de 100°C 20 min, cayendo su reactividad al 60% de la reactividad de la muestra sin tratar.

Los ensayos empleando 1C4 presentan un comportamiento parecido al descripto. Los tratamientos suaves producen un aumento en las reactividades de las fracciones  $\alpha$  y  $\beta$ , mientras que la reactividad de las fracciones  $\gamma$  y  $\omega$  no se altera en forma significativa. En el

caso de este monoclonal el aumento en la reactividad de  $\alpha$  y  $\beta$  gliadina es aun más notable que en el caso anterior, llegando a aumentar la reactividad hasta 3,5 veces respecto a la de la muestra sin tratar, para tratamientos de 80°C 10 min, realizados sobre  $\beta$ -gliadina. Dado que este AcMo presenta una menor reactividad por  $\alpha$  gliadina, estos ensayos de desplazamiento se deben realizar empleando una suspensión de  $\alpha$ - gliadina de 1 µg/ml.



Figura 3.2.6: Ensayos de cuantificación, empleando el sistema captura-competición con gliadina biotinilada, de fracciones sometidas a distintos tratamientos térmicos. Los resultados se refieren a la fracción sin tratar tomada como 100% de reactividad. Se muestra el promedio de 5 determinaciones. Se indican los distintos tratamientos térmicos empleados.

El empleo de 2A1 muestra un comportamiento diferente. En general todos los tratamientos térmicos inducen una disminución de la reactividad, siendo esta más notoria para las  $\beta$  y  $\gamma$  gliadinas. La fracción  $\omega$  casi no ve afectada su reactividad por los distintos tratamientos térmicos cuando es estudiada con este AcMo.

El estudio llevado a cabo con el AcMo 3B4 muestra una disminución de la reactividad de todas las fracciones luego de los distintos tratamientos térmicos. Todas las fracciones se comportan de forma similar, siendo mayor la caída de la reactividad cuanto más enérgico es el tratamiento térmico. Los tratamientos más drásticos (100°C 20 min) provocan una caída de la reactividad de un 20% en promedio.

El estudio empleando el suero de conejo purificado muestra un comportamiento particular. Las distintas fracciones presentan comportamientos ligeramente diferentes. Las  $\beta$ -gliadinas tienden a aumentar su reactividad, siendo este aumento mayor para los tratamientos menos enérgicos. Las otras fracciones disminuyen ligeramente su reactividad con los distintos tratamientos, siendo la fracción  $\omega$  la menos sensible a los tratamientos (caída en su reactividad a un 80% de la reactividad original para el tratamiento más enérgico) y la  $\alpha$ -gliadina la más sensible (caída de reactividad al 60% del valor original para el tratamiento más enérgico).

Estos resultados indican que hay una dependencia clara de la variación de la reactividad luego del calentamiento con el tipo de anticuerpo que se emplee para medirla. A su vez, el grado de alteración introducido dependerá de las condiciones tiempo-temperatura a las que sea sometida la muestra. Según el caso, fueron encontrados aumentos, disminuciones o falta de cambios en la reactividad inmunoquímica. Por otra parte del análisis del conjunto de resultados obtenidos no aparece claramente ninguna fracción como termoestable. No existen grandes diferencias en cuanto a la estabilidad térmica de las distintas clases de gliadinas, al menos con los cinco sistemas estudiados.

Se han descripto muy pocos estudios inmunoquímicos de cambios de reactividad de prolaminas debido a tratamiento térmico. Ellis, Doyle, Ciclitira y col. (1994) empleando un sistema de cuantificación basado en un anticuerpo monoclonal dirigido contra el péptido 3-56 de A-gliadina describieron diferencias en la reactividad de distintas fracciones de gliadina purificadas, con una conservación de la reactividad del 93% para  $\omega$ -gliadinas y del 33% para  $\alpha$ -gliadinas, con valores intermedios para  $\beta$  y  $\gamma$ -gliadinas. Sin embargo estos autores no aclaran el procedimiento de calentamiento seguido ni los cálculos realizados para obtener dichos resultados. Trabajos de Skerritt y Smith (1985) intentaron establecer la labilidad térmica de las distintas gliadinas. Se basaron en estudios de westernblot sobre suspensiones de harina en agua previamente calentadas. Empleando este sistema demostraron que se mantenía la reactividad de las  $\omega$ -gliadinas aun frente a tratamientos térmicos de 100°C durante 100

minutos. Como emplearon un AcMo específico para las  $\omega$ -gliadinas, no determinaron qué ocurre con la reactividad de las otras fracciones. Observaron, mediante los análisis de separación por A-PAGE que la cantidad extraída de las otras fracciones disminuía paulatinamente a medida que se aumentaba la duración del calentamiento a 100°C.

Schofield, Bottomly y col., (1983) realizaron estudios pioneros de caracterización de los mecanismos de agregación de proteínas de gluten debida a tratamientos térmicos. Concluyeron que el principal mecanismo de agregación –y consecuentemente de pérdida de solubilidad- es debido a la formación de puentes disulfuro intercatenarios, siendo las  $\omega$ -gliadinas las menos afectadas dada su carencia de restos de cisteína.

Toda esta evidencia sirvió para establecer el concepto de termoestabilidad de las  $\omega$ gliadinas y de la labilidad térmica de las otras fracciones. De esta forma se propusieron ensayos de cuantificación basados en el uso de AcMo específicos para  $\omega$ -gliadina, de manera que pudiesen ser aplicados a alimentos tratados térmicamente (Skerritt, 1985). Incluso estos métodos han sido aprobados como métodos oficiales de la AOAC (Skerritt y Hill, 1991).

Los resultados presentados en esta Sección relativizan el concepto de estabilidad térmica diferencial de una fracción con respecto a las otras. Empleando cuatro AcMo diferentes y un suero antigliadina, de acuerdo a un protocolo que comprendió distintas condiciones tiempo-temperatura de calentamiento, se pudo observar que las distintas fracciones, si bien presentan comportamientos diferentes unas de otras, mantienen un alto porcentaje de su reactividad incluso luego de ser sometidas a las condiciones más enérgicas (100°C durante 20 min). Existe también una dependencia del comportamiento según cuál sea el AcMo empleado para la cuantificación. Los resultados obtenidos empleando un suero antigliadina o el AcMo 3B4 mostraron una baja dependencia de la historia térmica de la muestra. La diferencia con los trabajos anteriormente mencionados puede surgir de las diferencias en los protocolos experimentales seguidos. Los trabajos de Skerritt y Smith (1985) y de Schofield, Bottomly y col. (1983) se basan en el análisis electroforético o por westernblot de suspensiones acuosas de harina tratadas térmicamente, de manera que estos autores observan la resultante de dos procesos: la alteración de la estructura proteica causada por el calentamiento y los cambios en la solubilidad de las distintas fracciones de gliadina debidos al calentamiento. En nuestro sistema sólo se observa el primer efecto. Del segundo efecto nos ocuparemos en la sección siguiente. Además la metodología empleada es diferente, ya que la sensibilidad y capacidad cuantitativa de los métodos empleados en los trabajos de Skerritt y Smith (1985) y Schofield, Bottomly y col. (1983), es inferior a la de los ensayos de ELISA realizados en nuestro laboratorio. Ellis, Doyle, Ciclitira y col. (1994) emplearon sistemas de ELISA, aunque trabajaron con un solo anticuerpo monoclonal, de manera que sus resultados

pueden ser debidos a la particularidad de los epitopes reconocidos por dicho AcMo. Por otro lado, estos autores no indicaron cómo fue el tratamiento térmico aplicado a las fracciones purificadas para determinar la resistencia térmica de las mismas. Los resultados aquí referidos fueron obtenidos con un panel de cuatro AcMo y un suero policional, luego de distintos tratamientos térmicos, de manera que pueden ser tomados como parte de un comportamiento general de las gliadinas.

Por otra parte, el uso de un ensayo basado solamente en la detección de las  $\omega$ -gliadinas ha sido cuestionado por distintos autores (Ellis, Doyle y col., 1994, Wieser, Seilmeier y col., 1994) pues esta fracción de gliadina es minoritaria con respecto a las gliadinas ricas en azufre, encontrándose representada en un nivel variable en los distintos cultivares. Se describieron variaciones entre un 5 y un 20% del contenido de  $\omega$ -gliadina en distintos cultivares (Wieser, Seilmeier y col., 1994) por lo que la aplicación de un método de cuantificación que detecte sólo  $\omega$ -gliadina como el planteado por Skerritt y Smith (1985) y aceptado como método oficial de la AOAC (Skerrit y Hill, 1991) produciría errores de más del 50% por exceso o defecto dependiendo del tipo de cultivar analizado.

# CONCLUSIONES

Los ensayos de calentamiento de fracciones de gliadina purificadas mostraron resultados dependientes del tipo de AcMo empleado en el inmunoensayo. No se observó una marcada diferencia respecto a la estabilidad térmica de las distintas fracciones. Todas presentaron grados de labilidad comparables. Este hecho es crucial al momento de seleccionar AcMo destinados a la cuantificación de alimentos tratados térmicamente. No existirían restricciones con respecto a qué fracciones deberían ser reconocidas por dicho anticuerpo, sino que pasaría a ser fundamental la realización de un estudio de estabilidad térmica de los epitopes reconocidos, en forma análoga al descripto en esta sección.

# SECCIÓN III - ENSAYOS DE CALENTAMIENTO SOBRE MUESTRAS MODELO DE ALIMENTOS: MASAS Y HARINAS.

## **INTRODUCCION**

Los distintos ensayos de cuantificación descriptos presentan diferencias respecto al tipo de anticuerpos empleados, formato del análisis, etc. Sin embargo todos presentan en común un paso inicial de extracción de las proteínas a determinar a partir de la matriz del alimento. Este proceso de extracción puede ser afectado por el tratamiento térmico. El solvente más comúnmente empleado para realizar la extracción de las prolaminas del alimento es el etanol acuoso (Howdle y Losowski, 1990). Como se mencionó anteriormente, los fenómenos de alteraciones covalentes, desnaturalización y agregación proteica originados por el calentamiento dificultan la extracción. A fin de estudiar los efectos de estos procesos sobre la cuantificación inmunoquímica, se trabajó sobre distintos sistemas modelo de masas sometidas a diferentes procesos de calentamiento. Posteriormente se estudió, sobre los extractos, la cantidad de proteínas, el perfil proteico y la cantidad de proteína inmunorreactiva. A su vez se realizaron estudios del efecto del calentamiento sobre las gliadinas en distintas matrices libres de gluten, a fin de determinar si la cantidad de gluten presente en la muestra influye sobre los efectos de los tratamientos térmicos.
## **MATERIALES Y METODOS**

**Muestras analizadas y tratamientos térmicos empleados**: Se procesaron muestras de harinas o de masas (harina + agua, 40 % de humedad) obtenidas a partir de harina de trigo (*Triticum aestivum* Cv. Oasis). A su vez, en paralelo, se procesaron muestras de almidón de maíz adicionado con 1% de harina de trigo y harina de maíz adicionada con 1% (p/p) de harina de trigo, a fin de simular distintas matrices con bajo contenido de gluten y distinto contenido de proteínas. Los tratamientos térmicos se realizaron en una estufa de secado Mettler LP16 durante 20 minutos a temperaturas de 100, 130 y 160 °C, condiciones similares a las que existen en distintas zonas de una masa durante la panificación. Luego del tratamiento se molieron en mortero hasta reducirlas a polvo fino y se procedió a extraerlas. Se separó una alícuota sobre la que se determinó el contenido de humedad por secado en estufa de vacío.

**Procedimientos de extracción:** Las gliadinas fueron obtenidas por extracción usando los métodos de extracción descriptos en la Parte I. Se trabajó a una relación de 10 ml de solventes por gramo de harina a extraer. Se realizaron extracciones con etanol acuoso 70% (v/v) por agitación en vortex durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se obtuvieron luego de una centrifugación a 10000xg durante 15 min a 8 °C en una centrífuga Sorvall.

Medición de la concentración proteica: Se realizó empleando el método descripto por Lowry, Rosebrough y col. (1951). Para las muestras de extracción etanólica se realizó la calibración con un estándar de gliadina comercial disuelto en etanol acuoso al 70% y valorado por la técnica de Kjeldahl (Bradstreet, 1965).

Estudios electroforéticos de los extractos: A-PAGE: A fin de determinar qué fracciones de gliadinas pierden en mayor grado su solubilidad luego de los tratamientos térmicos, los extractos etanólicos de las distintas muestras fueron analizados por electroforesis a pH 3,1; en geles de poliacrilamida al 7% (p/v), como fuera descripto en la Parte I. Los análisis fueron realizados sobre los extractos etanólicos diluídos 1:2 en buffer muestra (buffer de ácido láctico y lactato de aluminio pH 3,1), en el momento de ser obtenidos y se repitieron los ensayos sobre las mismas muestras liofilizadas y resuspendidas en buffer muestra o en buffer muestra conteniendo 5% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Electroforesis capilar: Los extractos etanólicos de las muestras de masas y harinas sometidas a distintos procesos de calentamiento fueron analizados por electroforesis capilar siguiendo el método optimizado en nuestro laboratorio que se describió en la Parte I.

# Cuantificación de prolaminas por ELISA.

El contenido de gliadina inmunorreactiva en los extractos etanólicos de las distintas muestras fue dosado mediante el ELISA de captura-competición con gliadina biotinilada cuya optimización fue descripta en la Parte II. Para la curva de calibración se empleó la solución estándar de gliadina comercial disuelto en etanol acuoso al 70% (v/v) y valorado por la técnica de Kjeldahl (Bradstreet, 1965). Para este análisis se emplearon los cuatro AcMo y el suero de conejo antigliadina.

## RESULTADOS

El análisis de sistemas de masa tratada a distintas temperatura es de valor para determinar el grado de alteración de la solubilidad y posteriormente de la reactividad inmunoquímica de las gliadinas introducido por el calentamiento. Para ello se recurrió al estudio de masa tratada a distintas temperaturas durante 20 min. Si bien existe una amplia variedad de condiciones tiempotemperatura empleadas por la industria alimentaria -las que dependen básicamente del tipo de producto, tamaño del mismo, etc.-, las condiciones utilizadas son similares a las empleadas para el horneado de pan de molde. Durante el horneado ocurren distintos fenómenos físicos y bioquímicos simultáneamente, tales como expansión de volumen, evaporación de agua, formación de una estructura porosa, desnaturalización proteica, gelatinización del almidón, formación de costra y reacciones de pardeamiento tipo Maillard (Zanoni, Peri y col. 1995). Los procesos físicos dominantes serían la transferencia de calor del horno hacia el interior del producto panificado y migración de vapor de agua desde el interior hacia el horno. Todo el proceso es dinámico, con cambio de condiciones en distintos puntos del producto durante el horneado (Sablani, Marcotte y col. 1998). Sin embargo, se puede suponer que se establece un estado estacionario que abarca múltiples estados intermedios entre dos extremos de condiciones totalmente definidas: por un lado en el seno del pan, la región que será la "miga" predomina el equilibrio líquido-gas del vapor de agua, manteniéndose la temperatura constante a 100°C y la humedad a saturación. Por otro lado en la superficie del pan, la corteza, la temperatura y la humedad tienden a igualarse a las existentes en el horno. A su vez el intercambio de materia y energía con el entorno se ve dificultado por la formación de una costra causada por reacciones de condensación tipo Maillard, muchas veces favorecida por prácticas como el pincelado o agregado de azúcar.

A fin de estudiar lo ocurrido en las distintas regiones de un producto panificado se seleccionaron tres condiciones de temperatura diferentes, las que corresponderían al interior (100°C), la corteza (160°C) y un punto intermedio del mismo (130°C). Las muestras fueron calentadas en una balanza de secado, en alícuotas de 500 mg, estiradas en forma de láminas de espesor mínimo. Dado el pequeño tamaño de la muestra y su escaso espesor supusimos que todos los puntos de la misma estuvieron sometidos a la misma temperatura y que esta fue similar a la temperatura de ensayo. Al finalizar los tratamientos y procesar la muestra nunca se observaron diferencias de textura o color entre los distintos puntos de la misma.



Figura 3.3.1: Concentración de proteínas de los extractos etanólicos de masas y harina sometidos a distintos tratamientos térmicos. La medición se realizó por el método de Lowry, empleando como standard una solución etanólica de gliadina comercial valorada por la técnica de Kjeldahl. Se indica el tipo de tratamiento en cada caso. Se muestra el promedio de al menos seis determinaciones.

En la Figura 3.3.1 se observa el resultado del análisis del contenido de proteínas en las muestras de harina y masa sometidas a distintos tratamientos. Las muestras de harina presentaron siempre la misma cantidad de gliadina extraíble, incluso las sometidas a los tratamientos más enérgicos. Esto comprueba el rol crítico que cumple la presencia de agua y formación de la masa antes del calentamiento (Weegels, De Groot y col., 1994 a y b). El calentamiento no afectó la cantidad de proteína extraída de las muestras de harina calentadas, siendo muy notorio su efecto sobre las muestras de masa. La extracción de la masa sin tratar resulta dificultosa, dadas las características físicas de la misma que impiden un buen contacto con el solvente de extracción. Por esta razón se observa una mayor variabilidad en los resultados y un valor promedio de extracción menor al de las harinas. El caso de las muestras de masa calentadas muestra un comportamiento dual. Se observa que tratamientos de 100°C afectan levemente la cantidad de proteína extraída de la muestra. Sin embargo, para los tratamientos a 130°C o 160°C se obtuvo una baja cantidad de proteínas extraíbles por etanol 70%. Este descenso es estadísticamente significativo (test de Student de diferencia de medias, p= 0.01), recuperándose sólo el 25% de la proteína presente en la harina sin tratar para los calentamientos más enérgicos (160°C 20 min). Estos resultados muestran que la formación de la masa, previa al calentamiento, es un paso crítico en el que se altera la extractabilidad de las prolaminas. Calentamientos de hasta 100°C no alteran la extractabilidad de las mismas. Tratamientos más enérgicos pueden imponer una pérdida en la cantidad de proteína extraída con etanol 70%, tanto mayor cuanto más alta sea la temperatura a la que se someta la muestra.

133



Figura 3.3.2. Análisis por A-PAGE de extractos etanólicos de muestras de masa y harina sometidos a distintos tratamientos térmicos. Calle 1: harina de trigo sin tratar. Calle 2: harina de trigo tratada 160°C 20 min. Calle 3: masa sin calentar. Calle 4: masa tratada 160°C 20 min. Calle 5: extracto de harina tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido en buffer muestra sin mercaptoetanol Calle 6: extracto de masa tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido y resuspendido en buffer muestra sin mercaptoetanol. Calle 7: extracto de harina tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido en buffer muestra sin mercaptoetanol. Calle 7: extracto de harina tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido en buffer muestra sin mercaptoetanol. Calle 8: extracto de masa tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido en buffer muestra con mercaptoetanol. Calle 8: extracto de masa tratada a 160°C 20 min, liofilizado y resuspendido en buffer muestra con mercaptoetanol.

El análisis del perfil de prolaminas por A-PAGE de las muestras sometidas a distintos tratamientos se observa en la Figura 3.3.2. No se observan diferencias entre los perfiles de las distintas muestras de harina calentadas (calles 1-2). Las muestras de masa sin calentar y calentada presentan a su vez un perfil similar al de la harina (calles 3 y 4). Las muestras de masa calentadas a 100°C y 130°C presentan el mismo patrón de bandas (no mostrado). Se realizaron experimentos de liofilizado de los extractos y resuspensión en distintos buffers. Cuando los extractos fueron liofilizados y resuspendidos en buffer muestra, el perfil para las muestras de harina procesadas de esta forma no cambió (calle 5). Sin embargo, el extracto de la muestra de masa tratada a 160° C 20 min, liofilizado y resuspendido mostró cambios importantes (calle 6) (lo mismo ocurrió para la muestra de masa tratada a 130 °C 20 min -no mostrado). Se observa que en ambas muestras, solamente la fracción de ω-gliadina es recuperada (calle 6). Este fenómeno ha sido descripto en la literatura por Schofield, Bottomley y col. (1983) interpretándolo como una insolubilización de las demás fracciones a causa del tratamiento térmico. Sin embargo estos autores, así como trabajos posteriores (Lavelli, Guerreri y col, 1996) nunca analizaron los extractos sin liofilizar, como se realizó en nuestro laboratorio. Aquí se demostró que en el momento de analizar las muestras para la cuantificación de gliadinas, es decir inmediatamente luego de la extracción, están presentes todas las fracciones de gliadina. La insolubilización de las otras fracciones se produce a causa del manipuleo posterior. Cuando se analizó el liofilizado de la muestra de masa calentada a 160 °C, resuspendido en buffer muestra conteniendo 5% (v/v) de mercaptoetanol (calle 8), se ve que se recuperan todas las fracciones de gliadina, confirmando que todas habían sido extraídas inicialmente y que la insolubilización había ocurrido durante el manipuleo posterior (en la calle 7 se muestra el control del extracto de harina tratada térmicamente, liofilizado y resuspendido en un buffer que contiene mercaptoetanol). De esta forma se deduce que el calentamiento provoca cambios conformacionales, que inducen la agregación por medio de la formación de puentes disulfuro cuando las muestras son concentradas durante la liofilización. La fracción  $\omega$  no se agrega por carecer de restos sulfhidrilo (Shewry y Tatham, 1997). Este resultado es relevante pues, como fuera comentado anteriormente, históricamente se ha aceptado que la fracción omega es la más termoestable, a partir de lo descripto por Schofield, Bottomly y col. en su trabajo (1983).



Figura 3.3.3. Análisis por electroforesis capilar de los extractos etanólicos de masas y harinas sometidas a tratamientos térmicos

Los extractos etanólicos fueron a su vez analizados por electroforesis capilar. Los resultados se muestran en la **Figura 3.3.3**. Esta metodología permite confirmar lo descripto para A-PAGE. Se observa que todas las muestras analizadas presentan un patrón de picos similar, de manera que no existe una insolublización diferencial de ninguna fracción en particular a causa del tratamiento térmico. Este sistema analítico permite un análisis semicuantitativo de la composición de cada extracto. Integrando el área correspondiente a los distintos picos se observa que el tratamiento térmico produce una alteración en la relación del área de la región  $\omega$  con respecto al total. En las muestras sin tratar (tanto masa como harina) la región  $\omega$  ocupa un 14% del área total. Los distintos calentamientos alteran esta área, siendo de 20%, 22% y 28% para los tratamientos a 100°, 130° y 160° respectivamente. Una observación similar ha sido realizada por Wieser (1998b) llevando a cabo estudios por RP-HPLC de extractos de miga y costra de pan. El calentamiento provoca una menor capacidad de extracción de gliadinas, sin embargo el grado de alteración no es homogéneo para las distintas fracciones. Se observa que los tratamientos térmicos más enérgicos afectan en mayor grado la solubilidad de las gliadinas ricas en S, siendo siempre mayor la tasa de recuperación de las  $\omega$ -gliadinas.

La cantidad de gliadina inmunorreactiva de los extractos fue cuantificada mediante el ELISA de captura-competición con gliadina biotinilada optimizado como fuera descripto en la Parte II. Para cada experimento se trataron térmicamente las distintas muestras. Se realizaron dos extractos diferentes de cada una, los cuales a su vez fueron analizados por triplicado. La muestra sin tratar fue procesada en forma similar. Los resultados obtenidos con los distintos anticuerpos se muestran en la **Figura 3.3.4**. El mismo diseño experimental fue repetido al menos cinco veces para cada AcMo. En esta Figura se muestran los resultados promedio de los distintos ensayos. Las barras de error representan la variabilidad interensayo. Se observan diferencias en los niveles cuantificados con los distintos AcMo, mostrando que el resultado obtenido luego del tratamiento térmico es dependiente del tipo de AcMo empleado para evaluarlo.

El ensayo empleando 1B4 arroja un resultado de aproximadamente 3400 mg de gliadina/100 g de alimento para la harina sin tratar, cayendo estos valores en un 25% para las masas sin tratar. Esto puede deberse a diferencias entre la extracción de la harina y la masa, dado que la muestra de masa presenta una matriz viscoelástica que puede dificultar la extracción de ciertos componentes. No se observan diferencias entre la masa sin tratar y tratada a 100°C 20 min. Para tratamientos más enérgicos (130° y 160°C 20 min) se observa una caída hasta valores de un 20% respecto a la reactividad original.

El análisis realizado con 1C4 nos arroja valores de 1000 mg/100g para las muestras de harina sin tratar y un comportamiento similar al descripto para 1B4 para las muestras de masa sometidas a los distintos tratamientos térmicos. El valor cuantificado en harina sin tratar, en

defecto respecto a lo medido por 1B4 puede deberse a que 1C4 reconoce con gran intensidad a las  $\gamma$ -gliadinas, mientras que su afinidad por las  $\alpha/\beta$  y  $\omega$  gliadinas es menor, mientras que 1B4 se une con igual intensidad a todas las fracciones de gliadina.



Figura 3.3.4: Dosaje de gliadina mediante ELISA de captura-competición con gliadina biotinilada de los extractos etanólicos de muestras de masas y harinas sometidos a distintos tratamientos térmicos. Se muestran los promedios de al menos seis ensayos.

Los análisis realizados con 2A1 muestran el mismo comportamiento general. Valores altos para las muestras sin tratar y una disminución al 30% (aproximadamente) de la reactividad de la muestra sin tratar para los distintos tratamientos térmicos. En este caso se nota una diferencia entre la muestra de masa sin tratar y la tratada a 100°C 20 min, siendo la reactividad de

esta última menor. Se observa sin embargo que todos los valores son mayores a los dosados con los otros anticuerpos. Fueron detectados niveles de gliadina de casi 35000mg/100 g de alimento. Esto puede deberse a que este anticuerpo reconozca en forma diferente los componentes del estándar con el que se realiza la curva de calibración respecto a los hallados en la harina. Para los distintos ensayos de cuantificación se trabajó con una suspensión de gliadina comercial en etanol por ser ésta de sencilla preparación, se emplea el mismo solvente que el empleado en la extracción de los alimentos, presentando una alta estabilidad en el tiempo y siendo fácilmente transferible su preparación a los distintos laboratorios de control, facilitando la tarea de control interlaboratorio. Sin embargo, no es posible conocer la forma de procesamiento industrial de la gliadina por parte del productor, siendo sometida presumiblemente a un paso final de secado spray que dificulta su posterior análisis por métodos electroforéticos no desnaturalizantes, por lo que no se puede caracterizar su composición respecto a las distintas subclases de gliadina. En el caso de anticuerpos de reactividad diferencial entre las distintas fracciones de gliadina, como el caso de 2 A1, si la relación entre fracciones del estándar al cual se refiere la cuantificación no es similar a la de la harina empleada en el estudio, puede conducir a mediciones erróneas. Esto podría explicar la discrepancia en los valores de cuantificación. Dado que el AcMo 2A1 presenta una excelente performance en ensayos de cuantificación, en el futuro se realizarán pruebas de cuantificación empleando otros estándares producidos a partir de harina en nuestro laboratorio.

Los resultados de los análisis con 3B4 muestran un comportamiento similar. La muestra de harina sin tratar presenta valores de 3500 mg/100g, siendo comparables a los valores para muestras de masa sin tratar y tratada a 100°C 20 min. Los valores hallados para muestras sometidas a tratamientos más enérgicos arrojan una disminución importante, siendo máxima para tratamientos a 160°C 20 min, llegando a valores de menos del 50% de la reactividad de la muestra sin tratar.

Los resultados obtenidos con el suero de conejo purificados se enmarcan en el comportamiento general. El valor de la muestra sin tratar es cercano a los 3000 mg/100 g de alimento. Los valores de las muestras tratadas van cayendo según cuan enérgico sea el tratamiento hasta valores cercanos al 30% de la reactividad original para los tratamientos de 160°C 20 min.

Estos resultados nos muestran que, más allá de pequeñas discrepancias numéricas, hay un comportamiento general similar: se observa una disminución de los valores cuantificados al aumentar la temperatura de tratamiento. Esta disminución puede ser hasta valores menores al 30% de los valores de la muestra sin tratar, para tratamientos enérgicos. Esto puede deberse a una disminución solamente en la cantidad de gliadina extraída a causa del tratamiento térmico, como fuera descripto anteriormente o, además, a una disminución en la reactividad de la proteína

tratada térmicamente. Se observa que en general la disminución de la cantidad cuantificada es ligeramente mayor que la disminución en la proteína extraída. Esto indicaría que la cuantificación, además de verse alterada por una menor cantidad de proteína extraída, se ve afectada por una disminución de la reactividad de la proteína extraída, originada en las alteraciones estructurales que causa el calentamiento. Sin embargo, dada la incertidumbre en las mediciones experimentales esto es solamente una presunción, no hallándose diferencias estadísticamente significativas. Debe recordarse que con los tratamientos térmicos empleados en estos experimentos se intentó recrear las condiciones de una panificación. Por lo tanto se emplearon condiciones más enérgicas que las empleadas en estudios en fase soluble, en donde la máxima temperatura que se podía aplicar eran 100°C. Dadas las características de los tratamientos empleados en las experiencias de panificación, no es esperable que aparezcan fenómenos de aumento de la reactividad por el tratamiento térmico, como los observados cuando se analizaron condiciones de calentamiento más suaves.

Ensayos de cuantificación realizados sobre muestras de harina calentadas a distintas temperaturas no mostraron cambios significativos en la cantidad de gliadina inmunorreactiva para ningún tratamiento, demostrando el papel fundamental que tiene la adición de agua y formación de masa para el establecimiento de las interacciones intermoleculares que dificultan la extracción de las gliadinas de la matriz del alimento.

Los resultados hasta aquí descriptos corresponden a sistemas con un alto contenido de gliadinas, basados en harina de trigo. Sin embargo los métodos desarrollados para control de alimentos para celíacos deben aplicarse en muestras con un muy bajo -o nulo- nivel de gliadinas. En estos alimentos las proteínas principales provienen de algún vegetal no relacionado con la enfermedad como soja, maíz o arroz. Las gliadinas que puedan encontrarse habitualmente provendrán de contaminaciones involuntarias durante el procesamiento del alimento, encontrándose presentes en alguna materia prima en forma inadvertida o, rara vez, por adulteración. En todos estos casos entonces al calentar el alimento, las gliadinas se encontrarán en baja cantidad en una matriz básicamente distinta a las de las masas de harina de trigo.

A fin de estudiar los efectos del tratamiento térmico en un sistema similar se formularon dos sistemas modelo: \*harina de maíz + 1% de harina de trigo, a fin de proveer una matriz no reactiva pero de alto contenido proteico \* almidón de maíz + 1% de harina de trigo, que provee una matriz no reactiva de bajo contenido proteico. Las matrices de almidón de maíz o harina de maíz fueron analizadas por ELISA en los 5 sistemas descriptos, a fin de determinar su reactividad. Los resultados fueron negativos para ambas muestras en todos los sistemas empleados. De esta forma se asegura que las matrices empleadas no contienen prolaminas



tóxicas. Los resultados de los ensayos de sobreagregado de harina dependerán sólo de las prolaminas agregadas en la harina.

Figura 3.3.5: Dosaje de concentración proteica de los extractos etanólicos de los sistemas de harina de maíz o almidón de maíz adicionados con 1% de harina de trigo y sometidos a distintos tratamientos térmicos. La medición se realizó por el método de Lowry, empleando como estándar una solución etanólica de gliadina comercial valorada por la técnica de Kjeldahl. Se indica el tipo de tratamiento en cada caso. Se muestra el promedio de al menos seis determinaciones.

Masas generadas con estas mezclas fueron sometidas a los mismos calentamientos que la masa de trigo, extraídas con etanol 70%, siendo estos extractos posteriormente analizados. En la **Figura 3.3.5** se muestra el resultado de la medición de concentración proteica. Se observa que la concentración proteica de las muestras de almidón es siempre muy baja (del orden de los 0.1 mg/ml de extracto) y puede corresponder a proteínas residuales presentes en el almidón (se supone que puede contener hasta un 1% de proteínas dada su calidad). El contenido proteico de los extractos se ve poco afectado por el tratamiento térmico. En el caso de la muestra de harina de maíz se encuentran valores de alrededor de 1 mg/ml de proteínas extraíbles. Esto corresponde principalmente a las prolaminas de maíz denominadas zeinas, que son solubles en los solventes empleados para la extracción (Shewry y Tatham 1990). Se observa que el sobreagregado de harina y el calentamiento tienen poca relevancia en la cantidad de proteína extraída.

Las determinaciones por ELISA se llevaron a cabo en forma idéntica a la descripta anteriormente para los sistemas de masas de harina de trigo. También se realizó el mismo número de replicados. La Figura 3.3.6 muestra el resultado de estos análisis. Se observa una disminución en la gliadina cuantificada con los tratamientos térmicos más enérgicos. Los resultados del análisis empleando 1B4 muestran una disminución del orden del 40% para los tratamientos más enérgicos, siendo el valor dosado en las muestras sin tratar de alrededor de 30 mg/100 g de alimento, conservando la relación del 1% del valor cuantificado por este ensayo para las muestras de harina sin tratar. No se observan diferencias importantes en los valores determinados en la matriz de harina de maíz o de almidón.



Figura 3.3.6: Dosaje de gliadina mediante ELISA de captura-competición con gliadina biotinilada de los extractos etanólicos de muestras de los sistemas de harina de maíz o almidón de maíz adicionados con 1% de harina de trigo y sometidos a distintos tratamientos térmicos. Se muestran los promedios de al menos seis ensayos.

Los resultados obtenidos con en AcMo 1C4 muestran un comportamiento similar. Los tratamientos más enérgicos provocan una disminución en la cantidad cuantificada de aproximadamente 60%. El valor cuantificado en las muestras sin tratar es de aprox 9 mg/ 100 g de alimento, siendo el 1% del valor medido en las muestras de harina sin tratar, manteniendo en este caso también la relación con la cantidad de harina de trigo agregada.

Los valores dosados con 2A1 muestran el mismo comportamiento, con el tratamiento térmico. Sin embargo los valores cuantificados son llamativamente altos. La muestra sin tratar arrojó valores cercanos a los 1500 mg/100g de alimento. Este valor guarda la proporción cercana a 1% respecto a la cuantificación de la harina sin tratar. Se debe recordar que este anticuerpo arrojaba valores anormalmente elevados en la cuantificación, pudiendo relacionarse esto con la composición particular del estándar empleado en la cuantificación.

Los resultados obtenidos con 3B4 muestran el mismo comportamiento general. Los tratamientos a mayor temperatura provocan una disminución en los valores cuantificados, de alrededor del 60% con respecto al valor original. Los valores de las muestras sin tratar son de alrededor de 35 mg/100 g de alimento, siendo el 1% de los valores cuantificados por este anticuerpo para las muestras de harina sin tratar.

El empleo del suero antigliadina a su vez sigue la misma tendencia hasta ahora descripta. Se observa un descenso de los niveles cuantificados con el tratamiento térmico. Los valores de las muestras sin tratar son de alrededor de 30 mg/100 g de alimento, siendo el 1% de los niveles dosados por el mismo ensayo sobre la harina sin tratar. No se encuentran diferencias importantes en el comportamiento de las muestras provenientes de la harina de maíz o el almidón.

Comparando globalmente estos resultados con los observados para muestras de harina de trigo no se observan diferencias significativas. La disminución de la reactividad en muchos casos no es tan marcada como cuando se analizaron las masas de harina de trigo, pero siempre fueron significativas. El efecto de la matriz parecería no ser crucial respecto a la pérdida de reactividad. Posiblemente esto se deba a que las gliadinas, acumuladas en cuerpos proteicos durante la maduración del grano, siempre tengan en su microentorno proteínas similares, sin importar demasiado la matriz del alimento, de manera que sus propiedades de extracción dependerán básicamente de la interacción que se establezca con las otras gliadinas de su entorno.

### CONCLUSIONES

El efecto del calentamiento sobre la capacidad de extracción del etanol acuoso constituye un factor que afecta en forma crucial la cuantificación inmunoquímica de prolaminas. Se observa que existe una disminución de la cantidad extraída de todas las fracciones de gliadina. Las œgliadina son las menos afectadas por el calentamiento, sin embargo las otras fracciones se pueden extraer en forma parcial aún después de tratamientos a 160°C durante 20 min. Estudios realizados sobre masas calentadas a distintas temperaturas muestran una gran caída en la cantidad detectada para calentamientos de 130°C durante 20 min o temperaturas superiores. Tratamientos de calentamiento a 100°C 20 min no tuvieron influencia significativa en los valores cuantificados. La extrapolación de estos resultados a sistemas de alimentos indicaría que los valores de cuantificación obtenidos de muestras sometidas a calentamientos a menos de 100°C (ej., secado de fideos, miga de pan, etc.) podrían ser cuantificadas en forma confiable por los distintos ensayos empleados. Por otra parte muestras sometidas a calentamientos enérgicos (corteza del pan, trigo inflado, etc.) producirían resultados con errores por defecto al ser analizadas con estos sistemas.

Mediante el estudio de sistemas de matrices inertes como almidón de maíz o harina de maíz se comprobó que los efectos del calentamiento en la inmunodetección no son dependientes de la cantidad total de gliadina presentes en el alimento ni tampoco del contenido de proteínas no relacionadas presentes en la matriz.

Una posible forma de mejorar la performance de los sistemas de cuantificación inmunoquímica de prolaminas tóxicas en alimentos sometidos a calentamientos enérgicos sería desarrollar protocolos de extracción con solventes capaces de producir la solubilización de los agregados intermoleculares generados por formación de puentes disulfuro. Estos estudios serán encarados por nuestro grupo en el futuro. ANEXO I

# ANEXO I: RESULTADOS OBTENIDOS APLICANDO LA METODOLOGÍA DESARROLLADA EN OTROS ASPECTOS DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.

Los métodos desarrollados para la realización de este trabajo de Tesis Doctoral también fueron aplicados en otros campos relacionados con la problemática de la enfermedad celíaca, como se describe a continuación.

Los alimentos constituyen la mayor fuente de ingreso de sustancias extrañas al organismo. En condiciones fisiológicas, se produce una respuesta inmune humoral frente a proteínas alimentarias que puede evidenciarse por la aparición de anticuerpos específicos, tanto en suero como en distintas secreciones (Hanson Ahlstedt y col.,1977; Barnes, Johnson y col., 1988). Una pequeña fracción de las proteínas ingeridas atraviesa la barrera epitelial intestinal sin ser degradada. Estos antígenos son reconocidos por linfocitos B presentes en la mucosa intestinal, siendo estimulados para la diferenciación y producción de anticuerpos (Lovegrove, Morgan y col., 1996; Czerkinski, Prince y col., 1987). Muchas de los linfocitos derivados migran a otras mucosas, produciendo los anticuerpos presentes en secreciones tales como la saliva o la leche (Brandtzaeg, 1999). La caracterización de estos procesos puede resultar de interés para la problemática de la enfermedad celíaca, ya que una respuesta inmune humoral aumentada frente a gliadina es utilizada como marcador serológico de la enfermedad (Juto y Holm, 1992; Brandtzaeg, 1996).

A fin de estudiar estos fenómenos, se estudió la presencia de anticuerpos IgG e IgA específicos para tres antígenos alimentarios comúnmente presentes en la dieta, como ovalbúmina, gliadinas y  $\beta$ -lactoglobulina, mediante ELISA indirecto. La población estudiada fue un grupo de 46 madres, que no tuvieron complicaciones en el parto, sin antecedentes de alergia alimentaria ni otras alteraciones en su salud. Se analizaron muestras de suero, leche, calostro y saliva para comprobar las posibles influencias de las distintas mucosas donde se producen estos anticuerpos. A su vez, se estudió el perfil de reactividad frente a proteínas de trigo de las distintas muestras.

Se encontraron distintos niveles de reactividad frente a los distintos antígenos estudiados. Los niveles de IgG fueron mayores en suero, siendo muy bajos en las otras muestras. No se encontró ninguna correlación entre los niveles dosados en las distintas muestras. Los niveles de IgA fueron mayores en calostro, siendo altos en leche y saliva y menores en suero. Se observó que las muestras que presentaban los mayores niveles de reactividad tipo IgA frente a ovalbúmina, también presentaban altos niveles de reactividad frente gliadinas y frente a  $\beta$ -lactoglobulina, en las muestras de leche, calostro y saliva (correlación positiva, p>0.01). Los antígenos estudiados no presentan analogía estructural ni homología en sus secuencias, descartando posible reactividad cruzada. A su vez provienen de fuentes alimenticias independientes. La correlación encontrada muestra la influencia de

fenómenos locales del sistema inmune de mucosas que modulan la producción de IgA frente a distintos antígenos.

El análisis por inmunoblotting frente a proteínas de trigo produjo patrones de reconocimiento diferentes en los distintos pacientes estudiados. Tampoco se encontraron similitudes en los patrones de reconocimiento de los distintas muestras provenientes de una misma paciente. Esto significa que los perfiles de especificidades de anticuerpos producidos por distintos individuos son diferentes. A su vez las poblaciones productoras de anticuerpos de las distintas mucosas son funcionalmente diferentes. Estos resultados demuestran que los fenómenos locales tienen una importancia tanto en los niveles de producción de anticuerpos del tipo IgA como en las especificidades de anticuerpos que son producidos. La mejor comprensión de estos fenómenos podría explicar algunos fenómenos de suceptibilidad individual frente a infecciones y tener aplicación en el desarrollo de vacunas orales, tendientes a lograr una buena respuesta a nivel de mucosas.

La presencia de antígenos dietarios en la leche materna fue largamente sospechada debido a evidencias indirectas como la aparición de síntomas de intolerancia alimenticia en lactantes relacionadas con la dieta materna (Host, Husby y col., 1988). Diversos estudios empleando sistemas inmunoquímicos de detección probaron la presencia de proteínas alimentarias en la leche materma (Fukushima, Kawata y col., 1997). Sin embargo, la cinética de pasaje de estos antígenos a la leche, asi como el grado de alteración en su estructura no ha sido esclarecido (Lovegrove, Osman y col., 1993).

Con el objeto de estudiar la presencia de gliadina en leche materna y su peso molecular se adaptaron los sistema de ELISA de cuantificación y un inmunoblotting de alta capacidad de detección descriptos anteriormente para utilizarlos en muestras de leche materna. La cuantificación fue realizada mediante un ensayo de ELISA competitivo sensibilizando la placa con una suspensión de gliadina comercial. A fin de evitar las interferencias de la IgA antigliadina presente en la leche materna se empelaron anticuerpos antigliadina purificados de un suero antigliadina y marcados con biotina. Se estudiaron muestras de calostro (n=23) y leche materna (n=42) de madres con embarazo normal, a término y sin restricciones en su dieta. Se encontraron niveles de gliadina variables, entre 2 y 8000 ng/ml, siendo mayores los niveles en calostro (media=450 ng/ml) que en leche (media=80 ng/ml). También se estudiaron los niveles de gliadina en suero de las distintas madres, resultando negativos en el 50% de los casos. La media de los valores detectados fue de 16 ng/ml.

A fin de esclarecer la cinética de pasaje de antígenos alimentarios a la leche se realizó un protocolo de dieta controlada en seis voluntarias. Se tomaron muestras previo a cada amamantamiento durante nueve días. Los tres primeros días, asi como los tres últimos las voluntarias cumplieron una dieta normal, con ingesta de alimentos que contenían harina de trigo. Los días 4, 5 y 6 del protocolo realizaron una dieta estricta libre de gluten. El análisis de las distintas muestras arrojó resultados variables, depentientes de cada sujeto. Se observaron valores variables de gliadina en las distintas tomas de muestra. En 4 casos se observó una disminución de los niveles de gliadina encontrados en leche durante los días de dieta libre de gluten. Sin embargo en ningún caso los niveles de gliadina dejaron de ser detectables. Como control se estudió leche de una paciente celíaca bajo dieta libre de gluten en forma permanente, que presentó valores de gliadina no detectables. Posiblemente el período de dieta no haya sido lo suficientemente prolongado como para observar la desaparición de la gliadina dietaria en la leche.

Para el estudio del peso molecular de la gliadina en las muestras de leche se optimizó un sistema de revelado quimioluminiscente. Se realizó el inmunoblotting de las muestras separadas por SDS-PAGE. Se analizaron 4 muestras de leche y 2 de calostro. Todas arrojaron perfiles parecidos, con una banda ancha principal de aproximadamente 40 kDa, siendo el peso de la gliadina nativa. No se observaron bandas ni chorreado en la región de bajo peso molecular. Esto significa que el antígeno alimentario se encuentra principalmente no degradado en la leche materna. Los mecanismos de transporte de los antígenos alimentarios a la leche, asi como su rol fisiológico no han sido esclarecidos.

El diagnóstico de la enfermedad celíaca se realiza mediante biopsia de intestino delgado, a fin de observar las alteraciones histológicas características y se confirma mediante una nueva biopsia de intestino delgado luego de un período de 6 meses a un año de dieta libre de gluten, en donde se observa la recuperación de la arquitectura normal del tejido (Walker-Smith, Guandalini, 1990). Como este procedimiento es altemente invasivo, se han desarrollado distintos estudios serológicos a fin de seleccionar los casos a ser estudiados por biopsia. El dosaje de los niveles de anticuerpos antigliadina es ampliamente empelado como uno de los marcadores serológicos de la enfermedad celíaca. Si bien la performance del ensayo es buena (datos de sensibilidad y demas), distintos autores han señalado diferencias en la eficiencia del ensayo dependiendo de la preparación antigénica empleada (Bode, Weile y col., 1993).

A fin de seleccionar una fracción antigénica para emplearla en ensayos serológicos de detección de la enfermedad celíaca se estudió la reactividad del suero de un lote de pacientes celíacos (n=36) mediante inmunoblotting y ELISA frente a fracciones purificadas de gliadina. Se realizaron estudios de inmunoblotting frente a proteínas separadas por SDS-PAGE y por A-PAGE, empleando los métodos de transferencia descriptos en la Parte I. Se observó que muchos sueros presentaron reactividad IgA diferencial frente a  $\omega$ -gliadinas, la reactividad IgG fue siempre más heterogénea, siendo reconocidas todas las fracciones. Para los ensayos de ELISA se emplearon fracciones de  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\omega$  gliadina, purificadas como se describió en la Parte I. Se observó que la mayoría

de los sueros presentaron una reactividad IgA mayor frente a  $\omega$ -gliadinas, en forma coincidente a lo observado en los ensayos de blotting.

A fin de evaluar la capacidad diagnóstica de un ensayo serológico empleando  $\omega$ gliadina purificada se analizó en paralelo un lote de 110 pacientes celíacos mediante ensayos empleando antígenos diferentes: las distintas fracciones purificadas, además de una suspensión de gliadina comercial y un extracto etanólico de harina. Para cada antígeno se analizó un lote de sueros de niños sanos y se estableció el cut-off de método. El análisis de los pacientes celíacos, así como de controles de distintas enfermedades gastrointestinales mostró que el ensayo de mayor eficiencia diagnóstica fue el de  $\omega$ gliadina purificada. El empleo de  $\omega$ -gliadina como antígeno conduce a ensayos serológicos de mayor sensibilidad y especificidad. **CONCLUSIONES GENERALES** 

#### **CONCLUSIONES GENERALES**

A lo largo del trabajo de Tesis Doctoral se realizó una labor de desarrollo de técnicas experimentales que fueron empleadas a fin de cumplir los objetivos planteados:

• Se desarrolló una nueva metodología de purificación de prolaminas empleando electroforesis preparativa. Esta metodología permitió obtener fracciones purificadas de gliadinas, secalinas y hordeínas.

• Se desarrollaron técnicas de análisis de prolaminas mediante electroforesis capilar que permiten separaciones de alta reproducibilidad y con gran resolución. Estas técnicas fueron empleadas para confirmar la pureza de las fracciones obtenidas por electroforesis preparativa.

• Se optimizaron sistemas de inmunoblotting de gliadinas separadas por A-PAGE, permitiendo superar las dificultades técnicas en la transferencia. Esta técnica fue empleada exitosamente en la caracterización de anticuerpos antigliadina y en la caracterización de la reactividad de los sueros de pacientes celíacos, abriendo las perspectivas a mejoras en los sistemas de diagnóstico de la enfermedad celíaca.

• Se caracterizó la reactividad del panel de anticuerpos antigliadina empleando técnicas complementarias de westernblot y ELISA. Para esta etapa fue crucial la disponibilidad de fracciones de prolamina purificadas.

La caracterización de la reactividad de los anticuerpos a emplear en sistemas de detección inmunoquímica de prolaminas tóxicas para enfermos celíacos resulta un paso ineludible para la formulación de dichos ensayos. Se debe asegurar que los anticuerpos empleados no reaccionen con proteínas de especies no relacionadas con la enfermedad celíaca. Si bien muchas cuestiones referentes a la toxicidad de las distintas fracciones de prolamina aun no han sido esclarecidas, una caracterización completa frente a las distintas fracciones es útil para el diseño racional de ensayos capaces de reconocer de la misma forma a los distintos cereales tóxicos, para lo cual muchas veces es útil el empleo de más de un anticuerpo en el mismo ensayo.

Por otra parte, se estudiaron los efectos del calentamiento de los alimentos en la cuantificación inmunoquímica de proteínas, empleando distintas aproximaciones al problema:

• Se realizaron trabajos de tratamiento térmico de proteínas en sistemas modelo. Se evidenció la gran influencia que puede tener el calentamiento en los resultados de una cuantificación inmunoquímica. Empleando ovalbúmina se observó que el calentamiento no sólo podía producir pérdidas en el reconocimiento por desnaturalización sino que también pueden ocurrir aumentos de la reactividad debido a ciertos tratamientos térmicos. Se observaron aumentos de la reactividad para tratamientos intermedios que causaron sólo desnaturalización parcial de la proteína, mientras que tratamientos totalmente desnaturalizantes provocan una caída abrupta en el reconocimiento. El comportamiento de cada sistema dependería de las particularidades del reconocimiento antígeno anticuerpo que se establezca en cada caso.

• Los estudios de cambios en la reactividad de fracciones de gliadina causados por calentamiento en fase soluble mostraron que todas las fracciones tienen un comportamiento similar. No se destaca ninguna fracción como marcadamente termoestable o marcadamente termolábil. A su vez cada anticuerpo muestra patrones de comportamiento diferente frente a los distintos tratamientos, indicando una estabilidad térmica distinta de los diferentes epitopes reconocidos. Estos estudios indican que los problemas asociados con las pérdidas de la inmunoreactividad informadas por otros autores se deben fundamentalmente a problemas en la extracción de las gliadinas de la matriz del alimento luego del calentamiento y no a cambios en la estructura proteica inducidos por el calentamiento.

• Los estudios realizados empleando distintos tratamientos térmicos sobre muestras diferentes mostraron que la principal fuente de pérdida en la detección inmunoquímica se debe a que luego de calentamientos enérgicos es extraída una menor proporción de gliadinas del alimento. Las distintas fracciones de gliadina son afectadas en forma bastante similar. Las  $\omega$ -gliadinas presentan una recuperación un poco mejor que las otras fracciones, sin embargo distan de ser termoestables como es comúnmente aceptado.

● El empleo de etanol 70% es adecuado para muestras sometidas a tratamientos térmicos menores de 100°C 20min, dado que estos tratamientos no introdujeron grandes cambios en la detección. Esto indicaría que solamente los alimentos que sean sometidos a procesos de horneado podrían presentar errores en la determinación.

• El problema del tratamiento térmico es una cuestión insoslayable para cualquier método que dependa de una extracción de las prolaminas de la matriz del alimento. Sin embargo debido a que la reactividad de cada anticuerpo puede estar dirigida contra componentes de distinta labilidad térmica, estudios similares a los aquí descriptos deben ser llevados a cabo como parte de la optimización de los sistemas de detección para los distintos anticuerpos a ser empleados.

### **Perspectivas futuras**

Aún persisten interrogantes respecto a los distintos sistemas de cuantificación de prolaminas en alimentos destinados a enfermos celíacos. Existen distintas cuestiones referidas a los sistemas de cuantificación de prolaminas en alimentos y el efecto del procesamiento térmico de los mismos que deberán ser abordados en el futuro. Algunas líneas de acción que nos permitirán profundizar nuestro conocimiento en estos temas y mejorar los sistemas de control de alimentos para celíacos son:

• Estudios en alimentos de formulación conocida y procesados térmicamente en forma controlada para confirmar esta hipótesis.

• Empleo de solventes diferentes para los proceso de extracción a fin de mejorar la cantidad de gliadina recuperada de muestras tratadas térmicamente.

• Homologación de estándares y de comparación de metodología de cuantificación entre los distintos laboratorios de control.

• Desarrollo de sistemas de cuantificación que reconozcan en forma similar las prolaminas de los distintos cereales tóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

# **BIBLIOGRAFIA**

Abdel-Aal E.S., Salama D.A., Hucl P., Sosulski F.W. and Cao W. 1996. Electrophoretic characterization of spring spelt wheat gliadins. J. Agric. Food Chem., 44, 2117-2123

Arntfield S. 1991. Role of disulfide bonds in determining rheological and microstructural properties of heat-induced protein networks from ovalbumin and vicilin. J. Agric. Food Chem. 39:1378-1385

Aubrecht E., Horacsek M., Gelencser E., Dworschak E. 1998. Investigation of prolamin content of cereals and different plant seeds. Acta Alimentaria 27:2: 119-125

Barnes R.M.R, Jonhson P.M., Blears J., Harvey M.M. and Finn R. 1988. Human serum antibodies reactive with dietary proteins. Antigenic specificity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*; 87: 189-193.

Bartels D., Altosar I., Herberd N.P., Barker R.F. and Thompson R.D. 1986. Molecular analysis of  $\gamma$ -gliadin gene families at the complex Gli-1 locus of bread wheat (T. aestivum, L.) *Theor. and Appl. Gen.* 72, 845-853

Batey I.L. 1984. Wheat varietal identification by rapid ion-exchange chromatography of gliadins. J. Cereal Sci. 2: 241-248.

Beccari J. 1745. De Bononiensi Scientarium et Artium, Instituto Atque Academia Comentarii 2 (Parte I), 122.

Belitz H., Kieffer R., Seilmeier W., Wieser H. 1986. Structure and function of gluten proteins. *Cereal Chem.* 63,4,336-341

Bernardin, J.E., Kasarda, D.D., Mecham, D.K. 1968. Preparation and characterisation of A-gliadin. J. Biol. Chem. 242:445-450

Bietz J.A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 255: 219

Bietz J.A. 1985. High performance liquid chromatography: how proteins look in cereals. Cereal Chem. 62: 201-212.

Bietz J.A. 1986. High-performance liquid chromatography of cereal proteins. Adv. Cereal Sci. Tech. vol. VIII, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, USA 105-170.

Bietz J.A., Wall J.S. 1972. Wheat gluten subunits: molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 49:416-430

**Bietz J.A., Simpson D.G. 1992.** Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. *J. Chromatography.* 624: 53-80.

Bietz J.A., Schmalzried E. 1995. Capillary electrophoreisi of wheat gliadin: initial studies and application to varietal identification. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 28, 174-184.

Blanc T., Schaufelberger D.E., Guzmán N.A. 1997. Capillary electrophoresis. In *Analytical Instrumentation Handbook*. Cap 25, 1351-1431. Ewing G.W. Ed. Marcel Dekker, INC. Ney York, USA

Bode S., Weile B., Krasilnikoff P. A., Gudmand-Hoyer E. 1993. The diagnostic value of the gliadin antibody test in celiac disease in children: a prospective study. *J.Ped Gastr. Nut.* 17: 260-264.

Bradstreet R. B. 1965. The Kjeldahl method for organic nitrogen. In Laboratory Manual, Academic press New York, USA.

Brandtzaeg P. 1996. Development of the intestinal immune system and its relation to coeliac disease. Scand J. Nutr. 40:50-57

Brandtzaeg P., Farstad I.N., Haraldsen G. 1999. Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunology Today*. 20,6:267-277.

Branski D., Ashkenazi A., Freier S., Lerner A., Dinari G., Faber., Jonas A., Lebenthal E. 1992. Extraintestinal manifestations and associated disorders of coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.) 19: 164-175.

Breton C., Phan Thanh Y., Paraf A. 1988a. Immunochemical properties of native and heat denatured ovalbumin. J. Food Sci. 53, 222-225.

Breton C., Phan Thanh Y., Paraf, A. 1988b. Immunochemical identification and quantification of ovalbumin additive in canned mushrooms. J. Food Sci. 53, 226-230

Brett G.M., Mills E.N., Parmar S., Tatham A.S., Shewry P.R., Morgan M.R. 1990. Monoclonal antibodies that recognize the repeat motif of the S-poor prolamins. J. Cereal Sci. 12: 245-255.

Bronstein E., Haeffner L.J., Kowlessar O.D. 1966. Enzymatic digestion of gliadin: the effect of the resultant peptides in adult coeliac disease. *Clin chim Acta*; 14:141-155

Cardamone M. 1992. Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochem. J.* 282:589-593.

Cataldo F., Ventura A., Lazzari R., Balli F., Nassimbeni G., Marino V. 1995. Antiendomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions. An Italian multicentre study. *Acta Pædiatrica* 84: 1125-1131.

Catassi C., Rossini M., Rätsch I.M. 1993. Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. Gut 34:1515-1519

Catassi C., Ratsch I., Fabiani E., Rossini M., Bordicchia F., Candela F., Coppa G.V., Giorgi P.L. 1994. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 343: 200-203.

Catassi C., Ratsch I., Fabiani E., Giorgi P.L., Pierdomenico R., Alessandrini S., Iwanejko G., Domenici R., Mei E., Miano A., Marani M., Bottaro G., Spina M., Dotti M., Montanelli A., Barbato M., Viola F., Lazzari R., Vallini M., Guariso G., Plebani M., Cataldo F., Traverso G., Ughi C., Chiaravalotti G., Baldesarre M., Scarcella P., Bascietto F., Cegile L., Valenti A., Paolucci P., Caradonna M., Bravi E., Ventura A., Coppa G.V., Giorgi P.L. 1996. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. Acta Pædiatrica Suppl. 412 29-35.

Cerf-Bensussan N., Cuenod-Jabri B., Guy-Grand D. 1996. Subsets of intraepithelial lymphocytes in normal intestine and in coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 291-309

Charbonnier L., Mossé J. 1980. Large scale isolation of gliadin fractions. J. Sci. Food Agric. 31: 54-61.

Charbonnier L., Tercé-Laforgue T., Mossé J. 1981. Rye prolamins: extractability, separation and characterization. J. Agric. Food Chem. 29, 968-973.

Cheftel J. C., Cuq J. L., Lorent D. 1989. Las proteínas del albumen. Cap 2.2.170-176 Proteínas Alimentarias Ed. Acribia Zaragoza.

Chirdo F. G., Fossati C. A., Añón M. C. 1994. Fractionation of wheat, barley and rye prolamins by cation exchange FPLC. J. Agric. Food Chem. 42, 2460-2465.

Chirdo F. G., Fossati C. A., Añón M. C. 1995. Optimisation of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric. Immunol.* 7, 333-343.

Chirdo F.G.; Rumbo M. Biamonte S. Miravalle L.; Fossati C.A.; Añón M.C. 1997. Evaluación de un ELISA competitivo como metodo de certificación de alimentos sin TACC. X Seminario Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Libro de Resúmenes. Buenos Aires r 15-4

Chirdo F.G, Rumbo M., Añón M.C., Fossati C.A. 1998. Presence of high levels of non degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scand. J. Gastr.* 33: 1186-1192.

Ciclitira P.J., Evans D.J., Fagg N.LK., Lennox E.S., Dowling R.H. 1984. Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. *Clinical Science* 66, 357.

Coleman C.E., Dannenhoffer J.M., Larkins B.A. 1997. The prolamin proteins of maize, sorghum and *Coix*. In Cellular and molecular biology of plant seed development. Advances in cellular and molecular biology of plants vol 4. Larkins B.A. Vasil I.K. Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordech, Holanda. Pp 257-288.

Collin P., Renuala T., Pukkala E., Laippala P., Keryriläinen O., Pasternack A. 1994. Coeliac disease - associated disorders and survival. *Gut.* 1215-1218

Collin P., Vilska S., Heinonen P.K., Hällström O., Pikkarainen. 1996. Infertility and coeliac disease. Gut. 39: 382-384

Colot V., Bartels D., Thompson R., Flavell R. 1989. Molecular characterization of an active wheat LMW-glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamins genes. *Mol. Gen. Genet.* 216: 81-90.

Corazza G., Valentini R.A., Frisoni M., Volta U., Corrao G., Bianchi F.B., Gasbarrini G. 1992. Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of coeliac disease. *Gastroenterol.* 103: 1517-1522.

Corazza G., Biagi F., Volta U., Di Stefano M., Ciccocioppo R., Gasbarrini G. 1996. Non-malignant complications of coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 91-99

Cordone G., Gemme G., Comelli A., Vianello MG., Caldoni S. 1975. Peptidase and coeliac disease. *Lancet* 7933:807-808

Curioni A., Dal Belin Peruffo A., Nuti M. P. 1988. Purification of cellulases from Streptomyces strain A 20 by electroendosmotic preparative electrophoresis. *Electrophoresis.* 9, 327-330.

Curioni A., Dal Belin Peruffo A., Pogna N.E. 1989. Electroendosmotic preparative electrophoresis as a one-step method for purification of high molecular weight subunits of wheat glutenin. *Cereal Chemistry*, 66, 133-135.

Curioni, A., Morel, M. H., Furegon, L., Redaelli, R., Dal Belin Peruffo, A. 1995. Purification of wheat glutenin subunits by preparative acid and two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* 16, 1005-1009

Czerkinsky C., Prince S.J., Michalek S. M. 1987. IgA antibody producing cells in the peripheral blood after antigen ingestion. Evidence for a common mucosal immune system in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 84: 2449-2453.

De Ritis G., Auriccio S., Jones HW., Lew EJ., Bernardin JE., Kasarda DD. 1988. In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in coeliac disease. *Gastroenterology*,94:41-49.

Degani Y., Patchornik A. 1971. Selective cyanilation of sulphydryl groups II. On the synthesis of 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid. *J Org. Chem.*, 36, 2727-2728.

Denery Papini S., Briand J.P., Quillien L., Popineau Y., Regenmore M.H.V. 1994. Immunological differentiation of various gliadins and Low Mr. subunits of glutenin using anti-peptide antisera. J. Cereal Sci. 20: 1-14. Dicke W.K. Coeliakie. MD thesis, University of Utrecht, 1950

**Dicke, W.K. Weijers H.A., Van de Kamer J.H. 1953.** Coeliac disease: the presence oin wheat of a factor having deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr. Scand.* 24:34-42.

**Dieterich W., T Ehnis, M. Bauer, P Donner, U Volta, E.O. Riecken, D. Schuppan.** 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine* Vol 3, Iss 7, pp 797-801

Dieterich W., Laag E., Schöpper H., U. Volta, Ferguson A., Gillett H., E.O. Riecken, D. Schuppan. 1998. Autoantibodies to Tissue Transglutaminase as Predictors of Celiac Disease. *Gastroenterology* 115: 1317-1321.

**Dinari G., Branski D., Walker-Smith J. 1992.** Clinical presentation and long-term surveillance of coeliac disease in childhood. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest.Res. (Basel, Karger ed.) 19: 130-140.

Doi E., Koseki T., Kitabatake N. 1987. Effects of limited proteolysis on functionality of ovalbumin. J. Am. Oil Chem. Soc. 64, 1697-1703.

Doi E., Kitabatake N., Hatta H., Koseki T. 1989. Relationship of SH groups to functionality of ovalbumin. In *Food proteins*; Kinsella, J. E. and Soucie, W. G. Eds.; AOACS; Champaigne, Illinois, 1989.

**D'Ovidio R., Simeone M., Madci S., Proceddu E., Kasarda D.D. 1995.** Nucleotide sequence of a  $\gamma$ -type glutenin gene from durum wheat: correlation with a  $\gamma$ -type glutenin subunit from the same biotype. *Cereal Chem.* 72(5):443-449

Egorov T.A. 1988. The amino acid sequence of the fast avenin component. J. Cereal Sci. : 289-292.

Egorov T.A., Musolyamov, Kochergin Andersen, Roepstorff. 1994. Isolation, characterization by mass spectrometry and partial amino acid sequencing of avenins J. Cereal Sci. 21, , 107-117

Ellis H.J., Doyle A.P., Wieser H., Sturgess R.P., Day P., Ciclitira P.J. 1994. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a sequenced peptide of a-gliadin from the coeliac-activating domain I. J. Biochem. Biophys. Meth. 28: 77-82.

Ellis J.H., Ciclitira P.J. 1996. Measurement of gluten and gliadin in food. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 213-219.

Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77

Ensari A., Marsh M.N., Loft, D.E., Morgan S., Moriarty K. 1993. Morphometric analysis of intestinal mucosa. Quantitative histological and immunocytochemical studies of rectal mucosae in gluten sensitivity. Gut, 34: 1225-1229.

Ewart J.A.D. 1973. Sodium dodecyl sulfate electrophoresis of wheat gliadins. J.Sci. Food Agric. 24:685-689.

Ewart J.A.D. 1979. Glutenin structure. J.Sci. Food Agric. 30:482-492.

Falchuk Z.M., Nelson D.L., Katz A.J., Bernardin J.E., Kasarda D.D., Hague N.E.. 1980. Gluten sensitive enteropathy: influence of histocompatibility type on gluten sensitivity in vitro. J. Clin Invest. 66:227-233.

FAOSTAT - Database. http://www.fao.org/scripts/wlss/

Feillet P., Ait-mouth O., Kobrehel K., Autran J.C. 1989. The role of low molecular weight.glutenin proteins in determination of cooking quality of pasta products: an overview. *Cereal Chem.* 66,1,26-30

Fernandez Diez M. J. 1964. The sulfhydryls of avian ovalbumins, bovine beta lactoglobulin and bovine serum albumin. Arch. Bioch. Biophis. 107:449-458.

Ferreira M., Davies S., Butler M., Scott D., Clark M., Kumar P. 1992. Endomysial antibody: is the best screening test for coeliac disease? *Gut* 33: 1633-1637.

Field J.M., Tatham A.S., Baker A., Shewry P.R. 1985. The structure of C-hordein FEBS letters 200: 76-80 1986

Fleckenstein B., Kalbacher H., Muller C.P., Stoll T., Halder G., Jung G., Wiesmüller K.H. 1996. Eur. J. Biochem .240: 71

Frazer A.C., Fletcher R.F., Ross C.A.C., Shew B., Sammons H.G., Schneider R. 1959. Gluten induced enteropathy. The effect of partially digested gluten. *Lancet*. 7055:769-771

Freedman A.R., Galfre G., Gal E., Ellis H.J., Ciclitira P.J. 1987. Monoclonal antibody ELISA to quantitate wheat gliadin contamination of gluten-free foods. J. Immunol. Meth. 98: 123-127.

Freedman A.R., Wieser H., Ellis H.J., Ciclitira P.J. 1988. Immunoblotting of gliadins separated by Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography: detection with monoclonal antibodies. J. Cereal Sci. 8: 22-29.

Friis S.U., Schäfer-Nielsen C. 1985. Separation of gliadin at pH 3.1 in a polyacrylamide gel suitable for blotting procedures, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10, 301-306.

Froning G. W. 1994. New products innovation from eggs. Chap 4 (71-94). <u>New and developing sources of food proteins</u> Londres, Chapman and Hall.

Fukushima Y., Y. Kawata, T. Onda, M. Kitagawa. 1997. Consumption of cow milk and egg by lactating women and the presence of beta-lactoglobulin and ovalbumin in breast milk. *Amer. J. Clin. Nutr.* 65 (1): 30-35

Galili G., Levanony H., Rubin R., Giorini-Silfen S., Rosemberg N., Shani N., Altschuler Y., Shimioni Y., Karchi H. 1993. Synthesis, targeting and packaging of wheat seed storage proteins. In Shewry, P.R., and Stobart, K. Ed Proc. Phytochem. Soc. Europe on Seed storage compounds: Biosynthesis, interactions and manipulation. Vol po 152-168, Clarendon Press, Oxford

Galili G. 1997. The prolamin storage proteins of wheat and its relatives. In Cellular and molecular biology of plant seed development. Advances in cellular and molecular biology of plants vol 4. Larkins B.A. Vasil I.K. Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordech, Holanda. Pp 221-256.

Gao L, Ng P.K., Bushuk W. 1992. Structure of glutenin based on pharinograph and electrophoretic results *Cereal Chem.* 69 452-455

Gjertsen H.A., Lundin K.E.A., Sollid L.M., Eriksen J.A., Thorsby E. 1994. T cells recognize a peptide derived from a-gliadin presented by the celiac disease associated HLA-DQ (a1\*0501, b1\*0201) heterodimer. *Hum Immunol.* 39: 243-252.

Goldsbrough A.P., Bulleid N.J., Freedman R.B., Flavell R.B. 1989. Conformational differences between two wheat HMW-glutenin subunits are due to a short region containing six amino acid differences. *Biochem J.* 263: 837-842.

Gorman E.G., Arentzen R., Bedzyk W., Cassidy L.A. 1997. An overview of immunoassay automation. In Principles and practice of immunoassays. Pryce and Newman Eds. Stockton Press, New York. 299-324.

Greco L. 1997. From the neolithic revolution to gluten intolerance: Benefits and problems associated with the cultivation of wheat. J. Pediatric Gastroenterol. Nutr. 24 (5): S14-S16

Greco L. 1998. Evolution of coeliac disease In Changing features of coeliac disease. Lohiniemi, S. Collin P., Mäki M. Eds. Tampere, Finland, pp 79-82.

Greenwood C.T., Munro D.N. 1981. Cereals, roots and other starch-based products. In Effect of heating on foodstuffs. Priestley R.J. Ed. Applied Science Publishers, Londres, 373-402

Grinberg V.Y., Burova T.V., Grinberg N.V., Mashkeivich A.Y. 1993. On the effect of the denaturation degree of food properties on their functional properties. In *Food proteins. Structure and Functionality;* Schwenke, K. D.; Mothes R. Eds.; VCH, Weinheim, 1993.

Halford N.G., Tatham, Sui, Daroda, Dreyer, Shewry P.R. 1992. Identification of a novel  $\beta$ -turn-rich repeat motif in the D-hordeins of barley. *Biochem. Biophys. Acta*, 1122, 118-122.

Halstensen T.S., Brantzaeg P. 1993. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4(+)  $\alpha/\beta$  cells in the lamina propria but

proliferation (Ki-67) of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  cells in the epithelium. *Eur. J. Immunol.* 23: 505-510.

Hamauzu Z., Toyomasu T., Yonezawa D. 1974. Molecular weight determination of gliadin fractions in gel filtration by SDS-PAGE and sedimentation equilibrium. Agr. Biol. Chem. 38:2445-2450.

Hanson L. A., Ahlstedt S., Carlsson B. 1977. Secretory IgA antibodies against cow's milk protein in human milk and their possible effect in mixed feeding. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 54: 457-461.

Harwalker V.R. 1990. Techniques of thermal analysis in food reserch. chap 1 <u>Thermal</u> analysis or food. New York, London. Elsevier Applied science

Hayakawa S., Nakai S. 1985. Contribution of the hydrophobycity, net charge and sulfhydryl groups to thermal properties of ovalbumin. *Can Inst. Food Sci. Technol. J.* 18:4, 290-295.

**Hegg P., Martens H., Löfqvist B. 1979.** Effects of pH and neutral salts on th formation and quality of thermal aggregates of ovalbumin. A study on thermal aggregation and denaturation. J. Sci. Food and Agric. 30: 981-993.

Holm K., Vuolteenaho N., Mäki M. 1998. No harm of oats in the diet of children with newly or previosuly diagnosed ceoliac disease. J. Ped. Gastroenterol Nutr. 26:549

Holmes G.KT., Prior P., Lane M.R., Pope A., Allan R.N. 1989. Malignancy in coeliac disease – effect of a gluten free diet. *Gut.* 30:333-338.

Holmes G.K.T. 1996. Non-malignant complications of coeliac disease. Acta Pædiatrica Suppl. 412: 68-75.

Holmes G.K.T. 1997. Celiac disease and malignancy. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 24:S20-S24.

Holmes G.K.T. 1998. Coeliac disease and malignancy. In Changing features of coeliac disease. Lohiniemi, S. Collin P., Mäki M. Eds. Tampere, Finland, pp 55-60.

Host A., Husby S., Osterballe O. 1988. A prospective stury of cow's milk allergy in exclusively breast-fed infants. *Acta Paediatr Scand*;77:663-670.

Howdle P.D., Ciclitira P.J., Simpson F.G., Losowsky M.S. 1984. Are all gliadins toxic in coeliac disease? An in vitro stury of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ - gliadins. Scand. J. Gastroenterol. 19: 41-47

Howdle P.D., Losowsky M.S. 1990. Review of methods for measuring gliadins in food. Gut 31: 712-713.

Howdle P.D. 1992. Clinical presentation and course of coeliac disease in adults. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.) 19: 141-152.

Huebner F.R., Rothfus J.A. 1968. Gliadin proteins from different varieties of wheats. Cereal Chem. 45: 242-253.

Huebner F.R., Wall J.S. 1974. Wheat glutenin subunits I. Preparative separation by gel filtration and ion-exchange chromatography. *Cereal Chem.* 51: 228-240

Janatuinen E.K., Pikkarainen P.H., Kemppainen T.A., Kosma V.M., Järvinen R.M.K., Uusitupa M.I.J. 1995. A comparison of diets with and without oats in adults with coeliac disease. *N Engl. J. Med*.333, 1033-1037

Janssen F.W., de Baaij J.A., Hägele G.H. 1994. Heat-treated meat products. Detection of modified gluten by SDS-PAGE, westernblotting and immunochemical staining *Fleischwirtschaft*, 74 (2) 176-178

Janssen F.W., Voortman G., de Baaij J.A. 1987. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumin and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting and immunoperoxidase staining, *J Agric Food Chem*, 35, 563-567

Janssen F.W. 1998. Codex standard for gluten-free products. In Changing features of coeliac disease. Lohiniemi, S. Collin P., Mäki M. Eds. 1998. Tampere, Finland, pp 31-36.

Jos J., de Trand M.F., Arnaud-Battandier D., Boissel J.P., Popineau Y., Wajcman H. 1983. Separation of pure toxic peptides from a  $\beta$ -gliadin subfraction using higperformance liquid chromatography. *Clin.Chim. Acta.* 134:189-198.

Juto P., Holm S. 1992. Gliadin-specific and cow's milk protein-specific IgA in human milk. J. Pediatr. Gastr. Nutr.; 15: 159-162.

Kasarda D.D., Autran J.C., Lew E.J., Nimmo C.C., Shewry P.R. 1983. N-terminal amino acid sequences of w-gliadins and w-secalins. Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochim. Biophys. Acta* 747: 138-150.

Kasarda D.D., Okita T.W., Bernardin J.E., Baecker P.A., Nimmo C.C., Lew E.J., Dietler M.D., Greene F.C. 1984. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of a-type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81: 4712-4716.

Kasarda D.D, Bernardin J., Nimmo C.C. 1990. Wheat proteins in Y. Pomeranz Ed. Advances in cereal Science and Technology. Vol X pp 79-146. American Association of Cereal chemists. St. Paul MN. USA

Kasarda D.D. 1996. Gluten and gliadin: precipitating factors in coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 195-212

Kagnoff M.F., Austin R.F., Hubert J.J., Kasarda D.D. 1984. Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. J. Exp. Med., 160, 1544-1557

Kagnoff M.F., 1992. Role of environmental and genetic factors in celiac disease. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.) 19: 15-28.

Kato A., Nakai S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescent probe method and its correlation with surface properties of proteins. *Bioch. Bioph. Acta*, 624, 13-20.

Khechinashvili N.N., Janin J., Rodier F. 1995. Thermodynamics of the temperatureinduced unfolding of globular proteins *Protein Science* 4:1315-1324

Kim H.R., Bushuk W. 1995. Changes in some physicochemical properties of flour proteins due to partial reduction with dithiothreitol. *Cereal Chem.* 72(5):450-456.

Koseki T., Kitabake N., Doi E. 1988. Conformational changes in ovalbumin at acid pH. J. Biochem. 103:3, 425-430

Kreis M., Forde B.G., Rahman S., Miflin B.J., Shewry P.R. 1985. Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. J. Mol. Biol. 183: 499-502.

Kreis M., Shewry P.R., Ford B.G., Ford J., Miflin B.J. 1985. Structure and evolution of seed storage proteins and their genes with particular reference to those of wheat, barley and rye. In Miflin, BJ. Ed. Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol. Vol 2 pp 253-317. Oxford University Press, New York.

Kumar P.J., Walker Smith J., Milla P., Harris G., Colyer J., Halliday R. 1988. The teenage coeliac: follow up study of 102 patients. Arch. Dis.Child. 63, 916-920

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assambly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.

Lafiandra D., Kasarda D.D. 1985. One- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: separation of wheat proteins. *Cereal Chem.* 62: 314-319.

Lalignat A., Dumay E., Valencia C., Cheftel J. C. 1991. Surface hydrophobicity and aggregation of beta lactoglobulin heated at neutral pH. J. Agric. Food Chem. 39:2147-2155

Lane D. 1988. Antibodies, a laboratory manual. Ed. Harlow.

Larre C., Popineau Y., Loisel W. 1991. Fractionation of gliadins from common wheat by cation exchange FPLC. J. Cereal Sci. 14: 231-241.

Larre C., Nicolas Y., Desserme C., Courcoux P., Popineau Y. 1997. Preparative separation of high and low molecular weight subunits of glutenin from wheat. J. Cereal Sci. 25: 143-150

Lavelli V., Guerreri N., Cerletti P. 1996. Controlled reduction study of modifications induced by gradual heating in gluten proteins *J Agric Food Chem*, 44, 2549-2555

Lee J.W. 1963. Biochim Biophys Acta, 69:159-160

Leone N.A., Mazzarella G., Giacci C., Maurano F., Vacca L., De Vincenzi M. 1996. Oats prolamines in vitro activate intestinal cell-mediated immunity in coeliac disease. In Collin P. Mäki M. Eds. All on coeliac disease, Seventh International Symposium on coeliac disease. Tampere Lege Artis 69

Lew, Kuzmicky, Kasarda D.D. 1992. Characterization of LMW-glutenin subunits by RP-HPLC, SDS-PAGE and N-terminal aminoacid sequencing. *Cereal Chem.*, 69:508-515

Lewis H.M., Renuala T.L., Garioch J.N. 1996. Protective effect of gluten free diet against development of lymphoma in dermatitis herpetiformis. *Br. J. Dermatol.*; 135:363-367.

Li M., Lee T.C. 1996. Effect of the extrusion temperature on solubility and molecular weight distribution of wheat flour proteins. J. Agric. Food Chem, 44: 763-768

Li M., Lee T.C. 1997. Relationship of the extrusion temperature and the solubility and disulfide bond distrubution of wheat proteins. J. Agric. Food Chem. 45;2711-2717

Li M., Lee T.C. 1998. Effect of cysteine in the molecular weight distribution and the disulfide cross-link of wheat flour proteins in extrudates. J.Agric.Food Chem. 46, 846-853.

Linko P., Colonna P., Mercier C. 1981. High-temperature, short-time extrusion cooking. In Adv. Cereal Sci. Tech. vol. IV, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, USA 145-223.

Lookhart G.L., Bean S.R. 1995a. Rapid differentiation of oat and of rice cultivars by capillary zone electrophoresis. *Cereal Chem.* 72: 312-316.

Lookhart G.L., Bean S.R. 1995b. Separation and characterization of wheat protein fractions by high performance capillary electrophoresis. *Cereal Chem.*, 72: 527-532.

Lookhart G.L., Bean S.R. 1995c. A fast method for wheat cultivar diferentiation using capillary zone electrophoresis. *Cereal Chem.* 71: 42-47.

Lookhart G.L., Bean S.R. 1996. Improvements in cereal protein separations by capillary electrophoresis: resolution and reproducibility. *Cereal Chem.* 73: 81-87.

Lopez L., Valencia M. 1994a. Alimentos para celíacos: influencia del calentamiento en la resolución electroforética de proteínas presentes en productos horneados. Libro de Actas VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, AATA pp 261-263.

Lopez L., Valencia M. 1994b. Alimentos para celíacos: influencia del calentamiento en la resolución electroforética de proteínas presentes en productos horneados. Libro de Actas VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Buenos Aires, AATA pp 264-266.

Lovegrove J.A., Osman D.L., Morgan J.B. 1993. Hampton S.M. Transfer of cow's milk  $\beta$ -lactoglobulin to human serum after a milk load: a pilot study. *Gut* 34:203-207

Lovegrove J.A., Morgan J.B., Hampton S.M. 1996. Dietary factors influencing levels of food antibodies in breast milk. *Acta Pædiatrica*. 85: 778-784.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lundin K., Sollid L., Qvigstad E., Markussen G., Gjertsen H.A., Ek J., Thorsby E. 1990. T lymphocyte recognition of a celiac disease associated cis or trans encoded HLA-DQ a/b heterodimer. J. Immunol. 145: 136-139

Lundin K.E.A., Scott H., Hansen T., Paulsen G., Halstensen T., Fausa O., Thorsby E., Sollid L.M. 1993. Gliadin-specific, HLA-DQ (a\*0501, b\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of coeliac disease patients. J. Exp. Med. 178: 187-196.

MacRitchie F., du Cros D.L., Weigley C.W. 1990. Flour polypeptides related to wheat quality, pp 79-146 in Advances in cereal Science and Technology. Vol X. American Association of Cereal chemists. St. Paul MN. USA.

Mäki M. 1992. Use of serological antibody tests in coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.) 19: 108-129.

Mäki M., Hällstrom O., Sulkanen S., Marttinen A. 1994. Antibodies in Coeliac Disease. In Mucosal Immunity and the gut epithelium: interactions in health and disease. Auriccio S. Ferguson A. Troncone R. Eds Karger, Basel Suiza. Pp 115-126.

Mantzaris G.J., Jewell D.P. 1991. In vivo toxicity of a synthetic dodecapeptide from A-gliadin in patients with coeliac disease. *Scand J. Gastroenterol.*,26,392-39

Manzini M., Pavan O.M. 1987. Pasta Plant. In Food Factories, Process, equipment and costs. Bartholomai Ed. VCH, Alemania, 147-150

Marchylo B.A., LaBerge D.E. 1980. Barley cultivar identification by electrophoretic analysis of hordein proteins. *Can. J. Plant Sci.*. 60:1343-1350.

Marchylo B.A., Hatcher D.W., Kruger J.E., Kirkland J.J. 1992. Reversed-phase high-performances liquid chromatographic analysis of wheat proteins using a new, highly stable column. *Cereal chemistry*. 69 (4): 371-378.

Marsh M.N. 1992. Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine. Gastroenterology. 102: 330-354

Marsh M.N. 1993. Gluten sensitivity and latency: can patterns of intestinal antibody secretion define the great silent majority? *Gastroenterol*. 104: 1550-1553.
Marsh M.N., Loft D.E., Garner V.G., Gordon D. 1994. Time dose responses to coeliac mucosae to graded oral challenges with Frazer's Fraction III (FF3) to gliadin. *Eur J. Gastr. Hepat* 4:667-674.

Matz S.A. 1959. The cereal grain. In The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed. Pp 3-192. Londres. UK.

Mayer E., Greco L., Troncone R., Auriccio S., Marsh M.N. 1991. Compliance of adolescents with coeliac disease with gluten free diet. Gut. 32:881-885

Mendez E., Camafeita E., Sebastian J.S., Valle I., Solis J., Mayer-Posner F.J., Suckau D., Marfisi C., Soriano F. 1995. Direct identification of wheat gliadins and related cereal prolamins by matrix-assisted laser desorption/inoization time of fligth mass spectrometry. J. Mass. Spectrometry, 199, Suppl s123-S128.

Miletic I.D., Miletic V.D., Sattely-Miller E.A., Schiffman S.S. 1994. Identification of gliadin presence in pharmaceutical products. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 19:27-33.

Mills C.E.N., Burgess S.R., Tatham A.S., Shewry P.R., Chan H.W.S., Morgan M.R.A. 1990. Characterization of a panel of monoclonal anti-gliadin antibodies. J. Cereal Sci. 11:89-101.

Mills E.N.C., Brett G.M., Holden S., Kauffman J.A., Tatton M.J., Morgan M.R.A. 1995. Production of monoclonal antibodies to gluten proteins and their use in developing tests for gluten quality. *Food Agric. Immunol.* 7:189-196.

Mine Y. 1991. Thermally induced changes in egg white protein. J. Agric. Food Chem. 38:2122-2125.

Monnig C.A., Kennedy R.T. 1994. Capillary electrophoresis. Anal. Chem. 66:280R-314R.

Müller M., Muth J.R., Gallusci P., Knudsen S., Maddaloni M., Motto M., Schmiz D., Sorensen M.B., Salamini F., von Wettstein D., Thompson R.D. 1995. Regulation of storage protein syithesis in cereal seeds: developmental and nutritional aspects. J. *Plant Physiol.* 145: 606-613.

Nielsen O.H., Jacobsen O., Pedersen E.R. 1995. Non tropical sprue. Malignant disease and mortality rate. Scand J. Gastroenterol 20:13-18.

**Osborne T.B. 1907**. The proteins of the wheat kernel, Carnegie Inst. Washington, Washington DC.

**Ozawa T. 1970**. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. J. Thermal Anal. 2:301.

**Partanen J. 1996**. Major histocompatibility complex and coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 253-264

Patey A.L., Evans D.J. 1973. Large-scale preparation of gliadin proteins. J. Sci. Food Agric. 24: 1229-1233.

Payne P.I., Cornfield K.G. 1979. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium. *Planta* 145:83-88

Perrett D., Ross G. 1992. Capillary electrophoresis: a powerful tool for biomedical analysis and research. *Trends Anal. Chem.* 11:156-163

**Pezolet M., Bonenfent S., Dousseau F., Popineau Y. 1992**. Conformation of wheat gluten. Comparison between functional and solution states as determined by infrared spectroscopy. *FEBS Letters*. 299, 3, 247-250.

Plumb G.W., Lambert N., Mills C.E.N., Tatton M.J., D'Ursel C.C.M., Bogracheva T., Morgan M.R.A. 1995. Characterisation of monoclonal antibodies against b-conglycinin from soya bean (*Glycine max*) and their use as probes for thermal denaturation. Journal of the Science of Food and Agriculture. 67, 511-520.

**Pomeranz Y. 1988**. Composition and funcitionality of wheat flour components. Pages 219-370 in Wheat: Chemistry and Technology. Y. Pomeranz ed. Am Assoc Cereal Chem: St Paul MN.

Popineau Y., Godon B. 1982. Surface hydrophobicity of gliadin components. Cereal Chem, 59:1 55-62

Popineau Y., le Guerroué J.L., Pineau F. 1986. Purification and characterisation of w-gliadin components from common wheat. *Lebensm.-Wiss. u.- Technol.* 19: 266-271.

**Popineau Y., Pineau F. 1993.** Emulsifying properties of wheat gliadins and gliadin peptides. In *Food Proteins, Structure and Functionality*, Shwenke and Mothes Eds. New York, 290-296

Raymond J., Roquette E., Azanza J.L. 1993. Wheat flour proteins: isolation and functionality of gliadin and HMW enriched fractions. In *Food Proteins, Structure and Functionality*, Shwenke and Mothes Eds. New York, 327-330

Renuala T., Collin P., Lewis H.M., Fry L. 1996. Associated diseases and malignancy in dermatitis herpetiformis. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 75-80

Rosenberg W.M.C., Mantzaris G.J., Jewell D.P. 1992. The immunology of coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.) 19: 29-43.

Sablani S.S., Marcotte M., Baik O.D., Castaigne F. 1998. Modeling of simultaneous heat and water transport in the baking process. *Lebensm Wiss u Technol* 31,201-209

Sajdok J., Pozárková D., Rauch P., Kás J. 1989. Thermal denaturation of hen egg white studied by chromatographic and immunochemical techniques. J. Food Sci., 54, 906-908.

Scheets K., Hedgcoth C. 1988. Nucleotide sequence of a  $\gamma$ -gliadin gene: comparison with other gliadin sequences. The structure of  $\gamma$ -gliadin genes and the general primary structure of  $\gamma$ -gliadin. *Plant Sci.* 57, 141-150.

Schofield J.D., Bottomley R.C., Timms M.F., Booth M.R. 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphydryl-disulphide interchange reactions. J. Cereal Sci. 1: 241-253.

Selby WS., Gallagher ND. 1979. Malignancy in a 19 year experience of adult coeliac disease. *Dig Dis Sci*; 24:684-688.

Shewry P.R., Ellis R.S., Pratt H.M., Miflin B. 1978. A comparison of methods for the extraction and separation of hordein fractions from 29 barley varieties. J.Sci. Food Agric. 29, 433-441.

Shewry P.R., Autran J.C., Nimmo C.C., Lew E.J., Kasarda D.D. 1980. N-terminal amino acid sequence homology of storage protein components from barley and a diploid wheat. *Nature*. 286: 520-522.

Shewry, P.R., Kreis M., Parmar S., Lew L., Kasarda D.D. 1985. Identification of gtype hordeins in barley, *FEBS letters* 190,1,61-64.

Shwry P.R., Field J.M., Lew E.J., Kasarda D.D. 1982. The purification and characterization of two groups of storage proteins (secalins) from rye (Secale cereale) L. *J. Exp Botany*, 33,133,261-268,

Shewry P.R., Parmar S., Miflin B., 1983. Extraction, separation and polymorphism of the prolamin storage proteins (secalins) of rye, *Cereal Chem*, 60, 1, 1-6,

Shewry P.R., Miflin B.J. 1985. Seed storage proteins of economically important cereals. In Advances of Cereal Science and Technology. Vol VII Y. Pomeranz ed. Am.Assoc. Cereal Chem. St. Paul MN. Pp 1-83

Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M., Miflin B.J. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. J. Cereal Sci. 4: 97-106.

Shewry P.R., Tatham A.S. 1990. The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 267: 1-12.

Shewry P.R., Tatham A.S., Pappin D.J., Keen J. 1988. N-terminal amino acid sequences show that D hordein of barley and High Molecular Weight (HMW) secalins of rye are homologous with HMW glutenin subunits of wheat. *Cereal Chem.* 65: 510-511.

Shewry P.R., Halford N.G., Tatham A.S. 1992. High molecular weight subunits of wheat glutenin. J. Cereal Sci. 15, 105-120

Shewry P.R., Tatham A.S. 1997a. Disulphide bonds in wheat gluten proteins. J.Cereal Sci 25,207-227

Shewry P.R., Tatham A.S. 1997b. Biotechnology of wheat quality. J. Sci. Food Agric. 73: 397-406

Skerritt J.H., Smith R.A. 1985. A sensitive monoclonal-antibody based test for gluten detection: studies with cooked or processed foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36, 980-986.

Skerritt J.H., Underwood P.A. 1986. Specificity characteristics of monoclonal antibodies to wheat grain storage proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 874: 245-254.

Skerritt J.H. 1987. Immunochemistry of cereal grain storage proteins. Adv. Cereal Sci. Tech. vol. IX, Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN, USA 263-338.

Skerritt J.H., Hill A.S. 1990a. Homologies between grain storage proteins of different cereal species. 2. Effects of assay format and grain extractant on antibody cross-reactivity. J. Cereal Sci. 11: 123-141.

Skerritt J.H., Hill A.S. 1990b. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. J. Agric. Food Chem. 38: 1771-1778.

Skerritt J.H., Lew P.Y. 1990. Homologies between grain storage proteins of different cereal species. 1. Monoclonal antibody reaction with total protein extracts. J. Cereal Sci. 11: 103-121.

Skerritt J.H., Hill A.S. 1991. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 74: 257-264.

Skerrit J.H., Hill A S. 1992. How free is gluten free? Relationship between Kjeldahl Nitrogen values and gluten protein content for wheat starches. *Cereal Chem* 69:1, 110-112

Sollid L.M., Lundin K.E.A., Sjöström H., Molberg O., Thorsby E. 1996. HLA-DQ molecules, peptides and T cells in coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 265-274

Sporns P., Wang J. 1998. Exploring new trontiers in food analysis using MALDI-MS, *Food research Int*. 31,3,181-189.

Srinivasen U., Leonard N., Jones E., Kasarda D.D., Weir D.G., O'Farrelly C. 1996. Absence of toxicity of oats in adult coeliac disease *BMJ*, 313:1300-1301

Stein M. 1990. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reaction centre of serpins. *Nature* 347:99-102

Stepankova R., Tlaskalova HY., Fric P., Trebichavsky I. 1989. Enteropathy induced in young rats by feeding with gliadin. Folia Biológica 35: 19-27.

Stepankova R., Tlaskalova Hogenova H., Sinkora J., Jodl J., Fric P. 1996. Changes in jejunal mucosa after long-term feeding of germfree rats with gluten. Scand J. Gastroenterol. 31: 551-557.

Stevenson A., McCarthy P.K., Griffin M. 1994. Polyclonal antisera against unheated and heated common wheat specific gamma and omega gliadins for detection of adulteration of Durum wheat and Durum wheat products with common wheats. *Food and Agric. Immunol.* 6, 435-442.

Sturgess R., Day P., Ellis H.J., Lundin K.E.A., Gjertsen H.A., Kontakou M., Ciclitira P.J. 1994. Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*; 343:758-761.

Sugiyama T., Rafalski A., Söll D. 1986. The nucleotide sequence of a wheat  $\gamma$ -gliadin genomic clone. *Plant Sci.* 44. 205-209

Superti-Furga G. 1995. Regulation of the Src protein tyrosin kinase. FEBS Lett. 369:62-66

Tatham A.S., Shewry P.R., Miflin B.J. 1984. Wheat gluten elasticity: a similar molecular basis to elastin? *FEBS Lett.* 177:205

Tatham A.S., Drake A.F., Shewry P.R. 1985a. A comformational study of a glutamine- and proline- rich cereal seed protein, C hordein. *Biochem. J.* 226: 557-562.

Tatham A.S., Shewry P.R., Belton P.S. 1985b. <sup>13</sup>C-n.m.r. study of C hordein. Biochem. J. 232: 617-620.

**Tatham A.S., Shewry P.R. 1985.** The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins. J. Cereal Sci. 103-113

Tatham A.S., Miflin B.J., Shewry P.R. 1985c. The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationships to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 62: 405-412.

Tatham A.S., Field M.J., Smith S.J., Shewry P.R. 1987. The conformations of wheat gluten proteins, aggregated gliadins and Low Molecular Weight subunits of glutenin. J. Cereal Sci. 5: 203-214.

Tatham A.S., Shewry P.R., Belton P.S. 1990. Structural studies of cereal prolamins, including wheat gluten. In Advances in cereal science and technology. Vol X. Pomeranz Y. Ed. AACC. St. Palul, MN. Pp 1-78.

Tatham A.S., Shewry P.R. 1991. Conformational Analysis of secalin storage proteins of rye. *J.Cereal Sci.* 14: 15-23.

Terreaux C., van de Wal Y., Koning F., Jung G., Fleckenstein B. 1998. Elucidation of the peptide binding properties of two HLA-DQ2 molecules using a nonapeptide amide library: searching for autoantigens in celiac disease. Proceedings of the 13<sup>th</sup> meeting Working group on prolamin analysis and toxicity, Barcelona

Tijssen P. 1985. Practice and theory of enzymoimmunoassays. Ed. Elsevier. Amsterdam.

Towbin H. 1979. Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some aplications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4356.

Troncone R., Vitale M., Donatiello A., Farris E., Rossi G., Auricchio S. 1986. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. J. Immunol. Methods 92: 21-23.

Troncone R., Scarcella A., Donatiello A., Cannataro P., Tarabusso A., Auriccio S. 1987. Passage of gliadin into human breast milk. *Acta Pediatr. Scand*;76:453-456

Troncone R., Maiuri L., Greco L., Mayer M., Mazzarella G., Gianfrani C., Coletta S., Auricchio S. 1994. Mucosal cell-mediated immunity in coeliac disease. In Mucosal Immunity and the gut epithelium: interactions in health and disease. Auriccio S. Ferguson A. Troncone R. Eds Karger, Basel Suiza. Pp 107-114.

Troncone R., Grecco L., Mayer M., Paparo F., Caputo N., Micillo M., Mugione P., Auriccio S. 1996. Latent and potential coeliac disease. *Acta Pædiatrica Suppl.* 412 10-14.

Van de Kamer F., Weijers H.A. 1955. Coeliac Disease. Some experiments on the cause of the harmful effect of wheat gliadin. *Acta Padiatr*. 44:465-469

VanDijk A.A, L.L. VanWijk, A. VanVliet, P. Haris, E. VanSwieten, G.I. Tesser, G.T. Robillard. 1997. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins .1. Model studies using cyclic and linear peptides. *Protein Science*, Vol 6, Iss 3, pp 637-648

VanDijk A.A., E. DeBoef, A. Bekkers, L.L. VanWijk, E. VanSwieten, R.J. Hamer, G.T. Robillard. 1997. Structure characterization of the central repetitive domain of high molecular weight gluten proteins .2. Characterization in solution and in the dry state. *Protein Science*, Vol 6, Iss 3, pp 649-656

Varshney G., Paraf A. 1990. Use of specific polyclonal antibodies to detect heat treatment of ovalbumin in mushrooms. J. Sci. Food Agric. 52, 261-274.

Visakorpi J.K. 1996. Changing features of coeliac disease. Porceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Mäki M. Collin P., Visakorpi J.K. Eds. Tampere, Finland. Pp 1-7

Vogelsang H., Granditsch G., Deutsch H. 1998. Oats and wheat starch in the diet of coeliac patients. In Changing features of coeliac disease. Lohiniemi, S. Collin P., Mäki M. Eds. Tampere, Finland, pp 109-112.

Volkin D.B., Mach H., Middaugh C.R. 1995. Degradative covalent reactions importanto to protein stability. In Protein stability and folding Shirley BA Ed. Pp 35-64 Humana Press New Jersey USA.

Walker W.A., Sanderson I.R. 1994. The enterocyte and antigen transport. In Mucosal Immunity and the gut epithelium: interactions in health and disease. Auriccio S. Ferguson A. Troncone R. Eds Karger, Basel Suiza. Pp 18-32.

Walker-Smith J.A. 1988. Samuel Gee and the coeliac affection. In Kumar PJ, Walker Smith J:A: Eds. Coeliac disease: 100 years. Leeds: The University of Leeds. 1-10

Walker-Smith J.A., Guandalini S., Schmiz J., Shmerling D.H., Visakorpi J.K. 1990. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Groum of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch. Dis. Child.* 65: 909-911.

Weegels P.L., Hamer R.J., Schofield J.D. 1994. Critical review: functional properties of wheat glutenin. *J Cereal Sci.* 196, 23,1-18

Weegels P.L., de Groot A.M.G., Verhoek J.A., Hamer R.J. 1994a Effects on gluten heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. *Journal of Cereal Science*. 19, 31-38.

Weegels P.L., de Groot A.M.G., Verhoek J.A., Hamer R.J. 1994b. Effects on gluten heating at different moisture contents. II. Changes in physicochemical properties and secondary structure. *Journal of Cereal Science* 19, 39-47.

Weiser N.M., Douglas A.P. 1976. An alternative mechanism for gluten toxicity in coeliac disease. *Lancet* 7862:843-844

Werner W.E., Wiktoowicz J.E., Kasarda D.D. 1995. Wheat varietal identification by capillary electrophoresis of gliadins and high molecular weight glutenin subunits. *Cereal Chem.* 71: 397-402.

Wieser H. Belitz H.D., Idar D., Ashkenazi A. 1986. Coeliac activity of the gliadin peptides CT-1 and CT-2. Lebensm. Unters Forsch. 182:115-117

Wieser H., Belitz H.D. 1989. Aminoacid compositions of avenins separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Cereal Sci.* 9, 221-229.

Wieser H., Seilmeier W., Belitz H.D. 1994. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. J. Cereal Sci. 19: 149-155.

Wieser H. 1996. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. Acta Padiatrica Suppl 412 3-9.

Wieser H. 1998a. Prolamins in cereals. In Changing features of coeliac disease. Lohiniemi, S. Collin P., Mäki M. Eds. 1998. Tampere, Finland, pp 25-30.

Wieser H. 1998b. Investigation on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 207:128-132

Wolberg G., Liu C.T., Adler F.L. 1970. Passive hemaglutination. II-Titration of antibody against determinants unique for aggregated denatured bovine serum albumin and further studies on gelatin. J. Immunol. 105:797-801

Woychik J.H., Boundy J.A., Dimler R.J. 1961. Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. Arch. Biochem. Biophys. 94, 477-482.

Wrigley C.W., Shepherd K.W. 1973. Electrofocusing of grain proteins from wheat genotypes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 209:154-162.

Zanoni B., Peri C., Pierucci S. 1993. A study of the bread-baking process I: a phenomenological model. J. Food Engeneering. 19, 389-398

Zanoni B., Peri C., Bruno B. 1995. Modelling of browning kinetics of bread crust during baking. Lebesm. Wiss. u-Technol. 28: 604-609.

ANEXO II

## ANEXO II: DESCRIPCIÓN DE REACTIVOS EMPLEADOS EN LAS TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS Y DE CULTIVO CELULAR

## 1- Reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

1.1-Buffer de separación 4X	
Тгіз	18,18 g
SDS	0,4 g
agua destilada desionizada c.s.p. ajustar a pH 8,8	100 ml
1.2 – Buffer de apilamiento 4X	
Tris	6,06 g
SDS	0,4 g
agua destilada desionizada c.s.p. ajustar a pH 6,8	100 ml
1.3 – Buffer de muestra	
buffer de apilamiento 4X	5 ml
glicerol	8 ml
SDS	0,4 g
azul de bromofenol	1 mg
2-mercaptoetanol	1 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	20 ml
1.4 – Solución de acrilamida-bisacrilamida	
acrilamida	30g
bisacrilamida	0,8 g
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
Mezclas de polimerización:	
- geles de apilamiento	0.5 1
buffer 1.2	2,5  ml
solucion 1.4	1 mi 10 ml
agua desinada desionizada c.s.p.	10 m
TEMED	10 μ1
solucion de persuitato de amonio 10%	60 μι
- gel de separación homogéneo 12,5%	
solución 1.4	1 ml
buffer 1.1	2,5 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	10 ml
TEMED	10 µl
solución de persulfato de amonio 10%	60 µl

## 2- Reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida a pH ácido:

2.1 - buffer B:

KOH acido láctico	3.5g 25ml
agua c.s.p Ajustar el pH a 3.1	100ml
2.2 - buffer C:	
lactato de aluminio ácido láctico agua c.s.p Ajustar el pH a 3.1	6.25g 10ml 100ml
2.3 - Solución de acrilamida-bisacrilamida	
acrilamida	28g
bisacrilamida	1,2 g
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
Mezclas para el armado de geles: - gel de separación:	
solución 2.3	2.65ml
buffer B	200µl
AgNO <sub>3</sub> 17 mg/ml	120µl
agua	6.85ml
En el momento de armarlo agregar 240 $\mu$ l d	le (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>5</sub> 22.5 mg/ml
-gel de anilamiento	
1ml de premezcla + 2 ml agua + 16.5 $\mu$ l de	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1:100
composición de la premezcla:	
solución 2.3	17ml
buffer B	2ml
acido ascórbico	20mg
FeSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub>	5mg
agua	14ml
Se fracciona de a 1 ml v se guarda a -80 C.	descongelándose la alícu

Se fracciona de a 1 ml y se guarda a -80 C, descongelándose la alícuota en el momento de usar.

precorrida: empleando una dilución 1:50 de buffer B preparada en el momento de usar.
corrida: buffer de corrida: dilución 1:50 de buffer C preparada en el momento de usar.

El buffer de muestra es el mismo buffer de corrida con agregado de un 20% de sacarosa y una punta de espátula de violeta de metilo. Se le puede agregar urea hasta 2M.

## 3- Electrotransferencia

3.1 - Buffer de electrotransferencia para SDS	-PAGE
Tris	7,268 g
glicina	43,465 g
metanol	200 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	1000 ml