



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Tesis para optar por el título de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

**“Desarrollo de métodos cuantitativos de alto poder de
detección de proteínas en alimentos.
Certificación de alimentos destinados a enfermos
celíacos”**

Tesista: Vanina V. Doña

Director: Dr. Fernando G. Chirido

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación del Sistema Inmune (LISIN)

Quiero agradecer sinceramente a todos aquellos que de alguna manera colaboraron y me acompañaron durante estos años dedicados al desarrollo de esta tesis.

A todos los que me ayudaron a concretar la realización de este trabajo.

Al Dr. Alberto Fosatti, director del LISIN, por haberme recibido tan cordialmente en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Chirido, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su experiencia y conocimiento, al igual que su trato humano y el esfuerzo dedicado, han sido un aporte invaluable para mi formación.

A mis compañeros, a quienes colaboraron desinteresadamente compartiendo su experiencia.

Al Dr. Fernando Goldbaum y su equipo de trabajo de la Fundación Instituto Leloir, por permitir que parte de esta tesis doctoral se desarrolle en el marco de un proyecto de colaboración con su grupo.

Finalmente, a CONICET y a la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por financiar mis estudios doctorales.

Por otra parte, agradezco profundamente a quienes me apoyaron y alentaron día a día durante este tiempo.

A mi familia, por darme el ánimo para seguir adelante.

A mis compañeras de facultad y amigas con las cuales tuve la suerte de compartir estos años de trabajo, por tantas cosas vividas dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis amigos, porque me llenaron de energía cada vez que lo necesité.

A mis compañeros del laboratorio, a los de siempre y a los que se fueron sumando, a los que me brindaron su cariño y amistad, por el ambiente de trabajo creado, por los momentos inolvidables pasados en su compañía.

Muchas gracias a todos por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen parte de los siguientes artículos:

Revistas científicas:

"Interference of denaturing and reducing agents on antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis"

Doña V, Fossati A, Chirido F.

European Food Research and Technology. 2008. 226: 591- 602. pISSN: 1438-2377

"Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins in denaturing conditions."

Doña V., Urrutia M., Bayardo M., Alzogaray V., Goldbaum F., Chirido, F.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (enviado el 24 de agosto de 2009)

Proceedings de Reuniones Científicas:

"Effect of reducing agents on the immunochemical quantification of gliadins"

Margheritis A, **Doña V**, Fossati A and Chirido F.

Proceeding of the 17th Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. 2002. Pag. 67-72.

"Interference of denaturing and reducing agents on gliadin/ antibody interaction."

Doña V, Fossati A. and Chirido F.

Proceeding of the 18th Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. 2003. Pag 51-57.

"Development of a quantitative immunoassay for gluten-free food analysis based on a new antigen-binding strategy"

Doña V, Urrutia M, Bayardo M, Goldbaum F, Chirido F.

Proceeding of the 22nd Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. 2007. Pag 35-40

"Development of an Immuno-PCR assay for quantitative determination of gliadins"

Doña V, Bayardo M and Chirido F.

23rd Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity. 2008. Pag 45-50.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 fueron obtenidos mediante un proyecto en colaboración con el Dr. Fernando Goldbaum (Fundación Instituto Leloir).

ABREVIATURAS

2-ME	2-mercaptoetanol
4-MUP	4-metilumbeliferilfosfato
ALP	fosfatasa alcalina
BSA	seroalbumina bovina
CDR	regiones determinantes de complementariedad (complementary determining regions)
CE	célula epitelial
CH1	primer dominio constante
DLG	dieta libre de gluten
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EATL	linfoma de células T asociado a enteropatía
EC	enfermedad celíaca
Fc	fragmento cristalizante
FR	regiones marco (framework regions)
Fv	fragmento variable
GuHCl	cloruro de guanidinio
HCAb	anticuerpo de cadena pesada
HMW-GS	subunidades de glutenina de alto peso molecular
HRP	peroxidasa de rabanito
I-PCR	inmuno-PCR
LIEs	linfocitos intraepiteliales
LMW-GS	subunidades de gluteninas de bajo peso molecular
mAb	anticuerpo monoclonal
OPD	o-fenilendiamina
PBS-T	PBS con Tween 20
PNPP	p-nitrofenilfosfato
PWG	Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity
scFv	fragmento variable de simple cadena
TG 2	transglutaminasa 2
VHH	dominio variable de anticuerpo de cadena pesada

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
A. Presentación clínica.....	2
B. Inmunopatogénesis.....	4
B.1. Respuesta inmune innata en ec.....	4
B.2. Respuesta inmune adaptativa.....	5
B.2.1. Linfocitos intraepiteliales.....	6
B.2.2. Rol de la enzima Transglutaminasa 2.....	6
B.2.3. Epitopes de prolaminas tóxicas y HLA.....	7
C. Factores predisponentes.....	8
D. Prevalencia.....	10
E. Diagnóstico.....	11
F. Proteínas tóxicas para los enfermos celíacos.....	13
F.1. Gliadinas.....	14
F.2. Gluteninas.....	14
G. El tratamiento de la enfermedad celíaca.....	16
G.1. Adherencia a la dlG.....	16
G.2. Dosis nociva de gluten.....	17
G.3. Nuevas estrategias terapéuticas.....	19
G.3.1. Modificación del agente desencadenante.....	19
G.3.2. Regulación de la permeabilidad intestinal.....	20
G.3.3. Modificación de la actividad de linfocitos.....	20
G.3.4. Inducción de inmunomodulación.....	20
H. Detección de gluten en alimentos.....	21
H.1. Alimentos que contienen gluten.....	21
H.2. Toxicidad de gluten.....	22
H.2.1. Gliadinas.....	22
H.2.2. Gluteninas.....	23
H.2.3. Avena.....	23
H.3. Cuantificación de prolaminas en productos alimenticios. Dificultades e interferencias.....	24
H.3.1. Determinación de prolaminas en alimentos procesados.....	25
H.3.2. Estándar de gliadinas para uso en métodos de cuantificación.....	26
H.3.3. Métodos inmunoquímicos cuantitativos para el análisis de gliadinas en alimentos.....	27
CAPÍTULO 1	31
1.1. Introducción.....	32
1.2. Materiales y Métodos.....	35
1.2.1. Muestras.....	35
1.2.1.1. Preparación de estándar de gliadina.....	35
1.2.1.2. Preparación de extractos etanólicos de harina.....	35
1.2.1.3. Extracción de muestras de alimentos.....	35
1.2.1.3.1. BCA.....	35
1.2.1.3.2. Método de Kjeldahl.....	36
1.2.2. Ensayos inmunoquímicos.....	36
1.2.2.1. ELISA indirecto.....	36
1.2.2.2. ELISA competitivo secuencial.....	36
1.2.2.3. ELISA de captura.....	37
1.3. Resultados.....	38
1.3.1. Análisis de la interferencia de agentes reductores en la cuantificación de gliadinas.....	38
1.3.1.1. Efecto en la interacción del anticuerpo con el antígeno inmovilizado.....	38
1.3.1.2. Interferencia de los agentes reductores en ELISA competitivo secuencial.....	39
1.3.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de agentes reductores sobre gliadinas.....	40
1.3.1.4. Uso de agentes reductores en la extracción de muestras de alimentos.....	41
1.3.2. Análisis del efecto combinado de agentes reductores y desnaturalizantes en la cuantificación de gliadinas.....	43
1.3.2.1. Efecto en la interacción del anticuerpo con el antígeno inmovilizado.....	43
1.3.2.2. Interferencia en inmunoensayos cuantitativos.....	44
1.3.2.2.1. ELISA competitivo secuencial.....	44
1.3.2.2.2. ELISA de captura.....	46

1.3.2.2.1. Optimización de ELISAs de captura con anticuerpos monoclonales	46
1.3.2.2.2. Análisis de interferencia	46
1.3.2.3. Efecto de diferentes concentraciones de agentes reductores y desnaturalizantes sobre la detección de gliadinas.....	48
1.3.2.3.1. ELISA competitivo secuencial	48
1.3.2.3.2. ELISA de captura	49
1.3.2.4. Uso de agentes reductores y desnaturalizantes en el procedimiento de extracción ..	50
1.4. Discusión	52
1.5. Conclusión.....	57
1.6. Perspectivas	58

CAPÍTULO 259

2.1. Introducción.....	60
2.1.1. Anticuerpos de camélidos.....	60
2.1.1.1. Genética de los anticuerpos de cadena pesada	62
2.1.1.2. Diferencias en la secuencia	63
2.1.1.3. Generación del repertorio de anticuerpos de cadena pesada	63
2.1.1.3.1. Diversidad de la línea germinal VHH y reordenamiento VDJ.....	63
2.1.1.3.2. Mecanismos de diversificación del repertorio.....	63
2.1.1.4. Estructura de los VHHs.....	64
2.1.1.5. Estabilidad de los VHH	65
2.1.1.6. Aplicaciones de los VHHs.....	66
2.1.1.6.1. Ejemplos de sistemas en los que se ha aplicado la tecnología de VHH	67
2.2. Materiales y Métodos	69
2.2.1. Obtención de VHH recombinantes anti-gliadinas.....	69
2.2.1.1. Inmunización.....	69
2.2.1.2. Evaluación de la respuesta policlonal	69
2.2.1.3. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de VHHs de llamas.....	69
2.2.1.3.1. Obtención de cDNA.....	69
2.2.1.3.2. Obtención del vector	70
2.2.1.3.3. Digestión y ligación	70
2.2.1.3.4. Transformación por electroporación.....	71
2.2.1.4. Selección de fagos -VHH específicos de gliadinas	71
2.2.1.4.1. Obtención de fagos-VHH	71
2.2.1.4.2. Selección	72
2.2.1.5. Producción de fagos individuales.....	72
2.2.1.6. Secuenciación de clones de interés	73
2.2.1.7. Obtención de VHH soluble	73
2.2.2. Ensayos inmunoquímicos.....	74
2.2.2.1. ELISA indirecto con los fagos-VHH.....	74
2.2.2.2. ELISA competitivo secuencial	74
2.2.2.3. ELISA de inhibición	74
2.2.2.4. ELISA de captura.....	74
2.2.3. Análisis de afinidad.....	75
2.3. Resultados.....	76
2.3.1. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH anti- gliadinas.....	76
2.3.1.1. Generación de la biblioteca	76
2.3.1.2. Selección de fagos-VHH que reconocen gliadinas	78
2.3.1.3. Producción de fagos-VHH anti-gliadinas.....	78
2.3.2. Caracterización de la actividad de los fagos-VHH en las condiciones de análisis.....	79
2.3.2.1. Capacidad de unión en presencia de etanol.....	79
2.3.2.2. Capacidad de unión en 2-ME y GuHCl	80
2.3.3. Reactividad de los clones seleccionados contra otras proteínas vegetales	81
2.3.4. Análisis de secuencia de los clones seleccionados	82
2.3.5. Ensayos cuantitativos usando fagos-VHH.....	83
2.3.5.1. Optimización de un ELISA competitivo secuencial	83
2.3.5.2. Interferencia de etanol, 2-ME y GuHCl en ensayos cuantitativos	84
2.3.5.2.1. Interferencia de etanol	84

2.3.5.2.2. Interferencia de 2-ME y GuHCl	85
2.3.5.2.3. Efecto de la desnaturalización del antígeno sobre la detección por fagos-VHH.....	86
2.3.6. Producción y caracterización del fragmento VHH 26 como proteína soluble.....	87
2.3.6.1. Expresión y purificación del fragmento VHH26 soluble.....	87
2.3.6.2. Determinación de la constante de afinidad de la interacción fragmento VHH26/gliadinas	88
2.3.6.2.1. Inmovilización a la superficie del sensor	88
2.3.6.2.2. Medición de la afinidad.....	89
2.3.6.2.3. Análisis de los datos de los estudios cinéticos	90
2.3.6.3. Desarrollo de ensayos cuantitativos empleando VHH 26 soluble	92
2.3.6.4. Determinación del contenido de gliadinas en muestras comerciales	93
2.3.7. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH con capacidad de reconocer gliadinas desnaturalizadas.....	94
2.4. Discusión	96
2.5. Conclusión	99
2.6. Perspectivas	100

CAPÍTULO 3	101
3.1. Introducción	102
3.1.1. Inmuno-PCR	102
3.1.1.1. Metodología	102
3.1.1.1.1. Reactivos y formatos de ensayo	103
3.1.1.1.2. Diseño del DNA reportero	104
3.1.1.1.3. Detección del DNA amplificado.....	104
3.1.1.1.3.1. PCR cuantitativa en tiempo real.....	104
3.1.1.2. Aplicaciones de la inmuno-PCR	106
3.2. Materiales y Métodos	107
3.2.1. Síntesis del DNA reportero	107
3.2.2. ELISA de captura.....	107
3.2.2.1. Con los anticuerpos monoclonales 1B4E9/2A1C4 biotinilado.....	107
3.2.2.2. Con VHH26/3B4H1 biotinilado	107
3.2.3. Inmuno-PCR	107
3.2.3.1. PCR convencional.....	107
3.2.3.2. PCR en tiempo real	108
3.2.4. Análisis de muestras de alimentos	108
3.3. Resultados.....	109
3.3.1. Técnicas de amplificación por fluorimetría	109
3.3.2. Inmuno-PCR	110
3.3.2.1. Etapa inmunoquímica	110
3.3.2.2. DNA reportero	110
3.3.2.3. Soporte empleado en inmuno-PCR.....	111
3.3.2.4. Optimización de las condiciones de inmuno-PCR	111
3.3.2.4.1. PCR convencional.....	111
3.3.2.4.2. PCR en tiempo real	112
3.3.2.5. Curva de calibración estándar	113
3.3.2.6. Estándar de gliadinas del grupo europeo PWG	114
3.3.2.7. Inmuno-PCR basada en VHH	115
3.3.2.8. Cuantificación de gliadinas en muestras comerciales	115
3.4. Discusión	117
3.5. Conclusión	119
3.6. Perspectivas	120

CONCLUSIÓN GENERAL	121
---------------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	123
---------------------------	-----

Introducción

General

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica mediada por mecanismos inmunológicos, que se desencadena en individuos genéticamente susceptibles por la ingestión de un grupo de proteínas (llamadas prolaminas) presentes en trigo, cebada, centeno y avena (aunque se debate sobre la toxicidad de esta última). La activación del sistema inmune genera alteraciones histológicas típicas (atrofia vellositaria, hiperplasia de criptas) y funcionales en la mucosa intestinal, produciendo un síndrome de malabsorción con sintomatología gastrointestinal sólo en la mitad de los casos. En la cronicidad se pueden observar alteraciones hematológicas, endócrinas, óseas, dermatológicas y neurológicas, entre otras.

La eliminación de las proteínas nocivas de la dieta (Dieta Libre de Gluten, DLG) revierte las alteraciones en la mucosa intestinal y evita las complicaciones a largo plazo, siendo el único tratamiento efectivo hasta el presente.

A. Presentación clínica

Samuel Gee, describió las características clásicas de EC en 1887 como diarrea, debilidad y retraso en el crecimiento. En 1953, Willem Dicke [DICKE et al.1953] demostró que la enfermedad celíaca era desencadenada por la ingesta de trigo, cebada y centeno, y que la condición revertía al excluir estos cereales de la dieta.

La primera descripción precisa de la lesión celíaca la hizo Paulley en 1954 [PAULLEY1954], quien describió la presencia de vellosidades planas y un denso infiltrado linfoepitelial inflamatorio en la mucosa del intestino delgado.

La lesión clásica de EC se caracteriza por infiltración de linfocitos (B y T) en epitelio y lámina propia, con hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades. Como mencionamos, dicha alteración histológica revierte cuando se excluye el gluten de la dieta **(Figura 1)**.

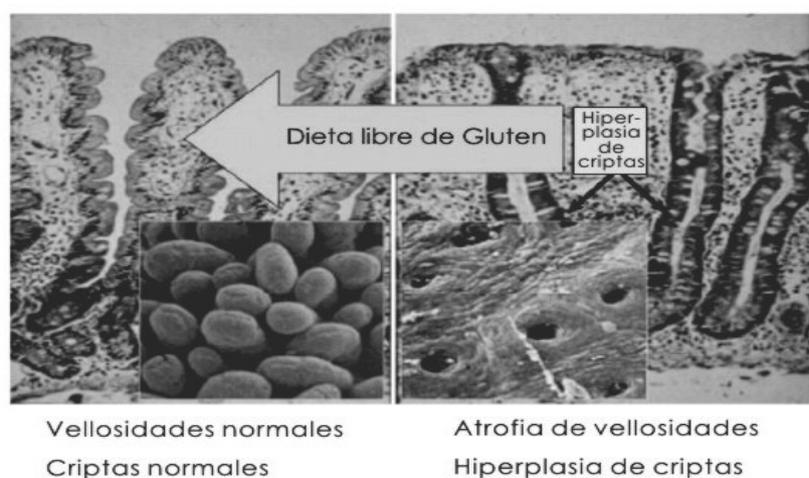


Figura 1. Alteraciones de la mucosa intestinal en EC y efecto de la Dieta Libre de Gluten. Tomado de [Brandtzaeg2006]

La magnitud de la lesión es muy variable entre distintos pacientes. Las clasificaciones de Marsh [Marsh1990] y Oberhuber [Oberhuber et al.1999] describen el espectro de alteraciones que pueden ser halladas en enfermos celíacos.

Tabla 1. Clasificación histológica de la mucosa intestinal en la enfermedad celíaca. Tomado de [Martin2008]

Clasificación de Marsh

Tipo 0	Sin cambios inflamatorios detectables Sin cambios detectables en la relación altura vellosidad/profundidad de la cripta
Tipo 1 (infiltrativo)	Aumento en el número de linfocitos intraepiteliales (LIEs)
Tipo 2 (hiperplásico)	Inflamación, alteración de la arquitectura de la vellosidad y aumento en la relación altura vellosidad/profundidad de la cripta
Tipo 2 (destrutivo)	Inflamación severa, vellosidades planas y criptas hiperplásicas

Clasificación de Oberhuber

Tipo 0	Mucosa normal con <40 LIE/CE (célula epitelial)
Tipo 1	relación LIE/CE aumentado, arquitectura vellositaria normal, profundidad normal de criptas
Tipo 2	arquitectura vellositaria normal, LIEs aumentados, hiperplasia de criptas.
Tipo 3	Tipo destructivo con grados variables de atrofia vellositaria, en todos los subtipos hay un aumento en la profundidad de las criptas y aumento de células inflamatorias.
Tipo 3a	Atrofia vellositaria parcial, con relación vellosidad/cripta <1:1.
Tipo 3b	Atrofia vellositaria subtotal, vellosidades atróficas pero aún separadas y reconocibles.
Tipo 3c	Atrofia vellositaria total, vellosidades rudimentarias o ausentes, la mucosa se asemeja a la de colon.
Tipo 4	Lesión atrófica hipoplásica, mucosa plana con profundidad normal de criptas y sin inflamación significativa, con recuento normal de LIEs.

Aunque la EC puede ser diagnosticada a cualquier edad, se presenta más comúnmente en la niñez temprana (entre 9 y 24 meses) o en la tercera o cuarta década de vida. En niños, los síntomas clásicos de EC son diarrea, distensión abdominal y retraso de crecimiento, debido a alteraciones en la absorción de nutrientes. En adolescentes y adultos se puede observar diarrea, constipación, pérdida de peso, debilidad, dolor abdominal y vómitos. Sin embargo, una alta proporción de pacientes tiene manifestaciones clínicas con pocos o ningún síntoma gastrointestinal, siendo los signos comúnmente hallados: anemia (por deficiencia de hierro, vitamina B12 y folato), densidad mineral ósea reducida (por falta de Ca²⁺ y vitamina D), fatiga crónica, infertilidad, coagulopatías (por deficiencia de vitamina K), baja estatura y desórdenes neurológicos como neuropatía periférica (deficiencia de vitaminas B12 y B1) y ataxia, piel seca, entre otros [Holtmeier and Caspary2006].

La EC está frecuentemente asociada a varios desórdenes autoinmunes (principalmente Diabetes Mellitus Tipo I, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune), Síndrome de Down, Síndrome de Turner y deficiencia selectiva de IgA. Es decir, se observa una mayor prevalencia de enfermedad celíaca en estas patologías que en población general.

Distintos estudios muestran que en enfermos celíacos no tratados hay un riesgo aumentado de cáncer y mortalidad, especialmente linfomas T, mientras que disminuye el riesgo de cáncer de mama y de pulmón. La adherencia a la DLG podría tener un efecto protector [Brottveit and Lundin2008]. Sin embargo, la mayor prevalencia de neoplasia asociada a EC no ha podido ser observada en otros estudios.

Una de las enfermedades más comúnmente asociadas con EC es la **dermatitis herpetiforme** que se observa entre un 10 y un 20% de los pacientes celíacos. Se caracteriza por presentar un rash crónico extremadamente pruriginoso con lesiones dérmicas papovesiculares que frecuentemente afectan rodillas, codos, nalgas y espalda. Aunque es poco probable que tengan síntomas gastrointestinales o características de malabsorción, los marcadores serológicos y el daño de la mucosa intestinal son idénticos a los observados en EC. La DLG reduce la severidad de las manifestaciones y reduce la dosis necesaria de Dapsona (medicación usada para tratar el rash) [Niewinski2008].

B. Inmunopatogénesis

La EC es un desorden inflamatorio crónico en el que tanto la respuesta innata como adaptativa están involucradas. Por sus características de secuencia, los péptidos derivados del gluten son degradados en forma incompleta por las enzimas intraluminales. Estos péptidos conducen a cambios en la permeabilidad intestinal y activación de mecanismos de la inmunidad innata que preceden la activación de la respuesta inmune adaptativa.

B.1. Respuesta inmune innata en EC

Si bien se han hecho importantes avances en aspectos inmunológicos y genéticos aún no ha sido completamente dilucidado cómo los péptidos de gliadinas interactúan con el epitelio.

Bajo condiciones fisiológicas, el acceso de macromoléculas al tejido linfoide asociado a intestino está limitado por las uniones estrechas. El desensamblaje de estas uniones en presencia de gliadinas parece estar mediado por el péptido intestinal **zonulina**. Después de estimular células intestinales de ratas normales con gliadinas se libera zonulina induciendo la polimerización de filamentos de actina intracelulares conectados directamente a las proteínas de las uniones estrechas, regulando así la permeabilidad [Clemente et al.2003]. En biopsias intestinales de pacientes celíacos se observa un incremento en la liberación de zonulina y en la permeabilidad intestinal en comparación con controles no celíacos [Drago et al.2006].

Recientemente Lammers et al. [Lammers et al.2008] describieron al receptor de quimoquinas **CXCR3**, como el receptor que une péptidos de gliadinas en células epiteliales. Posteriormente, por una vía aún no completamente identificada, se produce el incremento en la permeabilidad intestinal mediante la liberación de zonulina. En individuos genéticamente susceptibles, péptidos derivados de gliadinas producirían la estimulación de otras células que expresan este receptor, conduciendo a la activación temprana de la inmunidad innata. La ruptura inicial de la barrera epitelial causada por zonulina puede ser perpetuada por el proceso inflamatorio luego del acceso de gliadinas a la submucosa.

También se ha postulado el pasaje por vía transcelular, implicando en este proceso al receptor de transferrina, **CD71**, que se expresa anormalmente en la membrana apical de las células del epitelio intestinal de pacientes celíacos. Este receptor une complejos inmunes formados por IgA en el lumen intestinal. En particular, en presencia de alta concentración de anticuerpos anti-gliadinas dichos complejos podrían estar formados por IgA-péptidos de gliadinas, y de esta manera los péptidos pasarían de manera protegida por transcitosis y serían liberados en la lámina propia [Matysiak-Budnik et al.2008]

IL-15 es producida principalmente por monocitos/macrófagos, células dendríticas y epiteliales, y se induce rápidamente luego de la exposición a gliadinas en biopsias de intestino delgado de pacientes celíacos [Maiuri et al.2000]. Esta citoquina, tiene un rol clave como mediador del daño de la mucosa inducido por la ingesta de gliadinas. IL-15 induce la expresión de la molécula de stress **MICA** en enterocitos y del receptor NKG2D en LIEs (células NK, linfocitos T TcR γ/δ y linfocitos T CD8⁺ TcR α/β), además de controlar su migración y expansión. La interacción entre MICA y NKG2D resulta en la muerte del enterocito por apoptosis [van Heel and West2006].

La activación temprana de células de la inmunidad innata puede favorecer la capacidad de los péptidos de gliadinas de estimular una respuesta mediada por células T. Todos estos eventos de activación de la inmunidad innata son bloqueados por anticuerpos que neutralizan IL-15, confirmando el rol clave de esta citoquina como mediador del daño de la mucosa intestinal en las etapas iniciales [Gianfrani et al.2005].

B.2. Respuesta inmune adaptativa

Los péptidos de gliadinas activan al sistema inmune adaptativo. Las moléculas HLA-DQ2 y -DQ8, expresadas en la superficie de células presentadoras de antígenos, unen péptidos derivados de la digestión del gluten [Gianfrani et al.2005b]. Estos complejos son reconocidos por poblaciones específicas de linfocitos T presentes en la mucosa intestinal de enfermos celíacos. Estos son principalmente del fenotipo **Th1** y liberan IFN γ , de hecho esta citoquina es predominante en la mucosa intestinal celíaca. Además de la activación de **linfocitos T CD4** existe una infiltración masiva, particularmente en epitelio intestinal por **linfocitos T CD8+** [Gianfrani et al.2005].

Las citoquinas producidas por los linfocitos T activados estimulan además la diferenciación de **linfocitos B** a células plasmáticas productoras de anticuerpos. También se induce la producción de un patrón particular de metaloproteasas responsable de la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal [Ciccocioppo et al.2005a].

B.2.1. Linfocitos intraepiteliales

En EC activa hay una expansión de (LIEs) (células NK, linfocitos T TcR γ/δ y linfocitos T CD8⁺ TcR α/β), los cuales están enriquecidos en proteínas citolíticas y producen grandes cantidades de IFN γ . Luego de comenzar la DLG y paralelamente a la recuperación de la arquitectura vellositaria el número de Linfocitos T CD8⁺ TcR α/β vuelven a la normalidad mientras que los linfocitos T TcR γ/δ permanecen aumentados por años. Los altos niveles de IL-15 presentes en la mucosa intestinal celíaca potencian las funciones efectoras de los LIEs, promoviendo el daño epitelial. Los Linfocitos T CD8⁺ TcR α/β pueden ser activados vía TcR por péptidos de gliadina o por otros antígenos presentes localmente. La interacción entre los receptores de activación NK, sobreexpresados en los LIEs, y de sus ligandos en el epitelio, en presencia de IL-15 es suficiente para activar mecanismos de citotoxicidad y secreción de IFN γ , y conducir a un ataque autoinmune del epitelio [Merese2008].

B.2.2. Rol de la enzima transglutaminasa 2

La enzima transglutaminasa 2 (TG2), que constituye el principal autoantígeno detectado en serología de EC, tiene un rol clave en la patogénesis de la enfermedad [Stenberg et al.2008].

Su función principal es catalizar la aciltransferencia entre el grupo γ -carboxamida de glutamina y el grupo ϵ -amino de Lisina o de una amina primaria libre. Esta reacción conduce a la formación de una unión isopeptídica entre proteínas altamente resistente. La reacción alternativa catalizada por TG2 es la deamidación de glutamina, que ocurre a bajo pH o cuando no hay proteínas aceptoras disponibles. En este caso la glutamina reacciona con agua para formar ácido glutámico y amonio.

Aún no es claro cual es la fuente celular principal que produce TG2 en la mucosa intestinal pero es posible que los fibroblastos y las células endoteliales sean los principales productores, aunque también los enterocitos pueden sintetizarla.

Una vez que los péptidos derivados de gliadinas y gluteninas de la dieta alcanzan la lámina propia del intestino algunos resultan modificados por TG2. Se reconocen dos mecanismos por los que TG2 participa en la generación de neoepitopes de gliadinas y gluteninas para la activación B y T específica [Ciclitira et al.2005b].

a. unión covalente con péptidos de gliadinas o con otras proteínas incluyendo la misma TG2.

Debido a su capacidad de formar uniones isopeptídicas se forman complejos entre gliadinas y TG2. Las células dendríticas presentan gliadinas y gliadinas deamidadas en el contexto de HLA-DQ2 o -DQ8 a células T específicas para gliadinas. La formación de

complejos TG2-gliadinas puede conducir a la producción de anticuerpos contra gliadinas y contra el complejo gliadinas-TG2. Este sería una demostración del efecto carrier/hapteno donde los linfocitos B con especificidad para TG2, podrían captar esos complejos gliadinas/TG2, procesar y presentar péptidos derivados de gliadinas en HLA-DQ2 o DQ8 y resultar activados por colaboración de linfocitos T específicos de gliadinas.

Los anticuerpos anti-TG2 se utilizan como marcadores serológicos para la detección de EC, pero el daño intestinal es producido principalmente por linfocitos T [Brandtzaeg2006]. Sin embargo se ha sugerido un posible rol de los anticuerpos en la patogénesis. En primer lugar la precipitación de complejos inmunes en las paredes de los vasos constituye un importante mecanismo patogénico en dermatitis herpetiforme. Por otro lado, como se mencionó anteriormente los péptidos de gluten pueden atravesar la barrera intestinal en forma protegida formando complejos con IgA.

b. deamidación selectiva de glutaminas.

La asociación de HLA-DQ2 y -DQ8 con EC sugiere una interacción crucial entre los péptidos derivados del gluten y los alelos de MHC clase II. Los huecos de presentación de estos alelos tienen predilección por aminoácidos con cargas negativas en ciertas posiciones de anclaje [van de Wal et al.1996]. Las cadenas laterales en los aminoácidos de los péptidos derivados de gluten no tienen muchas cargas negativas pero si una alta proporción de residuos de glutamina que son un excelente sustrato para TG2 y pueden ser deamidadas. De esta manera, TG2 tiene un rol importante en la modificación de epitopes derivados de los péptidos de gluten. Esta modificación conduce a un aumento en la afinidad de HLA-DQ2/8 por estos péptidos, y consecuentemente a la estimulación de linfocitos T específicos.

Sólo determinados patrones de secuencia en los péptidos de gliadinas favorecen la deamidación selectiva (en particular, QXP y QXXF, donde Q es Glutamina y F es Fenilalanina). De acuerdo a un algoritmo que permite predecir secuencias que serían sustratos óptimos para TG2, y buscando en bases de datos de secuencias de gliadinas se encontró un alto número de candidatos potenciales en regiones ricas en prolina. Estas secuencias fueron capaces de estimular células T en ensayos de proliferación, aunque también existen epitopes que no son TG2 dependientes, es decir que son capaces de producir estimulación sin ser deamidados [Vader et al.2002]. Dado entonces, que los péptidos deamidados tienen mayor capacidad estimuladora de linfocitos T específicos, pero que también los péptidos no deamidados inducen activación T, es difícil establecer el peso en la patogenia molecular de la deamidación selectiva por TG2.

B.2.3. Epitopes de prolaminas tóxicas y HLA

Una característica común entre los epitopes de gluten es que tienen un alto contenido de Prolina y Glutamina. Las peptidasas pancreáticas y del borde en cepillo son incapaces de clivar uniones adyacentes a Prolina, y así la presencia de estos residuos determina que los fragmentos producidos por proteólisis que alcanzan la mucosa intestinal sean, en general, de gran tamaño.

Las moléculas MHC clase II no pueden unir eficientemente péptidos ricos en Prolina. HLA-DQ2 es una excepción, ya que acepta Prolina en ciertas posiciones. Debido a esta capacidad de unir péptidos ricos en Prolina y a su preferencia por Glutamato cargado negativamente como residuo de anclaje, HLA-DQ2 está particularmente adaptado para unir péptidos derivados de la digestión de gliadinas y deamidados por TG2.

HLA-DQ8 es menos eficiente en unir residuos de Prolina, por lo que, no está tan bien adaptado para la unión y presentación de péptidos de gliadina, confiriendo menos riesgo que HLA-DQ2 [Qiao et al.2009].

En los últimos años se han hecho importantes avances en la identificación de la secuencia de péptidos involucrados en el desencadenamiento de EC. Para la caracterización de los epitopes T se emplearon líneas de linfocitos T aislados de mucosa intestinal de pacientes celíacos. Estos estudios permitieron definir algoritmos de predicción de toxicidad [Kim et al.2004]

El péptido 33-mer identificado por Shan et al. [Shan et al.2002] es capaz de estimular fuertemente líneas celulares T específicas. Este péptido deriva de una α 2-gliadina por digestión con enzimas gástricas y pancreáticas, y es altamente resistente a degradación por enzimas del ribete en cepillo. En su secuencia contiene seis copias de tres epitopes T reportados (DQ2- α -I, DQ2- α -II y DQ2- α -III) en forma solapada. Dicho péptido es actualmente usado como péptido modelo de inducción de respuesta inmune en ensayos ex vivo en cultivo de biopsias de intestino delgado.

Al analizar el repertorio T de 14 pacientes adultos [Camarca et al.2009] se encontró que el 33-mer y sus formas más cortas eran las reconocidas más frecuentemente y estimulaban la mayor producción de IFN- γ y proliferación celular de linfocitos T intestinales. La mayoría de los pacientes reconoció al menos un péptido de γ -gliadina y DQ2- ω -I (que tiene similitud con el 17-mer de α 2-gliadina pero es un epitope distinto). En este estudio se observó que el 17-mer es tan potente como el 33-mer, definiéndolo como el péptido mínimo de α -gliadina con alta inmunogenicidad.

C. Factores predisponentes

La EC es una enfermedad multifactorial donde factores genéticos y ambientales contribuyen a su aparición. Existe una **predisposición genética**, siendo el riesgo en parientes de primer grado mayor que en la población general [Dewar et al.2006]. Genéticamente la enfermedad está fuertemente asociada al sistema HLA. Al evaluar la tipificación HLA en los pacientes celíacos se encuentra que, aproximadamente, el 95% expresan HLA-DQ2 (DQA1*05 DQB1*02), mientras que algo menos del 5% expresan HLA-DQ8 (DQA1*03 DQB1*0302). Es decir, que casi la totalidad de los pacientes expresan uno u otro de los alelos de susceptibilidad, constituyendo la asociación HLA/enfermedad más fuerte descripta hasta el momento. Dicha asociación ha sido crítica en el entendimiento de las bases moleculares de los mecanismos adaptativos [Caillat-Zucman2009].

Los alelos HLA-DQ2/DQ8 son capaces de presentar péptidos de gliadinas y gluteninas, y en algunos casos con una afinidad aún mayor para aquellos péptidos que han sido deamidados por la TG2. Aproximadamente un 30% de la población general posee los alelos de susceptibilidad, sin embargo sólo una pequeña proporción de individuos de la población que expresa dichos alelos desarrollará EC.

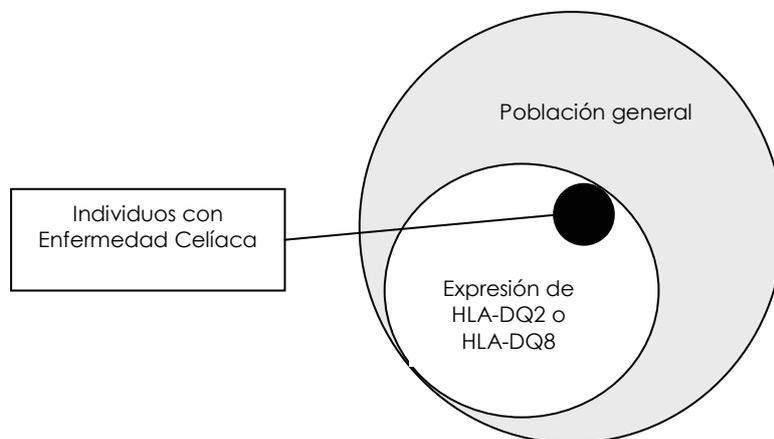


Figura 2. Diagrama de Venn indicando la distribución de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 en población general y EC. Tomado de [Kagnoff2007]

Claramente otros genes deben participar en el condicionamiento a desarrollar EC. Se ha descrito una asociación con polimorfismos en el gen de TNF- α y también con otros genes vinculados con la respuesta de linfocitos T, como CTLA-4. En el año 2007, se realizó la búsqueda sobre 300000 polimorfismos mediante una técnica genómica encontrando que existe una zona de asociación significativa aparte de la región HLA. En dicha zona se encuentran los genes de IL-2 e IL-21 [van Heel et al.2007]. En general, parece que los genes no-HLA juntos contribuyen más a la susceptibilidad genética que los genes HLA, pero la contribución de cada gen no-HLA individual es baja.

La concordancia entre gemelos monocigotas es del 75%. Por lo tanto, además de marcadores genéticos se deben considerar los **factores ambientales** que pueden influir sobre la presentación de la enfermedad.

En el estudio realizado por Norris et al. entre los años 1994 y 2004 se trató de establecer si había alguna correlación entre el momento de introducción del gluten en la dieta y el desarrollo de EC en individuos genéticamente susceptibles [Norris et al.2005]. Los datos obtenidos sugieren que cuando la exposición inicial a trigo, cebada y centeno ocurre en los primeros tres meses de vida o después del séptimo, aumenta el riesgo de desarrollar EC. A edades tempranas la barrera intestinal no está bien desarrollada y permitiría el pasaje de gliadinas, aún con pequeñas ingestas. Cuando el gluten se introduce a mayor edad tiende a ser en mayores cantidades, por lo que aunque una pequeña proporción de la gliadina disponible atraviese el intestino, ésta puede ser suficiente para iniciar la cascada de la respuesta inmune. En base a estos resultados se recomienda la introducción de cereales

en la dieta entre los 4 y 6 meses. Sin embargo no se puede excluir que la exposición más temprana simplemente adelanta la aparición de EC, para lo cual sería necesario continuar el estudio a largo plazo. En dicho estudio no se observó un efecto protector de la alimentación con leche materna, como fue reportado en estudios anteriores [Ivarsson et al.2002]. Se encuentran en progreso estudios que evaluarán el impacto de hábitos alimentarios y amamantamiento en grandes poblaciones los que permitirán establecer el efecto real de la introducción de gluten en la dieta en cuanto al momento de introducción y las cantidades ingeridas.

D. Prevalencia

En los últimos años se ha observado un aumento significativo en el número de casos diagnosticados de EC así como cambios en la forma de presentación al diagnóstico. En la actualidad, relativamente pocos pacientes presentan los síntomas clásicos. Los estudios epidemiológicos utilizando nuevos ensayos serológicos con mayor eficiencia analítica han permitido la detección de formas oligo o asintomáticas que anteriormente no eran advertidas. La búsqueda de EC en familiares de primer grado y en pacientes con enfermedades asociadas también introdujo un fuerte incremento en el diagnóstico de EC. Varios estudios realizados en Europa, Sudamérica, Australia, Asia y Estados Unidos mostraron que entre el 0,5 y el 1% de la población tiene EC no diagnosticada [van Heel and West2006].

En el estudio multicéntrico llevado a cabo en el año 2003 en Estados Unidos [Fasano et al.2003], se encontró un prevalencia similar a la reportada en Europa: 4,54 % en parientes de primer grado y 0,75% en personas sin riesgo de EC (donantes de sangre, pacientes en control de rutina).

La prevalencia resultó ser igualmente alta en parientes de primer o segundo grado con o sin síntomas, resaltando la importancia de la predisposición genética como factor de riesgo. En personas sin parentesco con enfermos celíacos, la presencia de síntomas incrementa significativamente el riesgo.

Es de particular interés la alta prevalencia encontrada en pacientes afectados por varios desordenes frecuentes: incluyendo Diabetes Mellitus tipo I, anemia, artritis, osteoporosis, infertilidad y síndrome de Down aún en ausencia de síntomas.

Dentro de la población sin riesgo aumentado, la prevalencia encontrada fue mayor en adultos que en niños, sugiriendo una correlación entre la duración de la exposición al gluten y el desarrollo de una respuesta inmune en individuos genéticamente susceptibles.

En La Plata se realizó un programa de "screening" entre enero de 1998 y mayo del 2000, a 2000 personas durante la evaluación prenupcial requerida por ley, obteniendo una prevalencia de 1:167. Solo 1 de estos pacientes había sido diagnosticado previamente como celíaco [Gomez et al.2001]. Con un nuevo protocolo diagnóstico, aplicado sobre un grupo de estos pacientes se encontró una prevalencia mayor (1:144) [Gomez et al.2002].

E. Diagnóstico

No existe un test que permita diagnosticar EC o excluirla definitivamente en todos los individuos. Aunque los ensayos serológicos han mejorado en cuanto a la sensibilidad y especificidad, la biopsia de intestino delgado sigue siendo empleada como prueba de certeza diagnóstica.

El desarrollo de los **tests serológicos** comenzó en la década del '80 cuando se evaluaban por ELISA los anticuerpos anti-gliadinas y luego la presencia de anticuerpos anti-endomisio [van Heel and West2006].

Los **anticuerpos anti-endomisio** se miden por inmunofluorescencia en cortes de esófago de mono, y su utilidad diagnóstica resultó ser muy buena. Su especificidad se estima en 99%, aunque tiene una elevada tasa de falsos negativos, generando una sensibilidad cercana al 80% [James and Scott2000]. Es una técnica observador dependiente y requiere cierto entrenamiento para la discriminación de los casos con bajos títulos.

Desde la identificación en 1997 de TG2 como el principal antígeno reconocido por los anticuerpos anti-endomisio [Dieterich et al.1997] se desarrollaron ensayos de ELISA para detectar la presencia de **anticuerpos anti-TG2** de los isotipos IgA e IgG.

Los ensayos de primera generación usaban TG2 de hígado de cobayo como antígeno. Aunque los estudios iniciales describieron una alta eficiencia analítica, varios estudios posteriores mostraron un alto número de resultados falsos negativos y falsos positivos. Luego se desarrollaron ensayos de segunda generación empleando TG2 humana recombinante o purificada, que resultaron superiores a los anteriores.

La determinación de anticuerpos **anti-gliadinas** convencional no ha dado buenos resultados, esencialmente debido a que los diferentes ensayos comerciales empleaban extractos complejos, variables y sin estandarización. Esto condujo a la idea que esta determinación era de poca utilidad. Durante años se trabajó en estos anticuerpos y se observó que el empleo de fracciones purificadas, especialmente ω -gliadinas, generaba ensayos reproducibles con mejor eficiencia analítica [Chirdo et al.1999, Chirdo et al.2000]. Como la deamidación de gliadinas incrementa la unión de los anticuerpos anti-gliadinas presentes en suero de pacientes pero no de controles, se desarrolló un ELISA que detecta anticuerpos contra péptidos sintéticos de gliadina deamidados. El valor diagnóstico de esta determinación en el isotipo de IgA es ligeramente superior a la convencional. En cambio, es notablemente superior al analizar el isotipo IgG [Rashtak et al.2008].

Por otro lado, como EC está frecuentemente asociada a deficiencia selectiva de IgA, en estos casos resulta de utilidad la determinación de anticuerpos IgG anti-endomisio, anti-TG2 y en particular, anti-péptidos deamidados.

Para confirmar resultados serológicos positivos, o cuando hay una fuerte sospecha clínica con resultados serológicos negativos, se realiza un **biopsia de intestino delgado** donde se buscan alteraciones histológicas compatibles con EC.

Los pacientes deben seguir una dieta que contenga gluten hasta la extracción de muestras para el análisis, ya que una dieta reducida en gluten puede impactar en los resultados y generar dudas en el protocolo diagnóstico.

A partir de los análisis serológicos e histológicos se establece un diagnóstico presuntivo, que se confirma cuando los síntomas desaparecen y la serología se vuelve negativa al excluir el gluten de la dieta [Niewinski2008].

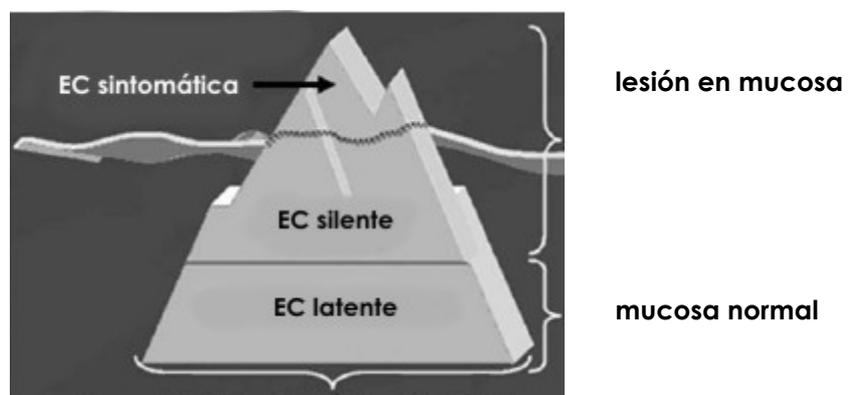
La EC se ha representado como un iceberg diferenciando las distintas formas de la enfermedad, donde las formas atípicas son cada vez más frecuentemente observadas, en particular en adultos (**Figura 3**). La imagen del iceberg refiere a que sólo una pequeña proporción de los enfermos son visibles con una clínica manifiesta, mientras que la mayoría de los pacientes son oligo o asintomáticos [Ferguson et al.1993].

Forma clásica: corresponde a la enfermedad con manifestaciones clínicas claras como esteatorrea, diarrea y malabsorción, con una histología de la mucosa intestinal donde se observa atrofia de vellosidades e hipertrofia de criptas y serología positiva.

Forma subclínica: corresponde a la forma diagnosticada con más frecuencia en la actualidad. Los pacientes presentan síntomas gastrointestinales menores, clínica extraintestinal o hallazgos de laboratorio aislados que reflejan deficiencias por malabsorción. Muestran una histología alterada y serología positiva.

Forma silente: corresponde a pacientes asintomáticos con atrofia vellositaria y serología positiva. Estos pacientes son diagnosticados a partir de un "screening", (por ejemplo, por ser familiares de un paciente celíaco)

Forma latente: No hay síntomas y las alteraciones histológicas son mínimas, aunque pueden tener serología positiva.



Susceptibilidad genética: HLA-DQ2/DQ8
Serología positiva

Figura 3. El iceberg celíaco. Tomado de Martin 2008 [Martin2008]

Otra forma de presentación atípica es la EC refractaria, donde se presentan todas las características de EC, pero no responde a la DLG y existe una expansión monoclonal de linfocitos intraepiteliales anormales. Se considera una lesión preneoplásica con muy mal pronóstico ya que con frecuencia se transforma en un linfoma T muy invasivo usualmente asociado a enteropatía severa (linfoma de células T asociado a enteropatía, EATL). IL-15 al estimular la supervivencia de LIEs por su efecto anti-apoptótico, podría tener un rol clave en la progresión de esta condición [Meresse2008].

Siendo EC una de las enfermedades de base genética de mayor prevalencia, esta debería ser diagnosticada con más frecuencia. El desconocimiento por parte de los profesionales de la salud, y el hecho que la mayoría de los pacientes no presenten la sintomatología típica conduce al retraso en el diagnóstico.

F. Proteínas tóxicas para los enfermos celíacos

Aunque el uso de las proteínas de trigo en alimentación humana ha sido muy extendido, éstas resultan nocivas para los enfermos celíacos.

El grano de trigo está esencialmente constituido por tres partes: cáscara externa, germen y endosperma. Este último constituye el 70-72% del peso del grano, y contiene a las prolaminas [Ciclitira et al.2005a]. Estas proteínas muestran un amplio polimorfismo, ya que han sufrido repetidas duplicaciones y mutaciones sin restricciones dado que carecen de actividad biológica, siendo su función la reserva de aminoácidos durante la germinación.

Los cereales tienen naturaleza poliploide, que combinada con una gran variación alélica presente en los genes de las prolaminas, determina que aún aquellas proteínas derivadas de una sola variedad (cultivar) de trigo constituyan una mezcla compleja y heterogénea. Esta mezcla contiene cientos de componentes proteicos ya sea como monómeros o unidos por puentes disulfuro intercatenarios que forman oligómeros o polímeros.

En base a sus propiedades de solubilidad, Osborne [Osborne1924] clasificó a las proteínas del endosperma en: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas diluidas) y prolaminas. La fracción prolaminas de trigo está compuesta por dos fracciones proteicas mayoritarias: una fracción soluble en etanol 60-70% llamada gliadinas (que representan aproximadamente el 50%) y las gluteninas poliméricas que son insolubles en dicho solvente. [Wieser2007].

En términos generales, tanto la fracción soluble en etanol 60-70% como la insoluble reciben diferentes nombres según el vegetal del cual provienen: se denominan secalinas para centeno, hordeínas para cebada, aveninas para avena. Existe homología en la secuencia de diferentes gliadinas y gluteninas, y entre las prolaminas de trigo, cebada y centeno.

F.1. Gliadinas

La mayoría de las gliadinas están presentes como monómeros, y fueron inicialmente clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a su movilidad electroforética a pH ácido: α -, β -, γ -, y ω -gliadinas en orden decreciente de movilidad [Jones et al. 1959]. Por estudios posteriores de secuencia α - y β - se ubicaron en el mismo grupo α/β - [Shewry et al.1988].

ω -gliadinas: se caracterizan por tener el contenido más alto de Glutamina (Q), Prolina (P) y Fenilalanina (F) que juntos corresponden al 80% del total de la composición aminoacídica, y poseen pesos moleculares entre 40 y 50 kDa. La mayoría carece de cisteínas, por lo que no pueden formar puentes disulfuro. Consisten casi completamente en secuencias repetitivas con un motivo típico PQQPFPQQ.

α/β - y γ -gliadinas: tienen pesos moleculares entre 28 y 35 kDa y una proporción de Q y P mucho menor que las ω -gliadinas. El dominio N-terminal consiste mayoritariamente en secuencias repetitivas ricas en Q, P, F y Tirosina (Y), que son únicas para cada tipo. Las unidades repetitivas para α/β - son dodecapéptidos como QPQFPFPQPYP, usualmente repetidos 5 veces y modificado por la sustitución de residuos individuales. La unidad típica de γ -gliadinas es PQQPFP que se repite más de 16 veces, intercalando residuos adicionales. En el dominio C-Terminal, α/β - y γ -gliadinas son homólogas, tienen secuencias no repetitivas, y menos P y Q que en el extremo N-terminal. En general, las α/β - gliadinas tienen 6 y las γ -gliadinas 8 Cisteínas (C) en el dominio C-Terminal y forman 3 y 4 puentes disulfuro intracatenarios, respectivamente. Aunque la distribución de gliadinas entre los diferentes grupos depende fuertemente de la variedad de trigo (genotipo) y condiciones de crecimiento (suelo, clima, fertilización), en general, α/β - y γ -gliadinas son los componentes mayoritarios y los que más se han asociado con la calidad de formación de la masa.

Una proporción menor de gliadinas tiene un número impar de C originadas por mutaciones puntuales y se unen entre ellas o con gluteninas. [Wieser2007].

F.2. Gluteninas

La fracción gluteninas comprende proteínas agregadas unidas por puentes disulfuro intercatenarios, con un tamaño entre 500 kDa y más de 10000 kDa. Están compuestas por un esqueleto formado por polímeros de subunidades HMW-GS (subunidades de glutenina de alto peso molecular) y polímeros de LMW-GS (subunidades de glutenina de bajo peso molecular) que se ramifican de las subunidades HMW. Después de reducir los puentes disulfuro, las subunidades de gluteninas resultantes muestran una solubilidad en etanol acuoso similar a las gliadinas.

El tipo predominante son las subunidades LMW-GS, que corresponde al 20% de las proteínas del gluten, y son similares a α/β - y γ -gliadinas en peso molecular y composición de aminoácidos. Tienen 8 C, que forman 3 puentes intracatenarios. Las dos restantes no pueden establecer un puente disulfuro intracatenario por impedimento estérico y generan uniones con otras proteínas.

Las subunidades HMW-GS representan el 10% y se agrupan en 2 tipos: x (83-88 kDa) e y (67-74 kDa). Tienen 3 dominios estructurales: dominio N-Terminal no repetitivo, dominio central repetitivo y dominio C-Terminal. Todas forman puentes disulfuro intercatenarios.

A

Tipo	PM $\times 10^{-3}$	Proporción (%)	Composición de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
$\omega 5$ -Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1	1
$\omega 1,2$ -Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1	1
α/β -Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ -Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3
x-HMW-GS	83-88	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-GS	67-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32-39	19-25	38	13	4	1	3

B

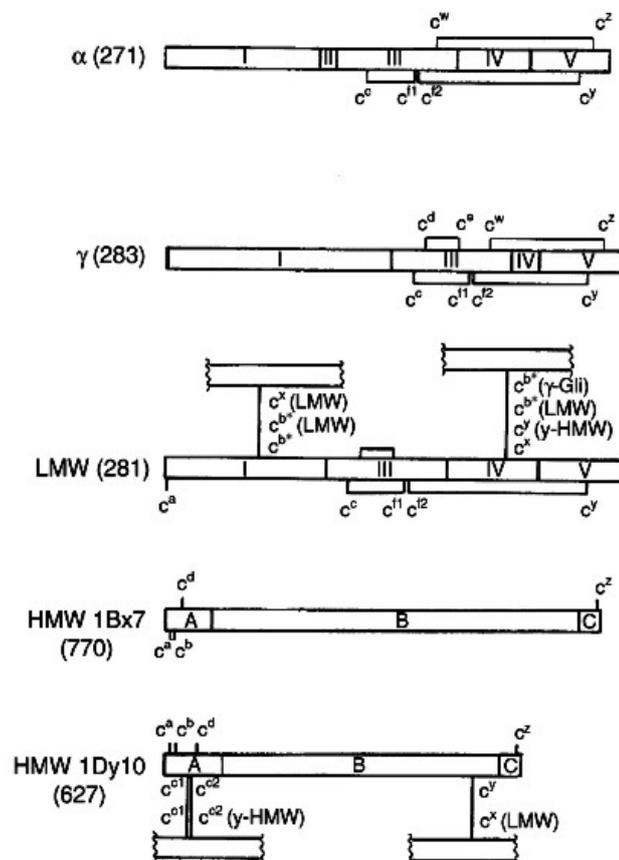


Figura 4. (A) Caracterización de las proteínas de gluten. (B) Arquitectura esquemática y puentes disulfuro de las proteínas de gluten. Tomado de [Wieser2007].

G. El tratamiento de la enfermedad celíaca

Hasta el momento el único tratamiento para EC es la adherencia a una DLG durante toda la vida. Todos los alimentos que contengan trigo, cebada y centeno son eliminados de la dieta, lo cual resulta en la remisión sintomatológica e histológica, y negativización de la serología, en la mayoría de los pacientes. Los índices de crecimiento y desarrollo en los niños vuelven a la normalidad mientras que en adultos se evitan o reducen algunas complicaciones observadas a largo plazo.

El estado nutricional de una persona recién diagnosticada depende de varios factores: el tiempo que estuvo bajo una ingesta normal, el daño en la mucosa intestinal y el grado de malabsorción. Al momento del diagnóstico muchos pacientes se presentan con pérdida de peso, anemia, y deficiencias de vitaminas y minerales. Los pacientes con deficiencias nutricionales pueden requerir vitaminas, minerales y proteínas para corregirlas [Niewinski2008].

G.1. Adherencia a la DLG

Aunque la DLG da la oportunidad al paciente de asumir el control de su propio tratamiento, cambiar los hábitos alimentarios y adaptarse al nuevo estilo de vida resulta un gran desafío para la mayoría de los pacientes celíacos [Case2005]. Muchos estudios investigaron el impacto que tiene la DLG en la calidad de vida tanto en niños como en adultos.

En uno de estos estudios se observó que los niños encuestados sentían enojo por tener que seguir una dieta especial, sintiéndose diferentes a los demás. Manifestaron ser discriminados en actividades escolares o en la relación con otros niños y sentían vergüenza por tener que llevar comida especial a las fiestas [Rashid et al.2005].

En un estudio realizado en Canadá sobre 2681 adultos, los encuestados manifestaron que la adherencia a la dieta impone un gran número de restricciones, como evitar comer en restaurantes y viajar, e impacta negativamente en la vida familiar y en el trabajo. La dieta es difícil de seguir por la dificultad de saber qué productos son libres de gluten y poder obtenerlos. Por otro lado, muchos no son apetecibles. La conclusión de este estudio fue que una mayor disponibilidad de productos libres de gluten, contribuiría a mejorar la calidad de vida de los pacientes celíacos [Zarkadas et al.2006].

Green et al. [PHR et al.2001] describen que la causa más común por la que los pacientes no responden a la DLG como se espera es la ingestión de gluten, ya sea intencional o involuntaria y que las transgresiones a la DLG ocurren generalmente en restaurantes, fiestas y eventos sociales. En el estudio realizado por Abdulkarim [Abdulkarim et al.2002] el 51% de los pacientes continuó teniendo síntomas luego de comenzar la dieta por la ingesta inadvertida de gluten.

Estos trabajos, tomados como ejemplo de otros estudios, muestran que la voluntad del paciente para mantener la adherencia a la dieta es fundamental. Las causas principales de incumplimiento de la DLG son la falta de información y la naturaleza restrictiva de la dieta. Aún los pacientes más motivados y con un alto nivel de educación tienen dificultades en ajustarse a la dieta. Para que el tratamiento sea efectivo es necesaria la completa adherencia a la DLG, por lo que el manejo exitoso de estos pacientes requiere un trabajo en equipo incluyendo al paciente, la familia, médico, nutricionista, y un grupo de apoyo al celíaco [Kupper2005].

Los pacientes deben aprender a integrar la DLG a su rutina escolar o laboral, así como a la vida familiar. Los miembros de la familia deben entender la importancia de tomar precauciones para prevenir la contaminación de alimentos. Los alimentos libres de gluten deben ser almacenados y preparados separadamente, y los utensilios de cocina deben ser limpiados cuidadosamente.

Cuando un paciente comienza la dieta hay en general una gran confusión, en cuanto a qué productos son aptos y cuales no. Es crítico que aprendan a distinguir los alimentos libres de gluten, en base a los listados disponibles y el rotulado de los productos comerciales. Si bien en los últimos años se ha incrementado la variedad y disponibilidad de dichos productos, estos tienen un costo mayor que los análogos que contienen gluten.

Es importante que los pacientes se unan a un grupo de apoyo al celíaco, ya que quienes son miembros activos de estas organizaciones están mejor informados y son usualmente más adherentes a la dieta [Niewinski2008].

G.2. Dosis nociva de gluten

Existe un gran debate en cuanto a la definición del contenido máximo de gliadinas en los productos aptos para consumo por enfermos celíacos, ya que no ha podido establecerse con certeza la cantidad de gliadinas inductora de daño histológico. Debido a inconvenientes de logística y de bioética no han podido ser realizados estudios que involucren un elevado número de pacientes. El estudio más importante en cuanto a la determinación de la dosis nociva mínima de gluten inductora de daño en la mucosa intestinal fue realizado entre los años 2001 y 2004 en Italia [Catassi et al.2007].

Los pacientes incluidos en dicho protocolo eran adultos diagnosticados y que habían seguido una DLG durante más de dos años. Al inicio, el número de voluntarios fue elevado pero finalmente sólo 39 pacientes completaron el estudio. Durante el protocolo se continuó con la DLG, y se los distribuyó en tres grupos, los que diariamente ingerían una cápsula conteniendo 10 o 50 mg de gluten purificado, o 50 mg de placebo. Al inicio del estudio y luego de tres meses de protocolo se realizaron los estudios clínicos, ensayos serológicos (anticuerpos anti-TG2 y anti-gliadinas) y evaluación histológica (relación altura de vellosidad/profundidad de cripta y recuento de linfocitos intraepiteliales). Como comparación se incluyeron 20 controles no celíacos.

En el grupo placebo se encontró una mejora significativa de la arquitectura intestinal, probablemente debido a que los individuos sentían el monitoreo estricto de la DLG impuesto por el protocolo.

Los marcadores serológicos no mostraron correlación con los cambios en la mucosa intestinal, confirmando que no son suficientemente sensibles para detectar la enteropatía residual en pacientes en tratamiento.

A pesar de observar una gran variabilidad individual, que debe ser tomada en cuenta al establecer un límite seguro para todos los pacientes, se concluyó que la ingesta de 50 mg gluten/día durante 3 meses es suficiente para alterar la arquitectura intestinal. Debido al pequeño número de pacientes no se pudieron obtener conclusiones definitivas con respecto a la toxicidad de una ingesta de 10 mg gluten/día. Por cuestiones éticas el estudio se limitó a un período de 3 meses, razón por la cual no se ha estudiado aún el daño intestinal inducido por trazas de gluten a largo plazo.

La decisión con respecto al límite depende no solamente de la dosis tóxica mínima sino también de la cantidad de productos libres de gluten consumidos. Un consumo promedio de productos libres de gluten fue estimado, por encuestas de hábitos nutricionales, en 250 g/día. Para dicho consumo, el límite de 50 mg/día se alcanza fácilmente si los productos contienen 200 ppm de gluten. Mientras que el límite de 100 ppm tampoco resulta seguro si se tiene en cuenta que en algunos países (como por ejemplo Italia) el consumo diario de estos productos es mayor.

El límite de 20 ppm mantiene la ingesta de gluten por debajo de los 50 mg/día, con un margen de seguridad bastante amplio aún teniendo en cuenta la variabilidad entre pacientes respecto a la sensibilidad y a los hábitos dietarios.

El *Committee on Nutrition and Food for Special Dietary Use* del *Codex Alimentarius Commission* es el órgano de la Organización Mundial de la Salud encargado de establecer la normativa internacional sobre las definiciones de productos para alimentación humana. Dicha comisión, estableció originalmente (en 1981), la definición de productos aptos para consumo por enfermos celíacos basados en dos niveles. El primero estrictamente definido como libres de gluten por naturaleza, se refiere a aquellos productos cuyo contenido es menor a 20 ppm de gluten. El segundo, cuyo nivel correspondía a 200ppm, eran aquellos productos en los que el contenido de gluten se ha reducido por manipulación. En la actualidad, dichos niveles son de 20ppm y 100ppm (Codex Alimentarius Commission, 2008). Esta modificación se logró gracias a los avances tecnológicos que permiten a las principales empresas productoras de almidón de trigo garantizar que sus productos tengan un contenido de gluten menor que dicho límite.

G.3. Nuevas estrategias terapéuticas

Hasta el momento la DLG es el único tratamiento efectivo para la EC. Aunque, como fuera mencionado, la adherencia a la dieta puede tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes, siendo frecuentes las transgresiones y el bajo cumplimiento de la misma. Los avances realizados en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad han posibilitado el diseño de diversas estrategias terapéuticas alternativas que se encuentran en evaluación [Chirido et al.2005] [Sollid and Lundin2009].

G.3.1. Modificación del agente desencadenante

Modificación de proteínas vegetales:

Desde el punto de vista conceptual parece muy directo obtener trigos modificados genéticamente que no presenten secuencias tóxicas. Sin embargo, este objetivo es difícil de lograr dado el alto número de secuencias que deberían ser eliminadas o modificadas. Además, la constitución genética es sumamente compleja al considerar la duplicación de segmentos y fragmentos con pseudogenes.

En un estudio reciente se observó que la remoción del locus de α -gliadinas reduce la presencia de epitopes estimulatorios de linfocitos T pero conduce a la pérdida de las propiedades funcionales del trigo, mientras que la remoción de los loci correspondientes a ω -gliadinas, γ -gliadinas y LMW-GS reduce la capacidad estimuladora sin afectar parámetros tecnológicos.

La alteración de la relación gliadinas/gluteninas conduce a la pérdida de elasticidad de la masa, lo cual podría ser compensado introduciendo genes correspondientes a otros vegetales, o a gliadinas que no sean tóxicas. [van den Broeck et al.2009]

Detoxificación de péptidos de gluten:

Se encontró una familia de enzimas presentes en microorganismos (prolil endopeptidasa) capaz de digerir fragmentos peptídicos ricos en prolina (donde se encuentran los epitopes tóxicos, que no son degradados por las enzimas tripsina y pepsina) [Marti et al.2005]. El problema para utilizar esta enzima, u otras con función equivalente, por vía oral es que se desconoce cual sería la dosis y el tiempo necesario para que actúe sobre los alimentos ingeridos. Por otro lado, es difícil tener la certeza de que todos los péptidos tóxicos resulten completamente inactivados antes de tomar contacto con la mucosa intestinal.

Dos drogas están actualmente en evaluación con este propósito:

-ALV003: es una combinación de una cisteín proteasa específica para Glutamina y la prolil endopeptidasa bacteriana. Ambas tienen actividad en estómago y pueden actuar en forma conjunta.

-prolil endoproteasa de *Aspergillus Niger*.

Otra forma de evitar el contacto del gluten con la mucosa intestinal sería la adición de un polímero capaz de secuestrar gluten.

G.3.2. Regulación de la permeabilidad intestinal

Cualquier alteración en la estructura de las uniones estrechas entre los enterocitos puede tener consecuencias importantes en la permeabilidad intestinal. Si esta se encuentra aumentada existe una mayor exposición a péptidos de gluten inmunoestimulatorios, así como a otros compuestos presentes en el lumen. En este sentido, se está realizando un estudio que se encuentra en fase II, utilizando un medicamento oral (AT-1001) que actúa como antagonista de zonulina. [Paterson et al.2007].

G.3.3. Modificación de la actividad de linfocitos

Inhibición de actividad enzimática de Transglutaminasa 2:

Se encuentran en desarrollo varios compuestos con capacidad para bloquear la actividad biológica de TG2, con el fin de reducir la generación de péptidos deamidados. Además de los efectos secundarios que podría producir la inhibición de esta enzima en otros sitios, el principal inconveniente es que existen péptidos tóxicos que no requieren deamidación. Dichos péptidos podrían ser suficientes para iniciar y mantener la reacción inflamatoria.

Estimulación inadecuada de linfocitos T:

Se puede lograr el bloqueo de la unión de péptidos tóxicos a HLA-DQ2 por competición con péptidos análogos no estimuladores de la activación de los linfocitos T, lo que conduciría a anergia de linfocitos T reactivos. Esta estrategia ha sido usada en otras enfermedades asociadas a HLA.

Otra forma es la utilización de complejos solubles HLA-DQ2/péptidos de gliadinas que inducen la apoptosis de clones T específicos.

En esta propuesta el mayor inconveniente es la gran heterogeneidad de péptidos tóxicos, y el hecho que las moléculas HLA son sintetizadas continuamente y siempre podría haber presentación antigénica funcional.

Inhibición de la migración de linfocitos T:

El empleo de antagonistas de integrinas (en particular $\alpha_4\beta_7$) que median la migración de linfocitos T a la mucosa intestinal evitaría la llegada de células T activadas y efectoras de citotoxicidad a la capa epitelial.

G.3.4. Inducción de inmunomodulación

Expansión de linfocitos T reguladores:

Se observó que linfocitos T aislados de mucosa intestinal de celíacos y cultivados en presencia de IL-10 y péptidos tóxicos de gliadinas se diferencian a linfocitos T reguladores (producen TGF- β o IL-10). La inducción de IL-10 se podría emplear como estrategia terapéutica.

Inducción de tolerancia:

Para llevar a cabo esta estrategia sería necesario identificar péptidos tolerogénicos, y establecer dosis y vías de administración. Para que esto tenga éxito se requiere la inducción de tolerancia frente a todos los epitopes T, incluyendo aquellos reconocidos menos frecuentemente, por inoculación con unos pocos epitopes inmunodominantes.

Acción sobre mediadores de inflamación:

Se ha propuesto el uso terapéutico de anticuerpos neutralizantes de citoquinas, como anti-IFN- γ o anti-IL-15 (esto sería una forma de controlar la población de linfocitos intraepiteliales).

Los inhibidores de metaloproteasas también se han propuesto como candidatos para la terapia.

Para poder establecer un tratamiento alternativo aún son necesarias numerosas etapas de evaluación en cuanto a su efectividad e inocuidad. Por lo tanto, hasta el momento el único tratamiento efectivo sigue siendo la DLG.

H. Detección de gluten en alimentos

Para que los pacientes celíacos puedan seguir la DLG es necesario disponer de productos seguros, es decir que hayan sido certificados mediante técnicas cuantitativas con alto poder de detección.

H.1. Alimentos que contienen gluten

Las proteínas del gluten están presentes en una gran variedad de alimentos. Se encuentran en todos los productos hechos con harina de trigo (y cebada, centeno, o avena), como galletitas, pan, tortas, pastas, etc. Además, el gluten puede ser encontrado en una gran variedad de productos comerciales como salchichas, sopas, salsa de soja, helados, aderezos, entre otros. Estos productos que en su formulación de base no requieren el uso de harina de trigo muchas veces tienen adicionadas cantidades variables con fines tecnológicos (como aumentar la retención de agua y grasa, mejorar la textura, aumentar extensibilidad, conservación de estructura, color, etc). Esto conduce a la presencia de prolaminas en productos comerciales insospechados.

Aún productos especialmente dirigidos a pacientes celíacos pueden contener pequeñas cantidades de gluten, debido a contaminación durante la cosecha, molienda, almacenamiento, empaque, transporte o manipulación, o por la presencia de almidón de trigo como ingrediente.

Alimentos basados en cereales alterados enzimáticamente, como cerveza y cebada malteada, en un momento fueron considerados seguros teniendo en cuenta que estas enzimas eran capaces de degradar el gluten, sin embargo se han detectado péptidos de

prolaminas de cebada (hordeínas) en malta y cerveza, por lo que se recomienda no consumir estos productos [Ellis et al.1990]. El extracto de malta se usa como aromatizante y saborizante en una gran cantidad de alimentos como cereales malteados. Se recomienda a los pacientes celíacos que no consuman este tipo de productos [Ellis et al.1994a].

Por otro lado, más recientemente se ha comenzado a prestar atención en la incorporación de proteínas tóxicas presentes en los medicamentos. Esto es especialmente importante en aquellos medicamentos que son parte de tratamientos muy prolongados, como en ciertas patologías crónicas neurológicas, entre otras. Aquí, la fuente principal de proteínas tóxicas proviene del uso de almidón de trigo como excipiente en los compuestos farmacéuticos.

Se pueden encontrar cantidades residuales de prolaminas en almidón de trigo, materia prima ampliamente utilizada en la producción de alimentos. En la industria del almidón de trigo el control de calidad de rutina se hace mediante la medida del contenido de proteínas totales, y antiguamente esto se correlacionaba con el contenido de gliadinas. Sin embargo, se demostró que esto no es exacto, y que para garantizar que el producto es libre de gluten se debe determinar el contenido de gliadinas [Wieser and Seilmeier 2002].

El contenido de gliadinas en almidón de trigo depende del proceso de producción y de la calidad del trigo, siendo el último altamente variable ya que depende de las condiciones climáticas, especialmente en el momento de la cosecha. La empresa productora de almidón KRONER-STARKE (Alemania) realizó un control del contenido de gliadinas en los lotes de almidón producidos durante los años 2000 a 2002. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que el límite de 100 ppm puede ser alcanzado a costos razonables con cierto margen de seguridad. En el caso de adoptar un límite menor a ese valor se debería excluir el almidón de trigo de la DLG, hecho que reduciría notablemente la variedad de productos disponibles e impactaría negativamente en la adherencia a la dieta. [Kroner2002].

H.2. Toxicidad de gluten

El trabajo de Dicke y Frazer en 1950 identificó al gluten como la fracción proteica tóxica para los pacientes celíacos. Desde entonces, se han identificado secuencias tóxicas tanto en gliadinas como en gluteninas, así como en las proteínas homólogas de cebada, centeno y avena [Howdle2006].

H.2.1. Gliadinas

Como se mencionó anteriormente se ha identificado un gran número de péptidos inmunogénicos en las distintas fracciones de gliadinas, capaces de estimular linfocitos T intestinales aislados de pacientes celíacos.

Más recientemente, se ha puesto atención en la participación de mecanismos de la inmunidad innata. Maiuri et al. [Maiuri et al.2003] mostraron que el péptido sintético de a-gliadina p31-43 (LGQQQPFPPQQPY) es capaz de aumentar la expresión de IL-15, de la

enzima ciclooxigenasa 2 y de marcadores de activación celular como CD83 en macrófagos, células dendríticas y monocitos de lámina propia. Estos pasos de activación son independientes de los linfocitos T CD4.

H.2.2. Gluteninas

Se observó que un péptido derivado de gluteninas estimulaba linfocitos T derivados de mucosa intestinal celíaca en muestras pediátricas y adultas (van de Wal et al., 1999). Años más tarde, [Øyvind Molberg et al.2003] Molberg et al., mostraron que varias HMW-gluteninas altamente purificadas eran también estimuladoras para linfocitos T de la mucosa intestinal celíaca. De estas observaciones se concluyó que los péptidos de gluteninas tienen efectos inmunoestimuladores similares a los de gliadinas.

Los ensayos previos de estimulación *in vitro* se complementaron con estudios *in vivo*. Entre 4 y 6 horas luego de la exposición a subunidades x e y de HMW-gluteninas se observaron cambios en la arquitectura de la mucosa (disminución en la relación altura de la vellosidad, profundidad de las criptas). En algunos pacientes también se observó un aumento significativo de linfocitos intraepiteliales. Por inmunofluorescencia se observó un incremento en IL-15, particularmente en el epitelio, a las 2 horas de exposición a las gluteninas, en los pacientes evaluados, lo que estaría de acuerdo con la activación de la inmunidad innata. Además, en ensayos de estimulación vieron que en 11 de 17 pacientes los linfocitos T fueron estimulados por subunidades HMW-gluteninas, y esto no dependía de la deamidación previa por TG2. La conclusión de estas observaciones es que muchos pacientes celíacos son sensibles a gluteninas [Dewar et al.2006].

H.2.3. Avena

Debido a cierta similitud de secuencia entre gliadinas y aveninas, la avena ha sido tradicionalmente excluida de la DLG aún sin disponer de estudios que demuestren su toxicidad. [Ciclitira et al.2005a]. Siendo este un cereal muy empleado en Europa, en especial en los países nórdicos, se deseaba incluirla libremente en la dieta para celíacos. Con este fin se estudió el efecto de incluir avena en la dieta de celíacos en tratamiento sin observar efectos adversos tanto en adultos como en niños [Janatuinen et al.2002]. Aunque en principio se consideró que esto avalaría el uso de avena en forma libre, estudios posteriores mostraron que al menos un pequeño grupo de pacientes adultos con EC son sensibles a la avena [Lundin et al.2003] [Arentz-Hansen et al.2004]

Mediante el empleo de líneas de linfocitos T específicos para aveninas obtenidas de biopsias de intestino de pacientes que consumían avena y que presentaban inflamación intestinal típica de EC, se observó que estas células reconocían péptidos de avenina en el contexto de HLA-DQ2. Dichos péptidos tienen secuencias ricas en prolina y glutamina, semejantes a los epitopes derivados de gliadinas, y algunos siguen un patrón de deamidación por TG2 similar al de gliadinas. De hecho se encontraron linfocitos T específicos para un péptido de avena de secuencia similar a uno de trigo.

La conclusión de estos, como otros trabajos no comentados aquí, es que la avena podría ser tolerada por la mayoría de los pacientes celíacos. Sin embargo, hay pacientes que tienen linfocitos T en la mucosa intestinal específicos de péptidos de avena, que podrían generar una respuesta exacerbada al igual que los derivados del gluten. Por otro lado, no puede descartarse que los productos comerciales en base a avena puedan estar contaminados con trigo durante su fabricación.

Aunque si bien la inclusión de la avena en la dieta podría ser beneficiosa para un numeroso grupo de celíacos es recomendable un estricto seguimiento clínico de los pacientes que consumen avena. Aún bajo esta consideración el consenso internacional continúa siendo que la avena no sea incluida en la dieta.

H.3. Cuantificación de prolaminas en productos alimenticios. Dificultades e interferencias

La estricta adherencia a la DLG depende de la voluntad del paciente y de la posibilidad de disponer de productos confiables en cuanto a su calificación de aptos para celíacos. Esta última condición requiere la existencia de un eficaz sistema de control de los productos que se encuentran en el mercado.

Por su facilidad de uso, practicidad, posibilidad de sistematización y menor costo, las técnicas inmunoquímicas, en especial ELISA, han sido los métodos más empleados en análisis cuantitativo de prolaminas en alimentos.

Otra técnica analítica, el HPLC de fase reversa, es claramente de elección para el análisis de las prolaminas, pero difícilmente su uso puede ser extendido en gran escala para el control cuantitativo de productos comerciales.

Durante los últimos 30 años se ha trabajado intensamente en el desarrollo de métodos de ELISA. Sin embargo, diferentes problemas técnicos han llevado a que no se pueda disponer de un ensayo confiable en cuanto a detectabilidad y reproducibilidad. Entre los aspectos técnicos que afectan la cuantificación, en especial de bajos niveles de prolaminas, podemos mencionar la complejidad inmunoquímica del sistema de proteínas, baja solubilidad de prolaminas en solventes acuosos, baja eficiencia en el procedimiento de extracción de las prolaminas de la muestra en análisis y cambios de reactividad por modificaciones conformacionales debidas al tratamiento térmico durante el procesamiento industrial.

Como se mencionó la certificación de alimentos libres de gluten es fundamental para brindar seguridad a los pacientes celíacos. Dicho control y fiscalización es realizada por los Organismos Oficiales de Salud Pública. Dado que se requiere un control periódico de un universo muy amplio muestras, el alto costo operativo de los ensayos comerciales impide un control riguroso y sistemático, generando graves perjuicios económicos y problemas legales asociados a una dudosa identificación de productos libres de gluten y un serio riesgo de salud de los pacientes.

H.3.1. Determinación de prolaminas en alimentos procesados

Entre los alimentos que deben ser analizados, existe una gran cantidad de productos procesados que han sido sometidos a tratamientos térmicos. Este procesamiento no elimina la toxicidad del gluten para los enfermos celíacos pero sí afecta la cuantificación. La estructura terciaria de las proteínas sufre cambios importantes al ser tratada térmicamente afectando el reconocimiento por los anticuerpos. Por otro lado, se reduce la extractabilidad disminuyendo la concentración de gliadinas disponible para ser cuantificada.

En referencia a la extractabilidad, se observó que la concentración de gliadinas en el extracto obtenido con etanol 60% (medida por RP-HPLC), de una muestra de pan era mucho menor comparada con la obtenida de muestras de harina de trigo, siendo las distintas fracciones afectadas diferencialmente. Las fracciones α/β y γ -gliadinas se afectan mucho más que la fracción ω -gliadinas (dado que estas no forman puentes disulfuro). A su vez, la extractabilidad de gliadinas es menor a partir de la corteza del pan que de la miga. Para lograr la extracción completa de gliadinas del pan (recuperación cercana al 98%) se deben utilizar agentes reductores y desnaturalizantes (1-propanol 50%, urea 2 M, ditiotreitól 1% p/v) y alta temperatura [Wieser 1998].

La extractabilidad de las distintas fracciones también se vio afectada diferencialmente al evaluarla mediante inmunoblotting [García et al.2005]. Consecuentemente, cuando la extracción de prolaminas en alimentos que han sufrido tratamiento térmico se realiza con etanol 60%, el contenido de gliadinas es subestimado.

Con el fin de lograr una mayor eficiencia de extracción se propuso el uso de una mezcla que contiene 250 mM 2-ME y 2M GuHCl en PBS. La muestra se incubó durante 40 minutos a 50 °C y luego se agrega etanol a una concentración final de 60%. Con este procedimiento fue posible recuperar 98-100% de gliadinas a partir de muestras de masa calentadas entre 22 y 230 °C. El etanol acuoso 60% sólo es efectivo en muestras calentadas entre 22 y 90 °C. En muestras calentadas entre 90 y 115 °C se extraen únicamente ω -gliadinas.

El efecto del tratamiento térmico bajo diferentes condiciones de tiempo/temperatura sobre la reactividad inmunoquímica de gliadinas en solución fue evaluado con un panel de anticuerpos [Rumbo et al.2001]. Los tratamientos más fuertes (10 minutos a 100°C) produjeron una disminución en la reactividad, pero en ningún caso disminuyó por debajo del 70%. Si bien cada par fracción de gliadinas purificadas/anticuerpo muestra un comportamiento particular, no existen diferencias importantes entre las fracciones α/β , γ y ω -gliadinas. Cuando se estudió el efecto del tratamiento térmico sobre un sistema modelo, calentando muestras de masa simulando el proceso de horneado, se observó que los extractos etanólicos presentaron una disminución en el contenido proteico en las muestras calentadas. Los cambios en solubilidad se debieron principalmente al entrecruzamiento covalente por puentes disulfuro. El tratamiento térmico incrementa el intercambio disulfuro-sulfhidrilo promoviendo la formación de puentes intermoleculares entre gliadinas ricas en cisteínas, estableciendo una red multimolecular que resulta difícil de

extraer. La extracción de ω -gliadinas es menos afectada que las otras fracciones, aunque también se encuentra reducida.

La cuantificación de gliadinas en extractos de masa y harina sin calentar muestra que el amasado no afecta ni la solubilidad ni la inmunoreactividad. En las muestras calentadas se observó una disminución en la inmunoreactividad al aumentar la temperatura del tratamiento, la cual puede ser originada por alteraciones en la extracción además de cambios estructurales.

H.3.2. Estándar de gliadinas para uso en métodos de cuantificación

El contenido de gluten en una muestra, inferido por la determinación de gliadinas por métodos de ELISA, puede variar significativamente dependiendo del origen del estándar de gliadinas utilizado como patrón en la curva de calibración. Debido a la existencia de estas discrepancias surgió la necesidad de homologar los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios de control. Así, el *European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* (PWG) decidió organizar la preparación de un estándar de gliadinas como referencia internacional.

Los inconvenientes para la obtención de un estándar es que las variedades de trigo usadas en la formulación de alimentos varían de región en región y año a año. Con el fin de obtener un material de referencia que pueda ser representativo, se emplearon 28 variedades de trigo provenientes Francia, Reino Unido y Alemania (principales productores de trigo en Europa). Luego de la eliminación de la fracción albúminas y globulinas, se realizó la extracción con etanol 60%, y el producto obtenido fue liofilizado. El material preparado fue evaluado por RP-HPLC, electroforesis capilar, SDS-PAGE. También se realizó la caracterización inmunoquímica de la gliadina-PWG y otras preparaciones de gliadinas con distintos ensayos de ELISA (4 comerciales y 4 no comerciales) [van Eckert et al.2006].

Distintas fuentes de gliadinas reaccionaron igual que el estándar-PWG de referencia en todos los sistemas evaluados, excepto en aquellos ensayos basados en un anticuerpo anti- ω -gliadinas [Skerritt 1985].

El estándar-PWG cumplió con los criterios necesarios para ser definido como material de referencia: alto contenido proteico, alta solubilidad, homogeneidad, estabilidad fisicoquímica e inmunoquímica, adecuada reactividad en diferentes ELISAs. Mostró tener una reactividad similar a la de gliadinas de otras fuentes confirmando su aplicabilidad universal.

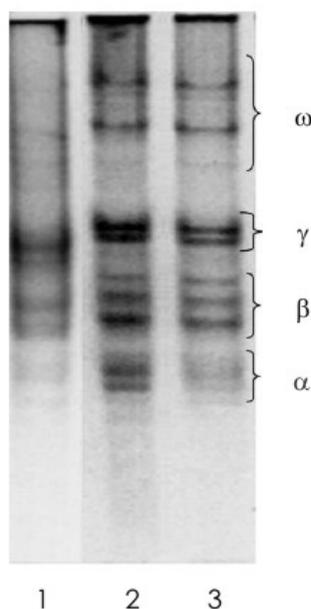


Figura 5. Gel ácido de distintas fuentes de gliadina. (1) gliadina comercial (Sigma) (2) fuente de harina para la preparación del estándar PWG (3) gliadinas-PWG. Tomado de [van Eckert et al.2006].

3.3. Métodos inmunoquímicos cuantitativos para el análisis de gliadinas en alimentos

Con el objetivo de desarrollar ensayos cuantitativos, distintos laboratorios han obtenido anticuerpos, tanto antisueros como anticuerpos monoclonales, empleando extractos totales de gliadinas, fracciones de gliadinas o péptidos de síntesis. Se han generado ELISAs en distintos formatos dando como resultado una gran variedad de ensayos con diferentes características [Denery-Papini et al 1999]. En la **Tabla 2** se comparan algunos inmunoensayos desarrollados por diferentes grupos. Realizaremos una breve descripción de los estudios más significativos publicados hasta el presente.

El primer desarrollo que fue transformado en un ensayo comercial fue generado por Skerritt [Skerritt and Hill 1990] [Skerritt and Hill 1991]. Dicho ensayo se basó en el empleo de un anticuerpo monoclonal que reconoce ω -gliadinas, y las secuencias homólogas de cebada y centeno. Por lo tanto, este ensayo detecta proteínas de trigo, cebada y centeno pero no de avena. Aunque se describió que el límite de detección era 100-150 ng gliadinas/ml (extracción 1g/10ml, dilución 1:5), equivalente a 10-15 μ g de gluten/g (1 mg/100g, 10 ppm), la cuantificación de gliadinas en alimentos sólo era confiable por encima de 16 mg de gluten / 100 g (160 ppm). Este ensayo ha sido comercializado por varias firmas: Cortecs (Inglaterra), R-Biopharm (Alemania) y Transia (Francia), que modificaron las condiciones de revelado y lograron que la detectabilidad sea bastante mayor.

Este ensayo comercial, ha sido el de uso más difundido por más de diez años, evalúa ω -gliadinas que son proteínas estables cuya extracción e inmunoreactividad no se modifica con el tratamiento térmico durante la fabricación de los alimentos. Sin embargo, estas representan un bajo porcentaje de las gliadinas totales y su concentración varía considerablemente entre distintas variedades (de 6 a 20% de gliadinas totales) y dentro de

la misma variedad, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Por lo tanto, los resultados son altamente variables y existe el riesgo de sub o sobre estimar el contenido de gliadinas totales según el estándar usado.

En nuestro grupo se ha desarrollado un método de cuantificación de gliadinas en alimentos empleando anticuerpos policlonales [Chirido et al 1995] obtenidos contra gliadinas totales. El anticuerpo reconoce α -, β -, γ - y ω - gliadinas y subunidades HMW-gluteninas, y las proteínas homólogas de cebada y centeno. Reconoce parcialmente aveninas y no presenta reacción cruzada con proteínas de soja, maíz y arroz. Este ensayo fue aceptado como método Oficial en el Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires (Res. 4370, año 2000). El citado método se usa en forma rutinaria en nuestra unidad de certificación dependiente la Facultad de Ciencias Exactas de La Plata. Además, se produjo y caracterizó un panel de anticuerpos monoclonales anti-prolaminas y se desarrollaron diferentes métodos cuantitativos de alta detectabilidad [Chirido et al 1998]. Dichos anticuerpos serán usados en parte de los desarrollos expuestos en este trabajo.

Ellis et al. [Ellis et al.1994b] obtuvieron un anticuerpo monoclonal contra un péptido derivado de la digestión con tripsina y pepsina de una α -gliadinas. Con dicho anticuerpo desarrollaron un ELISA sándwich con una sensibilidad de 15 ng/ml (0,03 mg/100 g) para gliadinas y secalinas, 125 ng/ml (0,25 mg/100 g) para hordeínas y 250 ng/ml (0,5 mg/100 g) para aveninas. El análisis de muestras sometidas a tratamiento térmico (30 minutos, 100 °C) mostró, en todos los casos una importante subestimación en la concentración detectada. Posteriormente, el mismo grupo desarrolló un ensayo de captura empleando anticuerpos policlonales producidos contra gliadinas totales en la captura y como segundo anticuerpo un anticuerpo monoclonal producido contra la secuencia tóxica p31-49 de α -gliadina. Se describió que este método tiene una detectabilidad de 4 ng gliadina /ml (0,08 ppm), pero al estudiar el efecto de 2-mercaptoetanol y urea en la extracción de prolaminas, se observó una disminución en la detectabilidad, probablemente por desnaturalización del anticuerpo de captura.

Sorell et al [Sorell et al.1998] desarrollaron un ELISA sándwich basado en una combinación de anticuerpos. La captura se realizaba con dos anticuerpos monoclonales (uno de ellos de nuestro panel): uno de estos generado contra secalinas y hordeínas y el otro sólo contra gliadinas. La detección involucra un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa, generado contra secalinas, pero que reconoce gliadinas, secalinas, hordeínas y aveninas. El límite de detección de gliadinas es 1,5 ng/ml, equivalente a 1,5 ppm para una muestra diluída 1/50. El límite de detección para hordeínas, secalinas y aveninas es 0,05, 0,15 y 12 ng/ml, respectivamente. Aunque no se observaron variaciones significativas cuando se evaluaron soluciones de hasta 100 ng/ml de gliadinas, secalinas, hordeínas y aveninas calentadas 30 min a 120 °C, este estudio no tuvo en cuenta el problema de extractabilidad de prolaminas.

Tabla 2. Métodos de cuantificación de prolaminas

Referencia	Inmunización	Tipo de anticuerpo	Tipo de ensayo	Sensibilidad (ng/ml gliadinas)	Notas
[Ciclitira and Lennox 1983]	A-gliadinas	pAb	RIA competitivo		No detecta prolaminas de avena, cebada y centeno
[Skerritt 1985]	gliadinas	mAb	ELISA, soporte de nitrocelulosa	20000	
[Troncone et al.1986]	gliadinas	pAb	ELISA de captura	5	Reactividad cruzada con prolaminas de arroz y maíz
[Freedman et al.1987]	gliadinas	captura: pAb detección: mAb	ELISA de captura	15	Detecta prolaminas de trigo, avena, cebada y centeno
[Friis 1988]	gliadinas	pAb	ELISA competitivo	10	
[Ayob et al 1988]	gliadinas	pAb	ELISA de captura	30	
[Mills et al 1989]	gliadinas	captura: pAb detección: mAb	ELISA de captura	100-5000	
[Skerritt and Hill 1990] comercializado por: <ul style="list-style-type: none"> • Gluten assay kit(Cortecs) • Transia Plate Gluten (Diffchamb) • Ridascreen Gluten Kit (Biopharm) 	ω -gliadinas	mAb	ELISA de captura	100 ng/ml gliadinas 16 mg gluten/100g 16 mg gluten/100g 8 mg gluten/100g 2mg gluten/100g	ω -gliadinas estabilidad térmica Aceptado por AOAC
ELISA-systems gliadin [Riedel de Haen]	gliadinas		ELISA de captura		
[Ellis et al.1994b]	Péptido de α -gliadina	captura: pAb detección: mAb(anti-peptido)	ELISA de captura	15 ng/ml gliadinas 0,6mg gluten/100g	Detecta prolaminas de avena, cebada y centeno. Sin reactividad cruzada con maíz, arroz, millet y sorgo
[Ellis et al.1998]	Péptido 31-49 de α -gliadina	captura: pAb detección: mAb(anti-peptido)	ELISA de captura	15 ng/ml gliadinas 0,016mg gluten/100g	
[Chirido et al 1995]	gliadinas	pAb	ELISA competitivo	1 ng/ml gliadinas 0,1 mg gluten/100g	Detecta prolaminas de triticale, avena, cebada y centeno. Sin reactividad cruzada con maíz, arroz y soja
[Chirido et al 1998]	gliadinas	mAb mAb mAb	ELISA competitivo ELISA de captura ELISA competitivo Con gliadina marcada	20 ng/ml gliadinas 2 mg gluten/100g 1 ng/ml gliadinas 0,05mg gluten/100g 5 ng/ml gliadinas 0,5 mg gluten/100g	
[Sorell et al.1998]	Secalinas o gliadinas	captura: 2 mAbs detección: mAb	ELISA de captura	3 ng/ml gliadinas 0,3 mg gluten/100g	
[Aubrecht and Toth 1995]	gliadinas	pAb	ELISA de captura	25	Detección de prolaminas de barley, reactividad cruzada con maíz
[Valdés et al.2003]	gliadinas	mAb	ELISA de captura	1,5 ng gliadina/ml 0,3 0,156 mg gluten/100g	Cocktail de extracción para productos procesados

Más recientemente **Valdes et al.** [Valdés et al.2003] desarrollaron un ELISA de captura basado en un anticuerpo monoclonal (denominado R5), que reconoce el epitope QQPFP y algunas secuencias relacionadas presentes en trigo, cebada y centeno. El límite de detección para este ensayo es de 1.5 ng gliadina/ml (1.5 ppm) [Valdés et al.2003]. Este mismo grupo además presentó un procedimiento general de extracción basado en el uso de agentes reductores y desnaturalizantes [García et al.2005].

El *European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* coordinó un estudio para la validación de este método donde participaron 20 laboratorios, entre ellos el nuestro. Se analizó la eficiencia del ensayo en el formato comercial de dos empresas (R-Biopharm y Ridascreen) encontrando que ambos son comparables y robustos, y cumplen con los criterios para un ensayo de ELISA comercial [Méndez et al.2005]

Si bien se han desarrollado numerosos ensayos además de los descritos para la cuantificación de gliadinas, se sigue trabajando en este campo con el objetivo de lograr un método que cumpla con los requerimientos de detectabilidad y reconocimiento específico de todas las proteínas nocivas para los enfermos celíacos, necesario para una correcta certificación de los alimentos libres de gluten.

Capítulo 1

1.1. Introducción

Para la certificación de alimentos libres de gluten se aplican métodos cuantitativos, en general inmunoquímicos, que evalúan la concentración de prolaminas en extractos alcohólicos obtenidos de las muestras en análisis. Por lo tanto, la extracción de las proteínas de la muestra es el primer paso en todo ensayo cuantitativo y su eficiencia tiene un alto impacto en la calidad analítica del procedimiento de certificación.

Dado que gran parte de los alimentos son productos procesados (sometidos a cambios de presión, pH, temperatura y tratamientos enzimáticos durante su manufactura), las proteínas que los constituyen se encuentran modificadas de manera que su extractabilidad con el solvente convencional (etanol 60%) es reducida, en especial cuando se la compara con la eficiencia obtenida al extraerlas directamente de la harina de trigo.

Como método general de extracción para alimentos procesados, García et al. [García et al.2005] describieron el uso de una solución basada en la combinación del agente reductor 2-mercaptoetanol (2-ME) y el agente desnaturizante, cloruro de guanidinio (GuHCl), que permite una recuperación de prolaminas de 98-100% a partir de productos procesados térmicamente.

Como se mencionó anteriormente los métodos inmunoquímicos, y especialmente las técnicas de ELISA, constituyen la plataforma de análisis para la certificación de productos libres de gluten de uso más difundido. Estos métodos, se basan en la formación de complejos inmunes cuya estabilidad depende de la interacción antígeno/anticuerpo siendo la afinidad el parámetro que define, en última instancia, las características del ensayo cuantitativo.

Los componentes del buffer de extracción, tanto el etanol como los agentes reductores y desnaturizantes, pueden producir cambios en la estructura proteica, tanto del antígeno (prolaminas) como de las inmunoglobulinas. La alteración de la conformación del antígeno y del anticuerpo produce un cambio en la energía de interacción entre ambos que, siendo diferente a las interacciones establecidas por esos componentes en la curva de calibración, genera error en la cuantificación inmunoquímica.

Como fue descrito por García et al. [García et al.2005] el uso del buffer de extracción que contiene 2-ME y GuHCl es compatible con el ELISA de captura basado en el anticuerpo monoclonal identificado como R5 [Valdés et al.2003]. En este protocolo, luego de la extracción con dicho buffer, la muestra es diluída 1:4 en etanol acuoso al 80% quedando una concentración final de etanol de 60%. Luego, previo al análisis, se realiza una dilución 1:25 a 1:50 de la muestra llevando las concentraciones finales de 2-ME y GuHCl durante la interacción antígeno-anticuerpo al rango de 2,5 a 1,25 mM y 20 a 10 mM, respectivamente. Si bien, estos autores describen que estas cantidades residuales de 2-ME y GuHCl no afectan el ensayo, la necesidad de diluir entre 100 y 200 veces la muestra conduce a una disminución en la capacidad de detección real del método.

Ellis et al. [Ellis et al.1998] describieron que el uso de agentes reductores para la extracción de gliadinas (como 50% 1-propanol, 1% 2-ME, 0,08 mol/L Tris-HCL, pH=7,5) mejora la eficiencia de la extracción cuando se evalúan productos tratados térmicamente. Sin embargo, este buffer afecta la estabilidad de los anticuerpos resultando en una curva de calibración atenuada (menor pendiente, y por consiguiente, menor sensibilidad). Aún luego de una dilución 1/100 de las muestras previa al análisis, la cantidad de gliadinas detectada fue inferior a la real, debido probablemente a la desnaturalización del antígeno y/o anticuerpo de captura.

Varios estudios en diversos sistemas demuestran que tanto el etanol, como los agentes reductores y desnaturalizantes producen alteraciones en la conformación proteica, alterando la actividad biológica. Podemos mencionar como ejemplo, el estudio del efecto de seis solventes orgánicos (metanol, etanol, propanol, dimetil sulfóxido, N,N-dimetil formamida y glicerol) en la interacción antígeno/anticuerpo, usando un sistema modelo catalasa/anti-catalasa (IgG purificada de suero de conejos inmunizados) [Rehan and Younus2006]. Los resultados sugieren que las diferencias en la interacción antígeno/anticuerpo se deben a cambios conformacionales causados por intercambios en el sistema de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas en las proteínas. La estructura secundaria y terciaria sufre cambios debido a la presencia de concentraciones cercanas al 40% de los solventes orgánicos evaluados. Estos cambios involucran segmentos pequeños y relativamente desordenados, que en las inmunoglobulinas están representados por los CDRs y la región bisagra. En el caso del etanol, las alteraciones ocasionadas hacen que las interacciones antígeno/anticuerpo sean más débiles. Dicha interferencia, aunque con menor magnitud, se observa a concentraciones del 10% de esos solventes orgánicos.

El efecto de los agentes desnaturalizantes como GuHCl se ha evaluado sobre diferentes enzimas, evidenciando su capacidad de producir la pérdida de la actividad biológica debido al desplegamiento parcial de la molécula. En todos los casos, el sitio activo resultó ser más flexible y por lo tanto, más fácilmente perturbado que la proteína como un todo. Por lo tanto, la pérdida de actividad enzimática ocurre a concentraciones menores que las necesarias para la desnaturalización total [Yang and Tsou1995] [Wang et al.2000].

Como se mencionó para las enzimas, los sitios de unión a antígenos de los anticuerpos son más frágiles que la molécula en su conjunto. El sitio de unión del sustrato en muchas enzimas está situado en un bolsillo o cavidad entre dominios. Análogamente, en las inmunoglobulinas el antígeno se une en la interfase formada por los dominios N-terminal (Fv) de las cadenas liviana y pesada, y el sitio de unión a proteína A está formado por residuos de los dominios CH2 y CH3 (región Fc).

El desplegamiento de las inmunoglobulinas no sigue un modelo de todo o nada. Las regiones Fc y Fv se inactivan a concentraciones mucho menores de GuHCl (1 y 0,18 mol/L respectivamente) que las requeridas para un cambio conformacional global. La conformación proteica es mantenida por un gran número de uniones débiles con diferentes

entornos y consecuentemente diferente estabilidad. A bajas concentraciones de ciertos desnaturizantes, la disrupción de algunas uniones particularmente susceptibles y esenciales para mantener la proteína en un estado activo, conduce a una pérdida de actividad sin cambios estructurales importantes [Wang et al.1997].

La desnaturalización proteica por efecto de agentes desnaturizantes (urea, GuHCl y tiocianato de guanidinio) fue evaluada en presencia de bajas concentraciones (0,2 mM) del agente reductor 2-ME [Singh and Chang2004]. Los puentes disulfuro presentes en la proteína se rompen y se vuelven a formar de acuerdo con la conformación inducida por el desnaturizante, produciéndose una conversión progresiva de la proteína nativa en un gran número de isómeros. Este proceso de desnaturalización en presencia del agente reductor ocurre a concentraciones menores de desnaturizante. Además, se observó que los puentes disulfuro en la proteína desnaturizada son más susceptibles a la reducción que dichos puentes en estado nativo. En este estudio, las trece proteínas evaluadas mostraron diferente susceptibilidad a la desnaturalización por GuHCl. En comparación, α -trombina humana fue la de menor estabilidad, ya que GuHCl 0,75 mol/L produjo 50% de desnaturalización, mientras que la más estable, BPTI (inhibidor pancreático bovino), requirió GuHCl 7,5 M.

Como conclusión de dichos estudios se puede decir que la mayor estabilidad conformacional exhibida por las proteínas desnaturizadas con GuHCl (sin 2-ME) se debe a que la red de puentes disulfuro no está afectada y por lo tanto, la estructura está preservada. La diferencia en la susceptibilidad de una proteína a la desnaturalización en ausencia y presencia de reductor refleja cuanto ésta depende de una estructura rígida de puentes disulfuro nativos para mantener su estructura [Singh and Chang2004].

En nuestro caso, si bien el uso de agentes reductores y desnaturizantes incrementa la extracción de prolaminas de muestras de alimentos, estos pueden alterar la interacción antígeno/ anticuerpo y conducir a errores en la cuantificación inmunoquímica.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de agentes reductores y desnaturizantes en las distintas etapas del ensayo, empleando diferentes anticuerpos y formatos de ELISA y evaluar las consecuencias de este procedimiento en la certificación de alimentos libres de gluten.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Muestras

1.2.1.1. Preparación de estándar de gliadina

Estándar comercial de gliadinas (Sigma, St Louis MO, USA): Se pesó 1 g de gliadina estándar y se agregó lentamente a 500 ml de etanol 60% en agitación para evitar la formación de agregados. Se filtró primero con papel de filtro y luego con filtro de 0,22 µm. La cuantificación se realizó por Kjeldahl.

Estándar europeo producido por el *European Working Group in Prolamin Analysis and Toxicity* (PWG): se pesó y se disolvió en etanol 60% de forma de obtener una solución de 1 mg/ml.

1.2.1.2. Preparación de extractos etanólicos de harina

Se colocaron 2 g de harina en un tubo de 50 ml y se realizaron 3 lavados con 20 ml de NaCl 0,15 mol/L a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora y uno de 16 horas a 4°C, cada uno seguido por centrifugación a 4500g, 15 minutos a 8°C. Por último se realizó la extracción del pellet con etanol 60% durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante.

De esta manera se prepararon extractos a partir de harina de trigo, cebada, centeno, maíz, arroz y soja, que fueron cuantificados por el método de Kjeldahl.

1.2.1.3. Extracción de muestras de alimentos

La extracción de muestras de alimentos se realizó utilizando etanol 60% solo o adicionado con diferentes concentraciones de 2-mercaptoetanol (2ME) (ICN Biomedicals, Ohio, USA), cloruro de guanidinio (GuHCl) (Biomedicals, Ohio, USA) o ambos. Las muestras fueron homogeneizadas en Omnimixer (Omni International, Waterbury, CT, USA) durante 3 minutos con el solvente en relación 1:10 (300 mg de muestra: 3 ml de solvente), incubadas 40 minutos a 50 °C y centrifugadas 3 minutos a 12000 rpm. Las proteínas totales presentes en estos extractos se cuantificaron mediante dos métodos:

1.2.1.3.1. BCA "protein assay kit" (Pierce, Rockford, USA)

Para eliminar la interferencia en el caso de muestras conteniendo 2-mercaptoetanol las muestras fueron preincubadas con iodoacetato de sodio 50 mM (Sigma, St Louis, MO, USA) durante 15 minutos para bloquear los grupos sulfhidrilo.

1.2.1.3.2. Método de Kjeldahl

Las muestras se digirieron en H₂SO₄ concentrado en presencia de K₂SO₄ y CuSO₄ como catalizador, a 400 °C, hasta que el contenido del tubo quedó con una coloración verde transparente indicando digestión completa. El mismo procedimiento se realizó con la curva estándar, empleando como patrón una solución de SO₄ (NH₄)₂.

El N proveniente de la digestión de proteínas y de la curva estándar se detectó colorimétricamente. Para esto a 50 µl de muestra se adicionaron 150µl de solución A+B en relación 1:1 (A: Na₂HPO₄ 0,2 M, NaOH 0,2 M, tartrato de Na y K 0,36 M, B: NaOH 2,5 M). Luego se agregaron sucesivamente 40 µl de salicilato nitroprusiato, 20 µl de hipoclorito de Na y se agitó 25 minutos. A continuación se agregaron 740 µl de H₂O y se leyó absorbancia a 660 nm. Por comparación con la curva patrón se obtuvo la concentración de N, que se transforma en concentración de proteína aplicando el factor correspondiente a trigo: 5,7 mg proteína/mg N.

1.2.2. Ensayos inmunoquímicos

1.2.2.1. ELISA indirecto

Se inmovilizó gliadina estándar a partir de una solución 1µg/ml en PBS en placas Maxisorp (Nunc) durante 16 hs a 4 °C y se bloqueó con leche descremada 3% en PBS durante 2 horas a 37 °C. A continuación se incubó con la dilución apropiada del anticuerpo anti-gliadinas (mono- o policlonal) 1 hora a 37 °C. Los anticuerpos retenidos en la placa fueron revelados por incubación con el conjugado correspondiente: anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano, HRP (BioRad, Hercul CA, USA) o anti-IgG de ratón HRP (BioRad, Hercul CA, USA). Se reveló con o-fenilendiamina (OPD), deteniendo la reacción a los 15 minutos con H₂SO₄ 4 N. La DO a 492 nm de cada fosa fue leída en un lector de placas. Luego de cada paso se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05% (PBS-T). Las diluciones se hicieron en leche descremada 1% en PBS-T.

1.2.2.2. ELISA competitivo secuencial

Se inmovilizó el estándar de gliadinas diluido en PBS 16 horas a 4°C. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a 37°C. Después de lavar una vez con PBS-T, se bloquearon las placas 2 horas con leche en polvo descremada al 3% en PBS y se lavó nuevamente. Las muestras problema o estándares se incubaron en tubos de 1,5 ml durante 2 horas con la dilución apropiada de anticuerpo (suero de conejo o anticuerpo monoclonal anti-gliadinas) en una relación de volúmenes 1:1. Como diluyente se usó leche en polvo descremada 1% en PBS-T. Estas muestras fueron transferidas a las fosas con antígeno inmovilizado e incubadas durante 30 min. Las placas se lavaron 3 veces y luego se incubó 1 hora con el anticuerpo correspondiente (anti-IgG de conejo HRP o anti-IgG de ratón HRP). Se lavaron nuevamente las placas 3 veces y se agregó el sustrato de la enzima (1 mg/ml

OPD; 1 $\mu\text{l/ml}$ H_2O_2 en buffer citrato pH 5). La reacción se detuvo con H_2SO_4 2M después de 15 minutos y se leyó la absorbancia a 492 nm.

1.2.2.3. ELISA de captura

Las soluciones de bloqueo, lavado y diluyente fueron las mismas que en el ELISA competitivo secuencial. Se inmovilizó el anticuerpo monoclonal correspondiente diluído en PBS en placas maxisorp (Nunc) 16 horas a 4°C. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a 37°C. Después de lavar una vez, se bloquearon las placas 2 horas y se lavó nuevamente. Las muestras o estándares diluídos apropiadamente se transfirieron a las fosas y se incubó una hora. Se lavó 3 veces y se incubó con la dilución apropiada del segundo anticuerpo monoclonal biotinilado. Después de realizar 3 lavados se incubó durante 1 h con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, Skeinheim, Germany). Por último se hicieron 3 lavados con PBS-T y uno con buffer dietanolamina (dietanolamina 1M, 2mM MgCl_2 , pH 9,8) y se agregó el sustrato de la enzima (1 mg/ml p-nitrofenil fosfato en buffer dietanolamina). La reacción se detuvo a los 30 minutos con EDTA 0,1 M y se leyó la absorbancia a 405 nm.

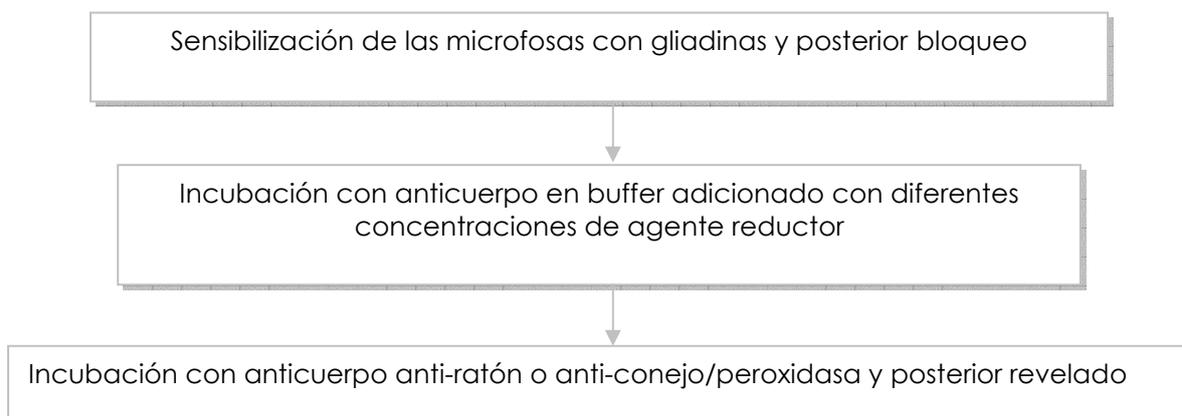
1.3. Resultados

1.3.1. Análisis de la interferencia de agentes reductores en la cuantificación de gliadinas

Como primera aproximación al estudio de la interferencia de aditivos usados para la extracción de gliadinas de muestras de alimentos se comenzó con la evaluación de dos agentes reductores: 2-mercaptoetanol (2-ME) y ditioneitol (DTT).

1.3.1.1. Efecto en la interacción del anticuerpo con el antígeno inmovilizado

Mediante ELISA indirecto se puede evaluar cómo la presencia de 2-ME y DTT afecta la interacción antígeno/anticuerpo. El protocolo seguido se esquematiza debajo. Brevemente, luego de sensibilizar con gliadinas y bloquear, se incuba con el anticuerpo diluido en buffer con reductor. Finalmente, se utiliza un anticuerpo anti-Inmunoglobulinas de ratón o conejo, según corresponda, conjugado con peroxidasa.



En la **Figura 1.1.** , se observa que al aumentar la concentración de reductor por encima de 0,01% en el caso de DTT o 0,05% para 2-ME, se produce una disminución en la reactividad del anticuerpo. Este parece ser un efecto general ya que tanto el anticuerpo monoclonal anti-gliadinas 3B4H1 como el suero de conejo anti-gliadinas mostraron un comportamiento similar.

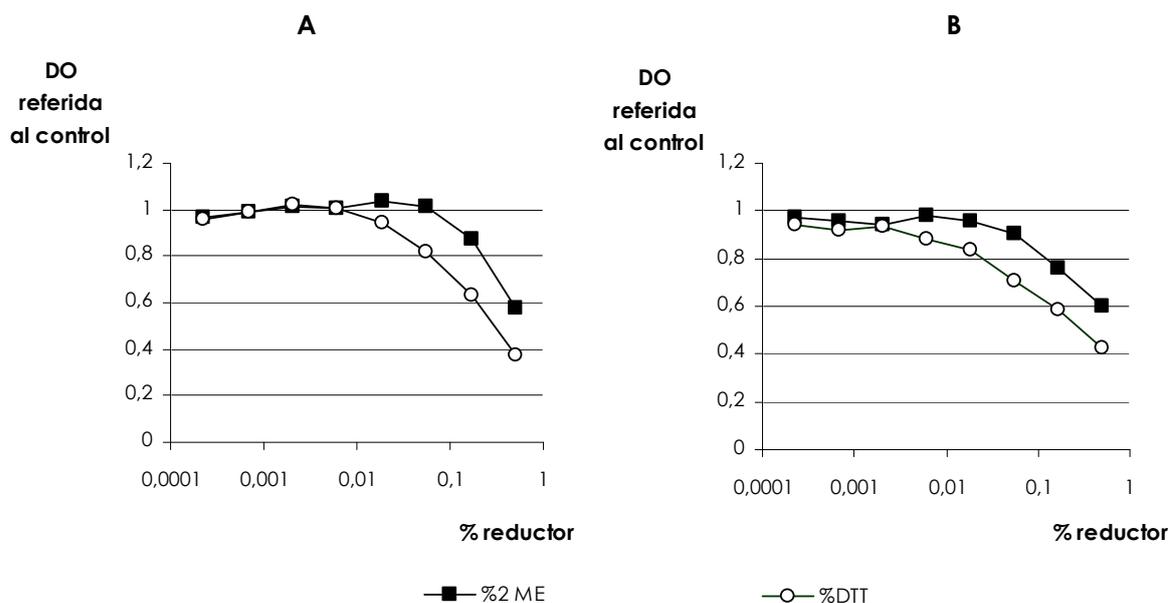
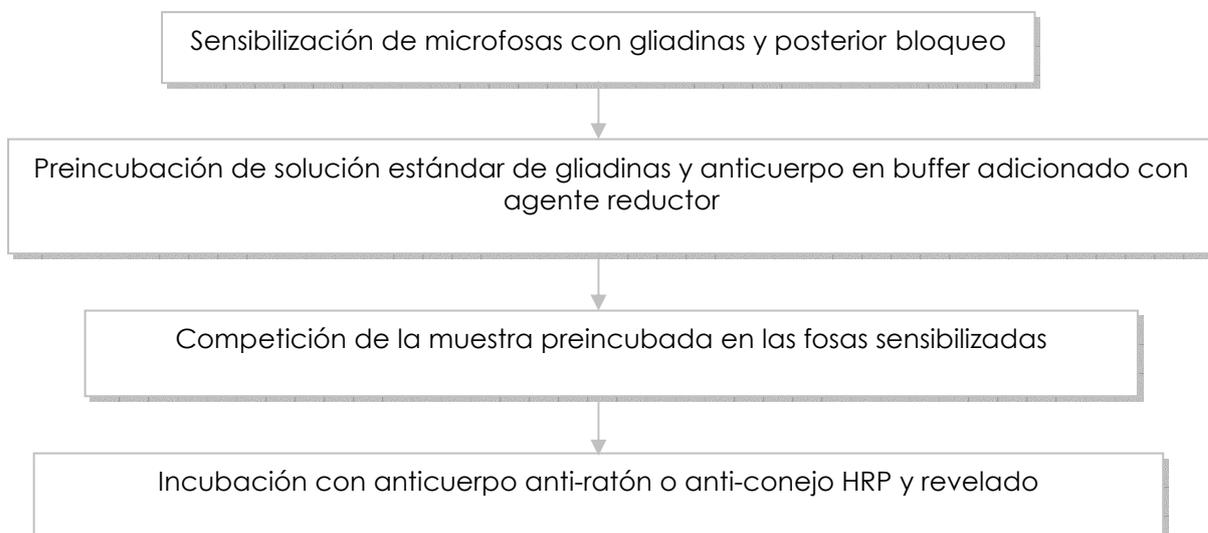


Figura 1.1. Interferencia en la unión del anticuerpo en presencia de 2-ME y DTT. Se evaluó por ELISA indirecto, la unión a gliadina inmobilizada del anticuerpo monoclonal 3B4H1 (A) y de anticuerpos presentes en el suero de conejo anti-gliadinas (B) en buffer conteniendo 2-ME o DTT en el rango de concentraciones entre 0 y 0,5%. Los resultados se expresan como relación de DO referida al control sin reductor.

1.3.1.2. Interferencia de los agentes reductores en ELISA competitivo secuencial

Al afectar la interacción antígeno/anticuerpo es esperable que los agentes reductores conduzcan a errores en la cuantificación inmunoquímica de gliadinas. Para comprobar este efecto, se realizó la cuantificación de gliadinas mediante un ensayo competitivo secuencial, en el cual una muestra de gliadinas estándar se preincubó con el anticuerpo (anticuerpo monoclonal 3B4H1 o suero de conejos anti-gliadinas) en presencia de diferentes concentraciones de 2-ME o DTT, según el siguiente esquema.



Al realizar la cuantificación de las muestras, con ambos anticuerpos, se obtuvieron valores de concentración superiores a los esperados. La magnitud de la sobreestimación es mayor al incrementar la concentración de reductor (**Figura 1.2.**).

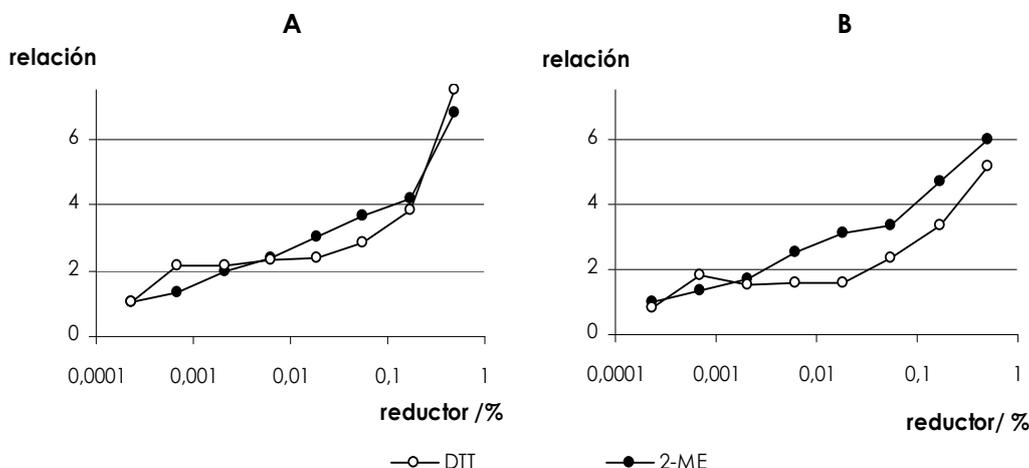
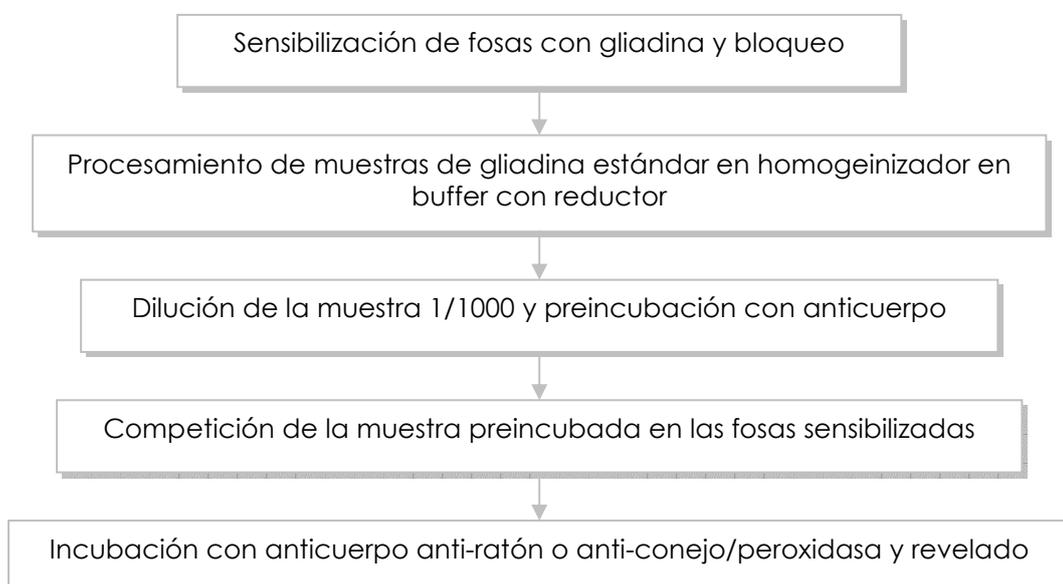


Figura 1.2. Interferencia de 2-ME y DTT. Se preincubaron soluciones de gliadina estándar (10 ng/ml) con el anticuerpo correspondiente en presencia de diferentes concentraciones de 2-ME (0 % – 0,5 %) y DTT (0 – 0,5 %). La concentración de gliadinas se determinó por ELISA competitivo usando el anticuerpo monoclonal 3B4H1 (**A**) o anticuerpos policlonales (**B**).

1.3.1.3. Efecto de diferentes concentraciones de agentes reductores sobre gliadinas

Debido a que los agentes reductores son capaces de alterar la conformación tanto del anticuerpo como del antígeno se decidió estudiar el efecto de los mismos sobre la inmunoreactividad de gliadinas. Para esto se procesaron soluciones de gliadinas estándar (10 µg/ml) en el microhomogeinizador (simulando un proceso de extracción de muestras de alimentos), en presencia de 0, 0,1, 0,5, y 2% de 2-ME o DTT. Previo al análisis por ELISA competitivo, el extracto fue diluido 1000 veces para evitar el efecto de las cantidades residuales de los aditivos sobre el anticuerpo. Se siguió el siguiente esquema.



A pesar de la dilución 1:1000, la concentración de gliadinas determinada en el ensayo fue menor a la esperada sugiriendo que, la exposición del antígeno a 2-ME o DTT durante la extracción, indujo un cambio conformacional que modifica su inmunoreactividad, siendo mayor al aumentar la concentración de aditivo (**Figura 1.3.**).

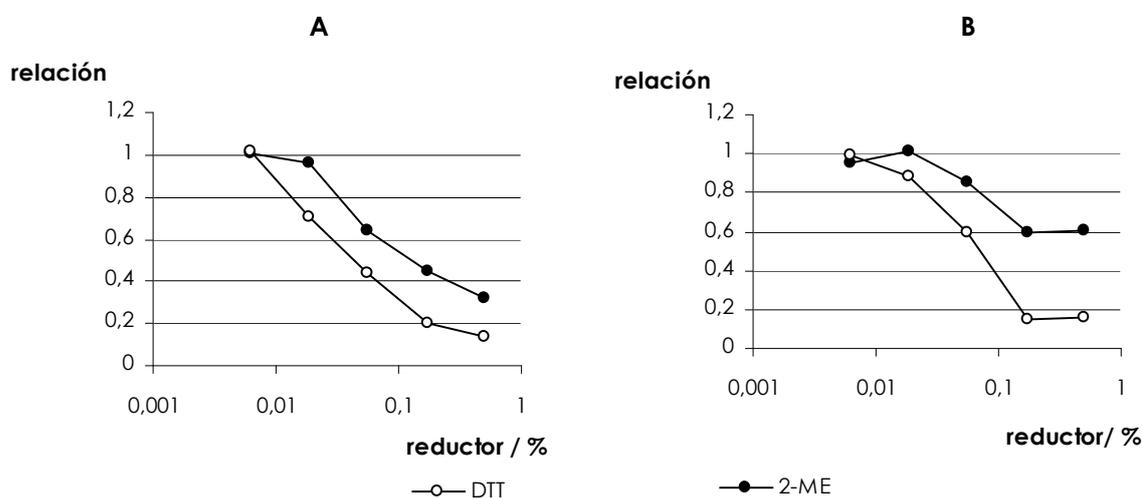


Figura 1.3. Efecto del tratamiento con 2-ME y DTT en la determinación de gliadinas. Se incubaron soluciones de gliadina estándar (10 µg/ml) a 50°C durante 40 minutos en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% – 2%) y DTT (0 – 0,5 %). Luego, cada muestra fue diluída 1000 veces en buffer sin aditivos y la concentración de gliadinas se determinó por ELISA competitivo usando el anticuerpo monoclonal 3B4H1 (**A**) o anticuerpos policlonales (**B**)

1.3.1.4. Uso de agentes reductores en la extracción de muestras de alimentos

Se evaluó el efecto de 2-ME y DTT en la extracción y cuantificación de gliadinas en muestras de alimentos: galletitas y harina de trigo. Estos fueron seleccionados como alimentos modelo ya que corresponden a muestras sometidas o no, respectivamente, a procesamiento y tratamiento térmico, procedimientos que influyen sobre la extractabilidad de las proteínas.

La recuperación de gliadinas de las muestras, evaluada mediante la cuantificación de proteínas en los extractos, se incrementó al doble en el caso de las muestras de galletitas extraídas en presencia de reductor (**Figura 1.4.**). Como resultaba esperable, no se encontraron diferencias relevantes para las muestras de harina, ya que la formación de puentes disulfuro ocurre durante el amasado y la cocción (proceso de manufacturación de las galletitas).

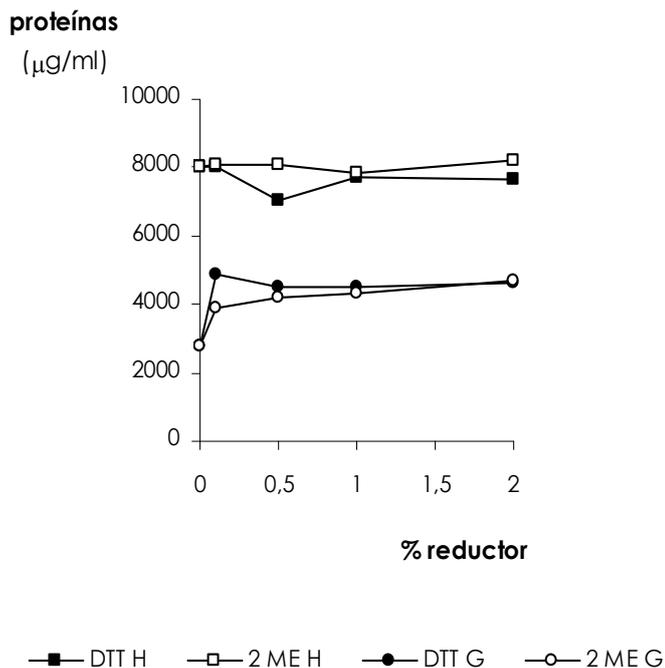


Figura 1.4. Extracción de proteínas a partir de muestras de alimentos. La extracción de gliadinas a partir de muestras de harina (**H**) o galletitas (**G**) se realizó con etanol 60% conteniendo distintas cantidades de 2-ME o DTT. La concentración de proteínas se determinó por microkjeldahl. Los resultados se expresaron como µg de proteína/ml de extracto.

En la cuantificación por ELISA competitivo con ambos anticuerpos (suero de conejos anti-gliadinas y anticuerpo monoclonal 3B4H1), tanto en las muestras de harina como en las de galletitas (aún habiendo incrementado la recuperación de proteínas), la concentración del antígeno resultó menor a la esperada en todos los casos, aún con diluciones 1:5000 o superiores (no mostrado). Este resultado se corresponde con lo observado en la cuantificación de soluciones estándar de gliadinas pretratadas con agentes reductores. En estos casos, nuestra hipótesis es que el antígeno sufriría un cambio conformacional que conlleva a la pérdida del reconocimiento por el anticuerpo.

1.3.2. Análisis del efecto combinado de agentes reductores y desnaturalizantes en la cuantificación de gliadinas

A partir de los resultados mostrados en las secciones previas se decidió extender el estudio y analizar el efecto combinado de agentes reductores y desnaturalizantes, empleando mezclas de diferentes concentraciones de 2-ME y GuHCl. Dichos agentes fueron elegidos ya que forman parte de una mezcla de extracción propuesta que incrementa la recuperación de gliadinas a partir de alimentos [García et al.2005].

1.3.2.1. Efecto en la interacción del anticuerpo con el antígeno inmovilizado

Con el fin de evaluar el efecto de los aditivos (2-ME y GuHCl) sobre la interacción antígeno/anticuerpo se preparó la dilución apropiada del anticuerpo (suero de conejo anti-gliadinas) en buffer conteniendo diferentes combinaciones de 2-ME y GuHCl, y se incubó en placas sensibilizadas con gliadinas para desarrollar un ELISA indirecto. La interferencia fue estimada a partir de la disminución en el valor de la densidad óptica (DO) (**Figura 1.5.**).

La presencia de 0,5% 2-ME causó una reducción en la unión del anticuerpo policlonal, tal como se observó en los estudios preliminares. Para esta muestra, se observó un 60% de la DO comparada con la DO de la muestra sin aditivos. Para una concentración de 2% de 2-ME la disminución llegó al 25% (**Figura 1.5.A.**).

La presencia de GuHCl no afectó la unión a concentraciones inferiores a 0,1 mol/L, pero redujo la unión del anticuerpo al 50% del máximo a concentraciones de 2 mol/L (**Figura 1.5.B.**). En presencia de ambos aditivos juntos la interferencia fue mayor, disminuyendo al 77% para 2-ME 0,1% - GuHCl 0,1 mol/L, y a 27% para 2-ME 0,5% - GuHCl 0,5 mol/L (**Figura 1.5.C.**).

Un análisis similar se realizó para el anticuerpo monoclonal anti-gliadinas 1B4E9 encontrando que la presencia de 2-ME tenía un efecto mayor. La unión del anticuerpo disminuyó a un 17% del máximo para una concentración del 2%, mientras que la presencia GuHCl 0,5 mol/L produjo un leve aumento en la unión (**Figura 1.5.D.**)

La interferencia en la unión específica para la condición: 0,5% 2-ME-0,5 mol/L GuHCl, fue similar para los anticuerpos mono y policlonales, sin embargo, cuando se compara todo el rango de concentraciones el efecto de la interferencia es mayor sobre los anticuerpos monoclonales.

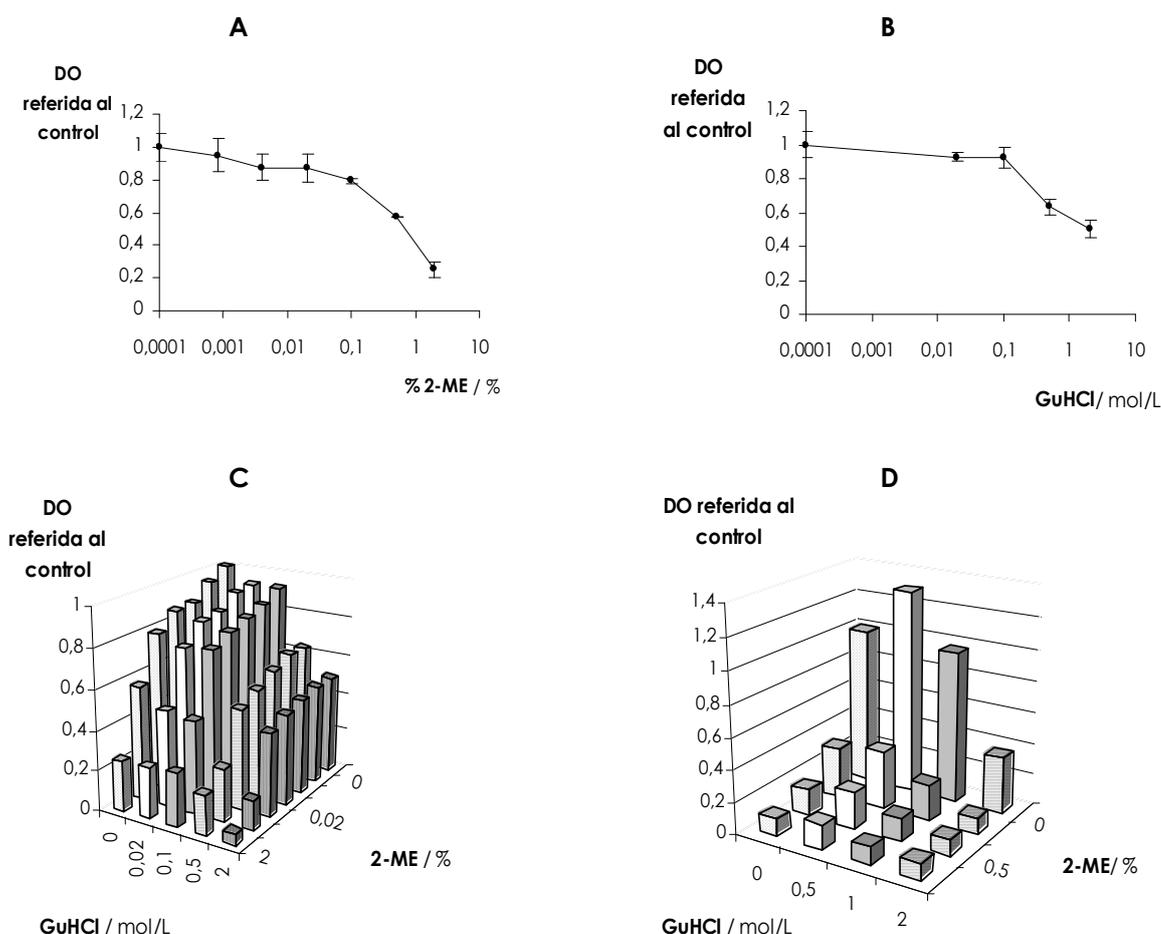


Figura 1.5. Interferencia en la unión del anticuerpo en presencia de 2-ME y GuHCl. Por ELISA indirecto se evaluó la unión del anticuerpo a gliadinas inmobilizadas. La dilución del suero anti-gliadinas se realizó en buffer conteniendo 2-ME en el rango de 0% a 2% (A), en buffer conteniendo GuHCl en el rango de 0 a 2 mol/L (B) o en buffer conteniendo ambos aditivos (C). El anticuerpo monoclonal 1B4E9 se diluyó en buffer con combinaciones similares de 2-ME y GuHCl (D). Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DS de la relación de DO referida a la misma dilución de anticuerpos sin aditivos (relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo.

1.3.2.2. Interferencia en inmunoensayos cuantitativos

Para evaluar el efecto de 2-ME y GuHCl sobre la cuantificación inmunoquímica de gliadinas se prepararon soluciones de gliadina estándar en buffer conteniendo 2-ME, GuHCl o ambos en diferentes concentraciones y se analizaron en dos formatos de ensayo: ELISA competitivo (anticuerpo policlonal) y ELISA de captura (anticuerpo monoclonal).

1.3.2.2.1. ELISA competitivo secuencial

En la etapa de preincubación, la mezcla de una solución estándar de gliadinas (100 ng/ml) y el anticuerpo policlonal a la dilución adecuada, fueron adicionados con 2-ME y GuHCl a distintas concentraciones finales. En la **Figura 1.6.**, se observa que, al comparar con la muestra control (sin agregado de aditivos), 2-ME 2% produjo un incremento de 3 veces en

el resultado obtenido. La presencia de GuHCl, a una concentración de 0,02 mol/L o mayor, causó subestimación en el contenido de gliadinas. Por lo tanto, la adición de estos dos agentes tuvo efectos opuestos.

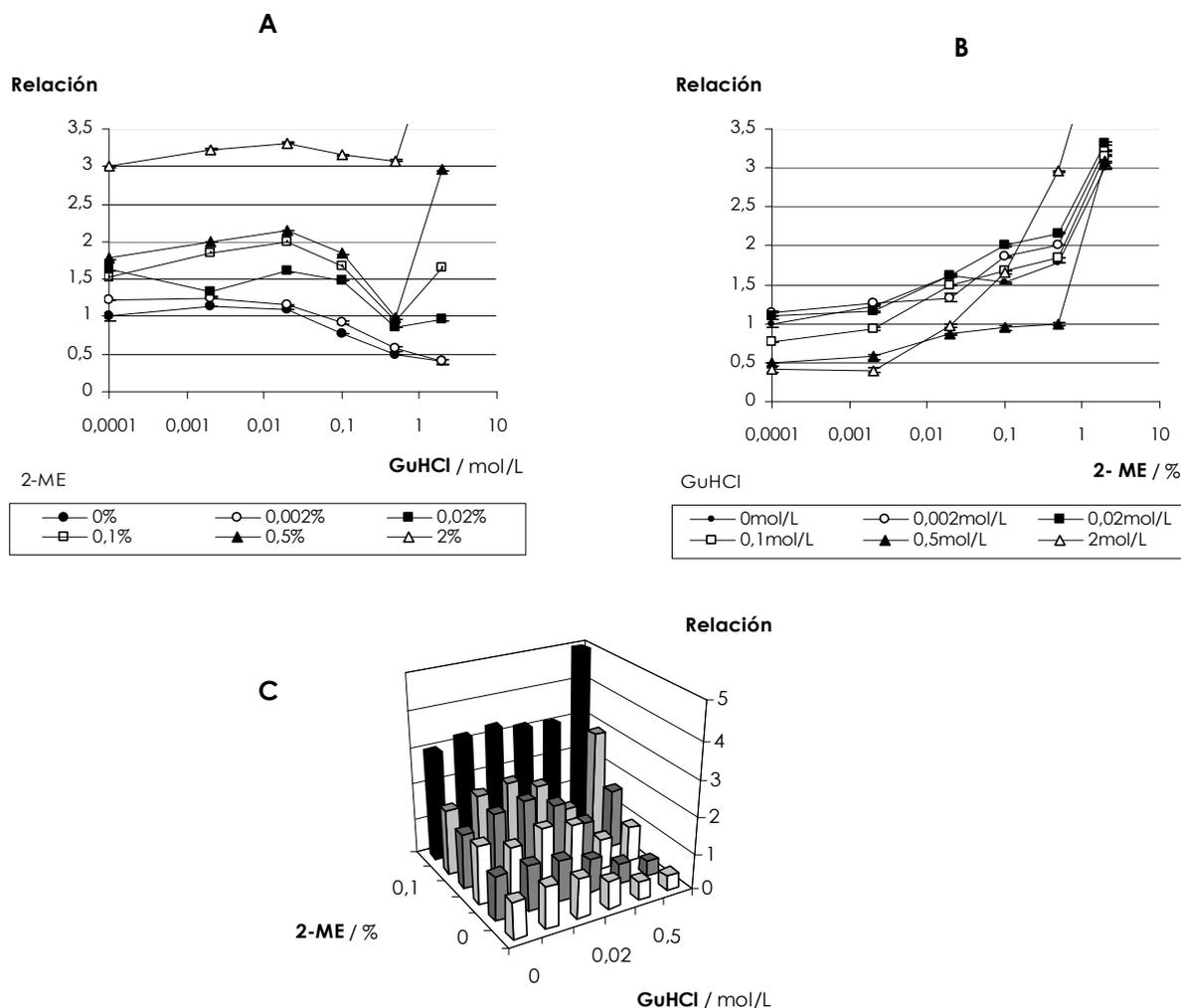


Figure 1. 6. Interferencia de 2-ME y GuHCl en ELISA competitivo con anticuerpos policlonales. Se prepararon soluciones de gliadina estándar (100 ng/ml) en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% – 2%) y GuHCl (0 – 2 mol/L). La concentración de gliadinas se determinó por ELISA competitivo usando anticuerpos policlonales. **(A)** Interferencia de 2-ME (0% – 2%) en presencia de 0 – 2 mol/L GuHCl. **(B)** Interferencia de GuHCl (0 – 2 mol/L) en presencia de 0% – 2% 2-ME. **(C)** Interferencia de diferentes combinaciones de GuHCl y 2-ME. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DS de la relación de concentraciones determinadas, referida al control sin aditivos (Relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo.

La **Figura 1.6.** muestra que existen efectos positivos y negativos en los resultados medidos y que, en especial, existen ciertas condiciones donde se observa un balance entre dichos efectos, conduciendo a un resultado similar al valor esperado pero artificial.

1.3.2.2.2. ELISA de captura

1.3.2.2.2.1. Optimización de ELISAs de captura con anticuerpos monoclonales

Con el fin de evaluar si existe un patrón general para la interferencia generada por los agentes desnaturizantes, se decidió estudiar su efecto sobre distintos anticuerpos monoclonales en ELISA de captura.

Para esto, se probaron los tres anticuerpos monoclonales anti-gliadinas obtenidos previamente en nuestro laboratorio (1B4E9, 2A1C4 y 3B4H1) en todas las combinaciones posibles (empleando uno como anticuerpo de captura y otro como anticuerpo de detección) para generar un ensayo. La biotinylación de los anticuerpos permitió el uso del sistema estreptavidina-biotina para amplificar la señal.

Luego de seleccionar los pares de anticuerpos capaces de producir una diferencia significativa de señal entre una muestra de gliadinas estándar y el blanco, se construyeron las curvas de calibración correspondientes. Los pares que produjeron las mejores curvas dosis/respuesta en cuanto a rango de aplicación y sensibilidad fueron: 1B4E9/2A1C4 biotinilado y 3B4H1/1B4E9 biotinilado. Los límites de detección obtenidos fueron 1 ng/ml y 20 ng/ml, respectivamente ($t=0,99$).

1.3.2.2.2.2. Análisis de interferencia

De manera similar a la descrita anteriormente para ELISA competitivo, se evaluó la interferencia de 2-ME y GuHCl en la cuantificación de una muestra testigo de gliadinas con los ensayos de captura optimizados (**Figura 1.7.**). Empleando el par de anticuerpos 3B4H1/1B4E9 biotinilado, se observó que las muestras testigo de gliadinas diluídas en 2-ME 0,1%, dieron un valor de concentración correspondiente al 40% del valor esperado. Para concentraciones de 2-ME mayores a 0,5%, el antígeno fue indetectable (**Figura 1.7.A.**). Cuando se evaluó la interferencia por GuHCl, se observó que a concentraciones menores a 0,5 mol/L no hubo un efecto apreciable mientras que la concentración medida de la solución testigo de gliadinas fue el 50% del valor real cuando se incubó con 2 mol/L GuHCl (**Figura 1.7.B.**). Finalmente, cuando ambos agentes estuvieron combinados en la condición 0,5% 2-ME – 0.5 mol/L GuHCl, la concentración medida de la solución testigo de gliadinas fue el 5% del valor real (**Figura 1.7.C.**).

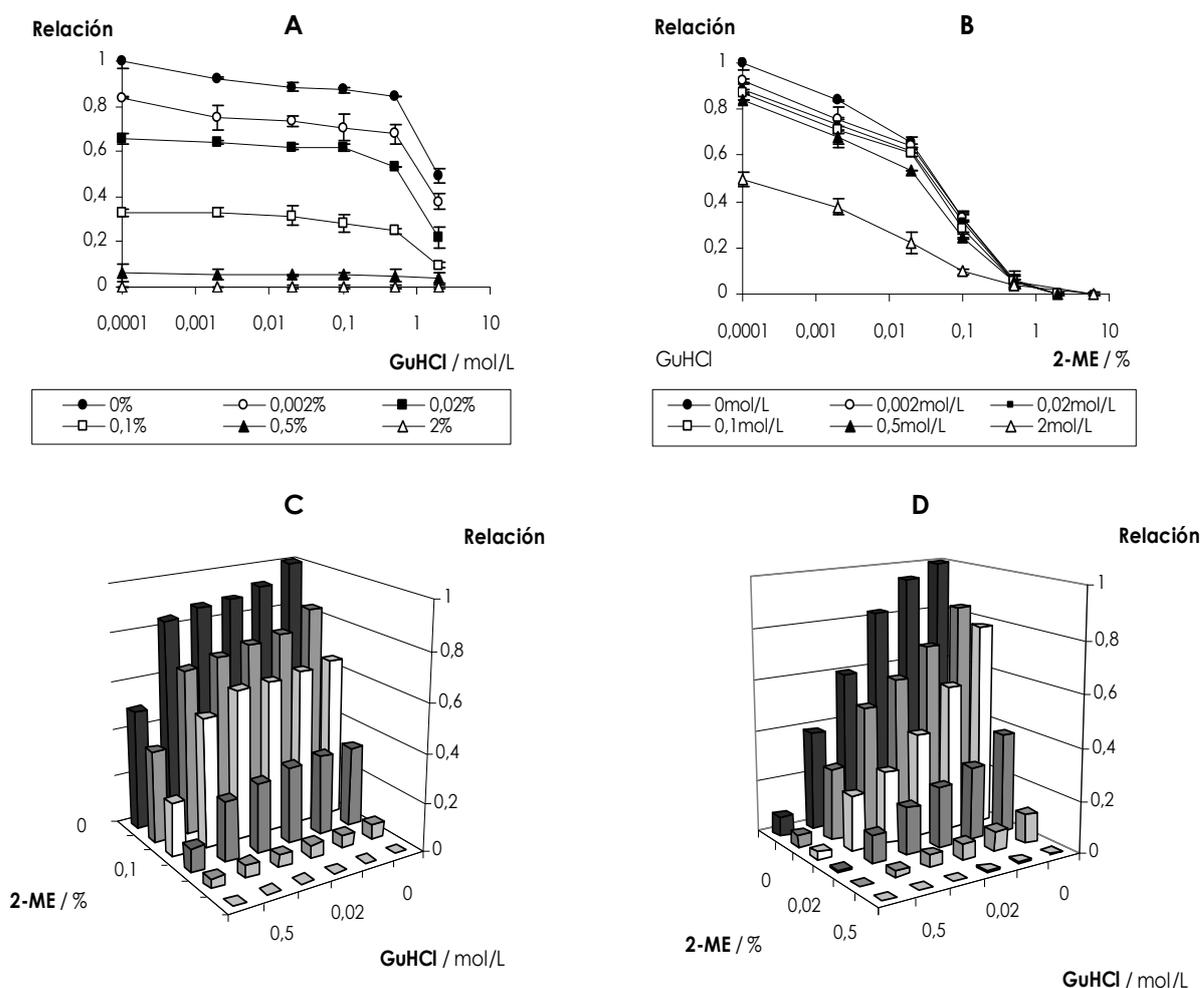


Figure 1.7. Interferencia de 2-ME y GuHCl en ELISA de captura con anticuerpos monoclonales. Se prepararon soluciones de gliadina estándar (500 ng/ml) en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% - 2%) y GuHCl (0 - 2 mol/L). La concentración de gliadinas se determinó por ELISA de captura usando los anticuerpos monoclonales 3B4H1 como captura y 1B4E9 como anticuerpo secundario. **(A)** Interferencia de 2-ME (0% - 2%) en presencia de 0 - 2 mol/L GuHCl. **(B)** Interferencia de GuHCl (0 - 2 mol/L) en presencia de 0% - 2% 2-ME. **(C)** Interferencia de diferentes combinaciones de GuHCl y 2-ME. **(D)** Análisis equivalente usando 1B4E9 como captura y 2A1C4 como anticuerpo secundario. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DS de la relación de concentraciones determinadas, referida al control sin aditivos (Relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo.

Los resultados obtenidos al evaluar la interferencia de 2-ME fueron similares cuando el ELISA de captura se realizó con otro par de anticuerpos monoclonales (1B4E9/2A1C4 biotinilado), aunque el efecto de GuHCl fue más pronunciado. Al medir la concentración de gliadinas en presencia de GuHCl 0,5 mol/L la concentración fue el 40% del valor esperado. La concentración de la solución testigo medida en presencia de ambos agentes (0,5% 2-ME - 0,5 mol/L GuHCl) fue el 2% del valor esperado **(Figura 1.7.D.)**.

Aunque se observaron algunas variaciones en la magnitud de la interferencia para los diferentes pares de anticuerpos monoclonales, el ELISA de captura subestimó la concentración de gliadinas estándar en todas las combinaciones probadas de 2-ME y GuHCl.

1.3.2.3. Efecto de diferentes concentraciones de agentes reductores y desnaturalizantes sobre la detección de gliadinas

Para estudiar el efecto de los agentes reductores y desnaturalizantes sobre la conformación del antígeno, y consecuentemente sobre la interacción antígeno/anticuerpo, se emplearon soluciones de gliadinas estándar como modelo de muestras de alimentos. Con este fin, dichas soluciones se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de 2-ME, GuHCl o ambos, durante 40 minutos a 50 °C según el protocolo de extracción sugerido por García et al. [García et al.2005]. Para evitar algún efecto de concentraciones residuales de los agentes desnaturalizantes sobre la unión específica del anticuerpo, las muestras fueron diluídas 1000 veces previo al análisis por ELISA.

1.3.2.3.1. ELISA competitivo secuencial

Como se observa en la **Figura 1.8**, el tratamiento de las muestras testigo de gliadinas con 2-ME a concentraciones mayores a 0,02%, produjo una reducción severa en el reconocimiento del antígeno por los anticuerpos policlonales en ELISA competitivo **(B)**.

Mientras que las muestras tratadas con GuHCl no presentaron diferencias apreciables comparadas con los controles **(A)**, el agregado de 2-ME, en combinación con GuHCl, provocó una reducción importante en la detección **(C)**.

Se desea destacar que cuando la solución testigo de gliadinas se incubó en presencia de 2-ME 2% y GuHCl 2 mol/L (condiciones propuestas para el solvente de extracción) la concentración determinada, fue el 30% del valor esperado.

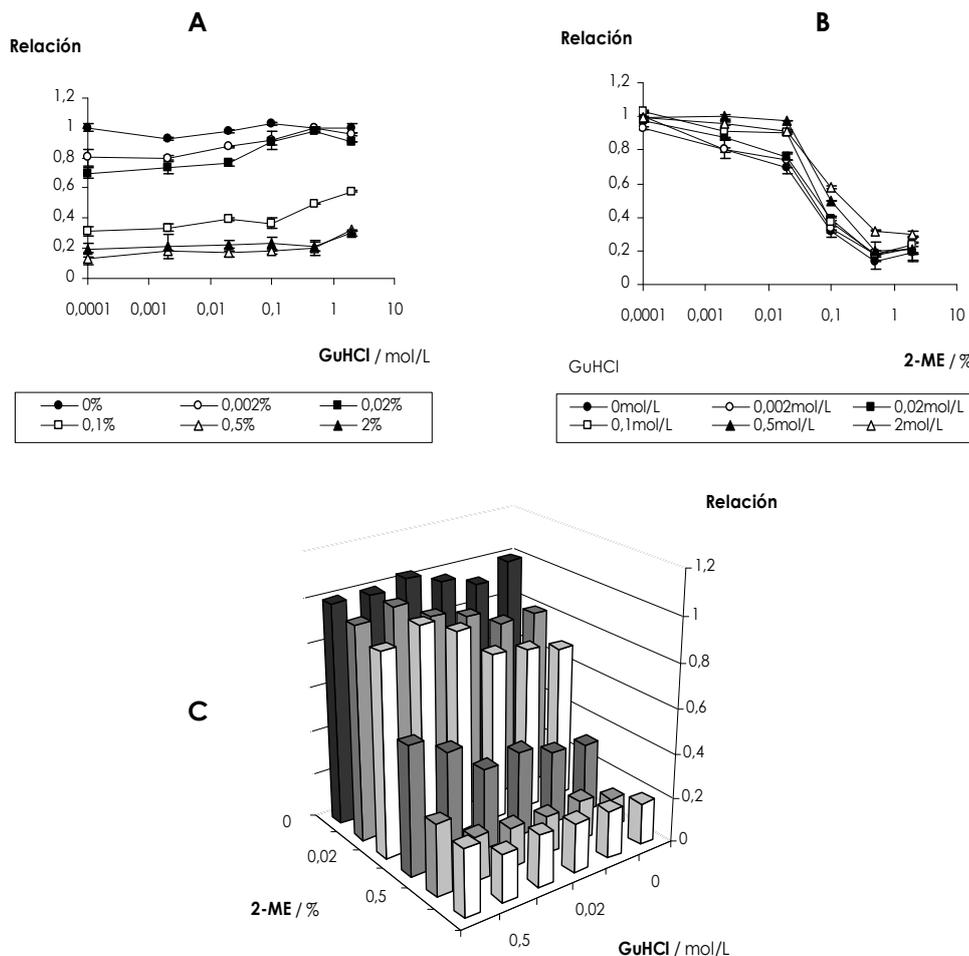


Figura 1.8. Efecto del tratamiento con 2-ME y GuHCl en la determinación de gliadinas por ELISA competitivo con anticuerpos policlonales. Se incubaron soluciones de gliadinas estándar (100 µg/ml) a 50 °C durante 40 minutos en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% – 2%) y GuHCl (0 – 2 mol/L). Luego, cada muestra fue diluída 1000 veces en buffer sin aditivos y la concentración de gliadinas se determinó por ELISA competitivo usando anticuerpos policlonales. **(A)** Efecto de 2-ME (0% – 2%) en presencia de 0 – 2 mol/L GuHCl. **(B)** Efecto de GuHCl (0 – 2 mol/L) en presencia de 0% – 2% 2-ME. **(C)** Efecto de diferentes combinaciones de GuHCl y 2-ME. Los resultados se expresan como el valor promedio ± DS de la relación de concentraciones determinadas, referida al control sin aditivos (Relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo.

1.3.2.3.2. ELISA de captura

Mediante ELISA de captura empleando los pares de anticuerpos 3B4H1/1B4E9 biotinilado (**Figura 1.9. A, B y C**) y 1B4E9/2A1C4 biotinilado (**Figura 1.9. D, E y F**), se evidenció que el tratamiento de las muestras testigo de gliadinas con 0,02% 2-ME (solo o combinado con GuHCl), es suficiente para impedir el reconocimiento del antígeno. En el ensayo de cuantificación, el antígeno fue indetectable.

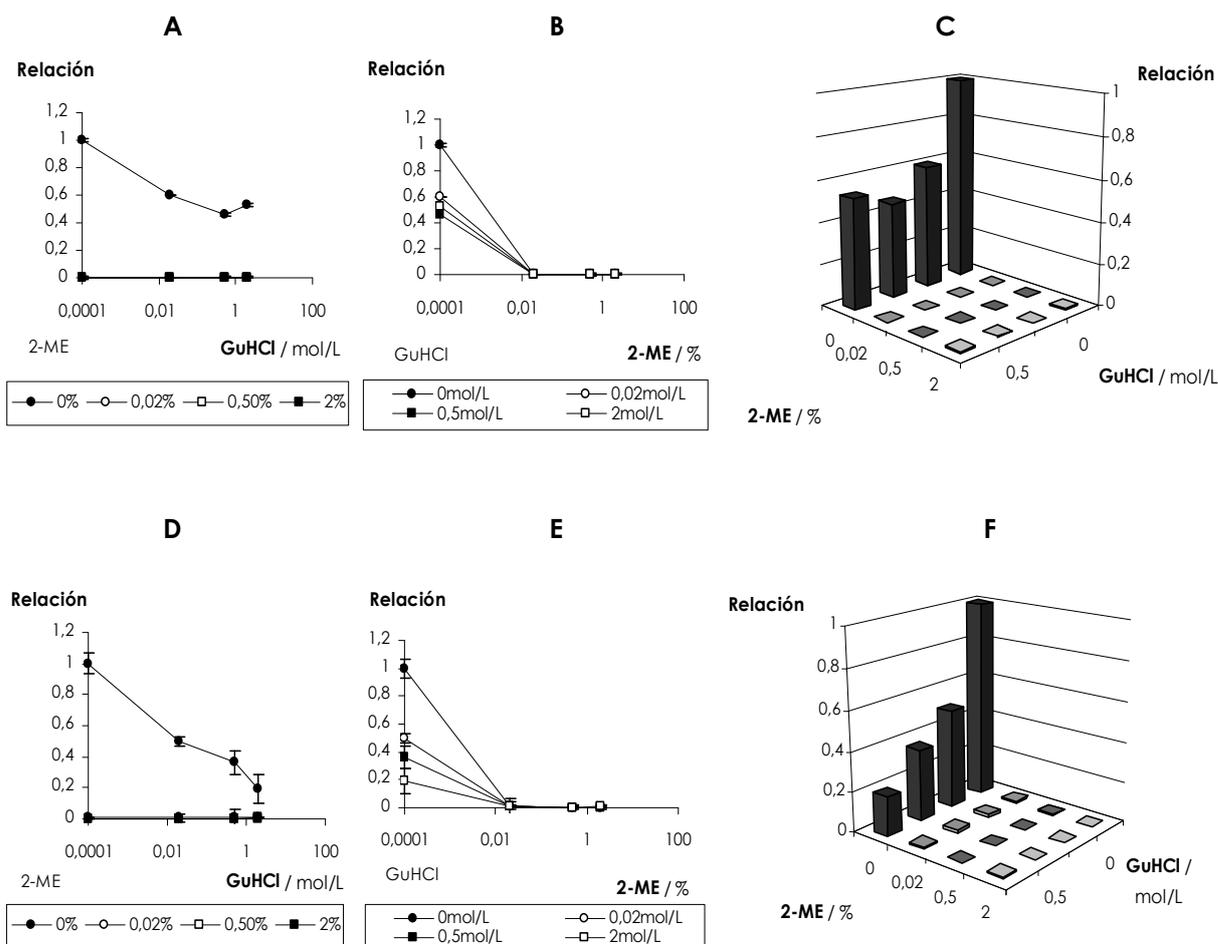


Figura 1.9. Efecto del tratamiento con 2-ME y GuHCl en la determinación de gliadinas por ELISA de captura con anticuerpos monoclonales. Se incubaron soluciones de gliadinas estándar (500 µg/ml) a 50°C durante 40 minutos en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% – 2%) y GuHCl (0 – 2 mol/L). Luego, cada muestra fue diluída 1000 veces en buffer sin aditivos y la concentración de gliadinas se determinó por ELISA de captura usando los anticuerpos monoclonales 3B4H1 como captura y 1B4E9 como anticuerpo secundario. **(A)** Efecto de GuHCl (0 – 2 mol/L) en presencia de 0% – 2% 2-ME. **(B)** Efecto de 2-ME (0% – 2%) en presencia de 0 – 2 mol/L GuHCl. **(C)** Efecto de diferentes combinaciones de GuHCl y 2-ME. **(D, E y F).** Análisis equivalente usando 1B4E9 como captura y 2A1C4 como anticuerpo secundario. Los resultados se expresan como el valor promedio ± DS de la relación de concentraciones determinadas, referida al control sin aditivos (Relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo.

1.3.2.4. Uso de agentes reductores y desnaturalizantes en el procedimiento de extracción

El uso de 2-ME y GuHCl en la extracción de prolaminas se investigó usando los sistemas modelo de galletitas y harina de trigo ya mencionados. Las muestras fueron extraídas con etanol 60% (procedimiento convencional) o con etanol adicionado de 2-ME 2%, GuHCl 2 mol/L o ambos combinados. Como se procedió en ensayos anteriores, se realizó una dilución 1:1000 de las muestras tratadas, previo al análisis por ELISA, para evitar efectos directos de estos agentes sobre la interacción antígeno/anticuerpo. En paralelo, se determinó también la concentración de proteínas totales para evaluar la recuperación de proteínas en cada condición **(Figura 1.10.)**

Comparando con los resultados obtenidos con etanol solo, la extracción de harina con el agregado de GuHCl produjo un incremento en la recuperación proteica. Este resultado correlaciona con los valores de concentración determinados por ELISA competitivo, pero no con los obtenidos por ELISA de captura. De manera similar, los extractos de galletitas obtenidos con GuHCl mostraron un pequeño incremento en la concentración de proteínas.

En cambio, la extracción con 2-ME produjo un aumento menor en la recuperación proteica en las muestras de galletitas, y no se observaron diferencias en las muestras de harina. Es de destacar que en estas condiciones, el antígeno fue casi indetectable en ambos formatos de ELISA.

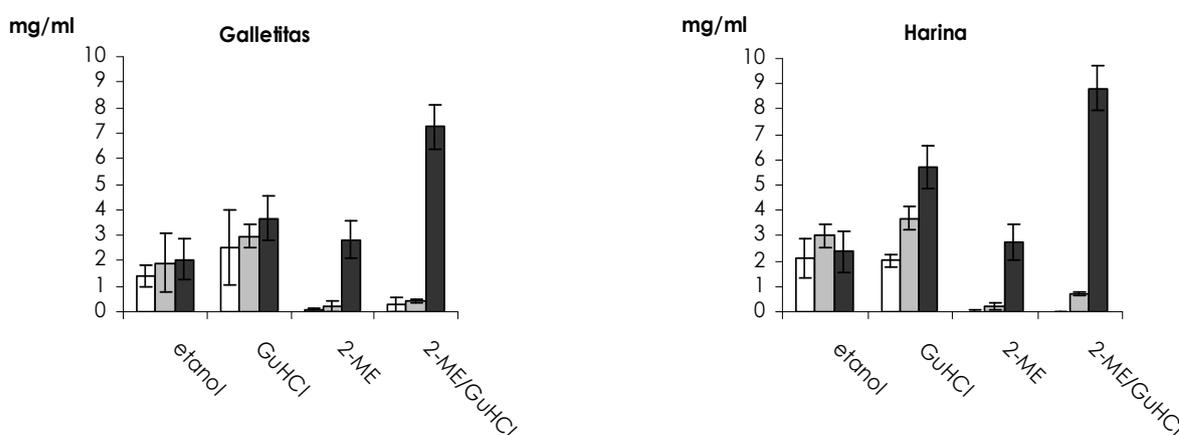


Figura 1.10. Determinación de gliadinas en extractos de muestras modelo obtenidos con buffer conteniendo 2-ME y GuHCl. Se realizó la extracción de muestras de galletitas y harina de trigo con etanol 60% solo o con el agregado de 2-ME, GuHCl o ambos. Los histogramas corresponden a la concentración de proteínas totales (negro), concentración de gliadinas determinada mediante ELISA competitivo con anticuerpos policlonales (gris) o ELISA de captura con anticuerpos monoclonales (blanco). Se muestra el valor promedio \pm DS de duplicados de un experimento representativo.

Cuando la extracción de gliadinas de galletitas y harina de trigo se realizó con 2-ME y GuHCl, se observó un incremento importante en la recuperación proteica. Sin embargo, la detección inmunoquímica con los dos tipos de ELISA se alteró severamente. Por lo tanto, a pesar que el uso de aditivos (2-ME y GuHCl) permite incrementar la eficiencia de la extracción, la interferencia producida en el análisis inmunoquímico conduce a la subestimación del contenido de gliadinas. En particular, debe destacarse que el antígeno fue casi indetectable usando ELISA de captura con anticuerpos monoclonales (formato usado en los ensayos comerciales).

1.4. Discusión

Como ya ha sido mencionado, el tratamiento de la Enfermedad Celíaca requiere la adherencia estricta a una Dieta Libre de Gluten durante toda la vida. De esta manera se revierten los síntomas, las alteraciones histológicas y se evitan las complicaciones a largo plazo. Para que esto sea posible es necesario que todos los productos destinados a los pacientes celíacos sean certificados en su contenido de gliadinas, comúnmente mediante técnicas de ELISA.

Previo a la determinación analítica, las proteínas deben ser extraídas de la matriz del alimento, procedimiento que se ha realizado convencionalmente con etanol 60%. Como la recuperación de proteínas es incompleta, en especial en alimentos procesados y tratados térmicamente, se ha propuesto la adición de agentes reductores y desnaturalizantes para mejorar la eficiencia de extracción.

Nuestro trabajo exploró el efecto que producen dichos aditivos en el ensayo inmunoquímico y en especial, si estos afectan la determinación cuantitativa de gliadinas. Inicialmente se estudió el efecto de los agentes reductores 2-ME y DTT sobre la interacción antígeno/anticuerpo. De acuerdo a lo previsto, estos agentes interfirieron en la unión específica de los anticuerpos ensayados, tanto poli- como monoclonales, a gliadinas inmovilizadas en fase sólida. Además, se comprobó que la presencia de reductores conducía a errores en la estimación de la concentración de gliadinas estándar y que la magnitud y el sentido del error dependían del formato del ensayo y de los anticuerpos empleados. La interferencia también fue observada en el análisis de muestras modelo de harina y galletitas que presentan un alto contenido de gliadinas.

A partir de los resultados obtenidos con agentes reductores, se decidió extender el estudio al uso combinado de agentes reductores y desnaturalizantes, en particular, 2-ME y GuHCl. La combinación 2-ME 2% y GuHCl 2 M fue propuesta por García et al., [García et al.2005] y actualmente forma parte del ensayo comercial de uso más difundido para la determinación del contenido de gliadinas en muestras de alimentos. Los estudios aquí desarrollados se enfocaron en evaluar el efecto que 2-ME y GuHCl tienen sobre la interacción antígeno/anticuerpo y como consecuencia, en las modificaciones que producen sobre las distintas etapas del análisis inmunoquímico y en la eficiencia global del ensayo cuantitativo.

Hemos observado que los anticuerpos evaluados, tanto monoclonales como policlonales pierden actividad al ser expuestos a agentes reductores y desnaturalizantes. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por Wang et al. [Wang et al.1997], quienes observaron que un anticuerpo monoclonal fue desnaturalizado completamente al incubarse con una solución de GuHCl 3,5 mol/L, mientras que pierde el 50% de su actividad biológica en GuHCl 0,18 mol/L. Estudios similares han sido realizados sobre varios sistemas enzimáticos, donde también se observó que la pérdida de actividad biológica (debido a

una mayor susceptibilidad del sitio activo) ocurre a una concentración mucho menor que la requerida para el desplegamiento de la proteína.

En el sistema analizado en este trabajo, los anticuerpos policlonales mostraron ser más resistentes a la desnaturalización, perdiendo el 50% de actividad en presencia de GuHCl 2 mol/L. En los anticuerpos monoclonales, la actividad biológica se redujo al 36%. Además, la incubación de GuHCl en presencia del agente reductor 2-ME, condujo a que la pérdida de actividad ocurra a una concentración menor de desnaturalizante. El anticuerpo policlonal anti-gliadinas redujo su actividad al 63% en presencia de GuHCl 0,5 mol/L, pero cayó al 27% cuando se le adicionó 2-ME 0,5%. Para el anticuerpo monoclonal estudiado (1B4E9) la disminución de actividad fue mucho más marcada (**Figura 1.3.**)

Resultados similares fueron descritos por Singh et al. [Singh and Chang2004] quienes postularon que la red de puentes disulfuro estabiliza la proteína preservando su estructura, y que la susceptibilidad a la desnaturalización, en presencia de reductor, depende de la importancia de estas uniones para mantener la conformación nativa en cada proteína en particular.

Si las muestras de alimentos son extraídas en presencia de agentes reductores y desnaturalizantes, éstas deberían ser diluídas previo al contacto con el anticuerpo, para asegurar que dichos agentes no modifiquen su capacidad de reconocimiento.

Se estudiaron además las consecuencias que tiene el uso de estos aditivos sobre el antígeno, en nuestro caso, una mezcla compleja de proteínas homólogas. Encontramos que el procedimiento de extracción con 2-ME y GuHCl conduce a una alteración en el reconocimiento aún en muestras diluídas, donde las cantidades residuales de agentes reductores y desnaturalizantes no afectan la actividad de los anticuerpos. Este resultado pone en evidencia que durante el procedimiento de extracción las proteínas sufren un cambio conformacional detectable inmunológicamente.

La extracción en presencia de GuHCl produce un aumento en la unión de los anticuerpos policlonales al antígeno durante la etapa de preincubación en ELISA competitivo conduciendo a una sobreestimación de la concentración. Probablemente esto se deba a que el desplegamiento de la proteína expone un mayor número de epitopes disponibles para interactuar con los anticuerpos. Sin embargo, la incubación con 2-ME produjo una alteración tan marcada en la conformación proteica que el reconocimiento resultó francamente disminuído (**Figura 1.6.**)

Un resultado similar, pero con un efecto más importante, se observó al determinar la concentración de gliadinas mediante ELISA de captura con anticuerpos monoclonales (tanto con el par 3B4H1/1B4E9 como con 1B4E9/2A1C4) en muestras sometidas a los mismos tratamientos (**Figura 1.7.**). La extracción con GuHCl condujo a una disminución del reconocimiento antigénico, haciéndose casi indetectable al agregar además 2-ME. Esto probablemente se deba a que este formato de ensayo presenta un requerimiento más estricto en cuanto al mantenimiento de la estructura nativa del antígeno.

Teniendo en cuenta que 2-ME y GuHCl afectan la conformación proteica tanto la actividad biológica de los anticuerpos (su paratope) como del antígeno (epitopes) pueden ser alteradas. En consecuencia, la interacción antígeno/anticuerpo se verá modificada y por consiguiente, se alterarán los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo.

En nuestro caso, la estimación del contenido de gliadinas por comparación con el contenido real de la muestra estándar testigo, fue muy diferente al emplear ELISA competitivo o de captura. Los esquemas de las **Figuras 1.11.** y **1.12.** ilustran como la presencia de estos agentes conduce a diferentes grados de interferencia en cada caso.

En el caso del **ELISA competitivo**, se puede observar sub- o sobreestimación por interferencia a dos niveles diferentes (**Figura 1.11.**).

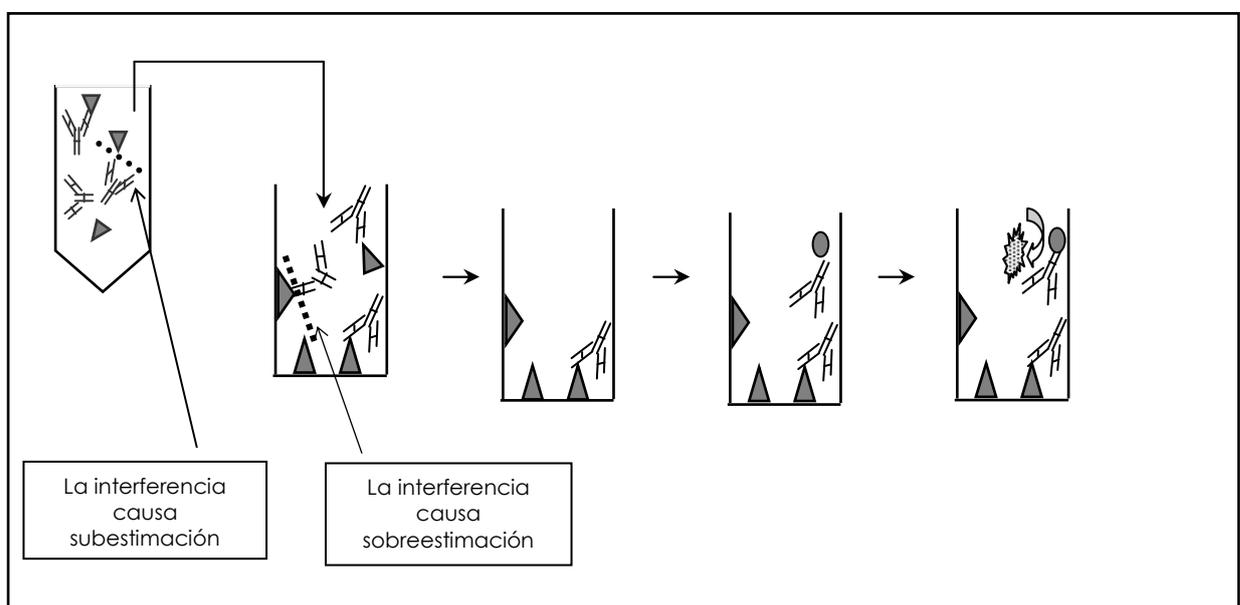


Figura 1.11. Interferencia de agentes reductores y desnaturalizantes en ELISA competitivo.

- Si la interferencia ocurre principalmente durante la formación del inmunocomplejo en fase soluble (en el paso de preincubación), entonces quedarán más moléculas de anticuerpo libres para unirse a la fosa sensibilizada con gliadinas, dando una señal más alta que la esperada y reportando una menor concentración de antígeno. Por lo tanto, en este caso se observaría subestimación.

- Por el contrario, si la interferencia ocurre principalmente en la etapa de unión del anticuerpo al antígeno en fase sólida, la señal será menor que la esperada, reportando una concentración más alta, y por lo tanto, el valor informado sería una sobreestimación.

La composición del solvente de extracción y el factor de dilución empleado para el análisis de la muestra determinarán el grado de desnaturalización del antígeno y la reactividad del anticuerpo, y por consiguiente también influenciarán el resultado final obtenido en la cuantificación.

Cuando se analiza el efecto sobre el **ELISA de captura** se observa que tanto la desnaturalización del antígeno, y consecuentemente la pérdida del reconocimiento por los anticuerpos específicos, como la interferencia en la unión antígeno/anticuerpo (debido a la desnaturalización del anticuerpo), contribuyen a subestimar la concentración de gliadinas **(Figura 1.12.)**

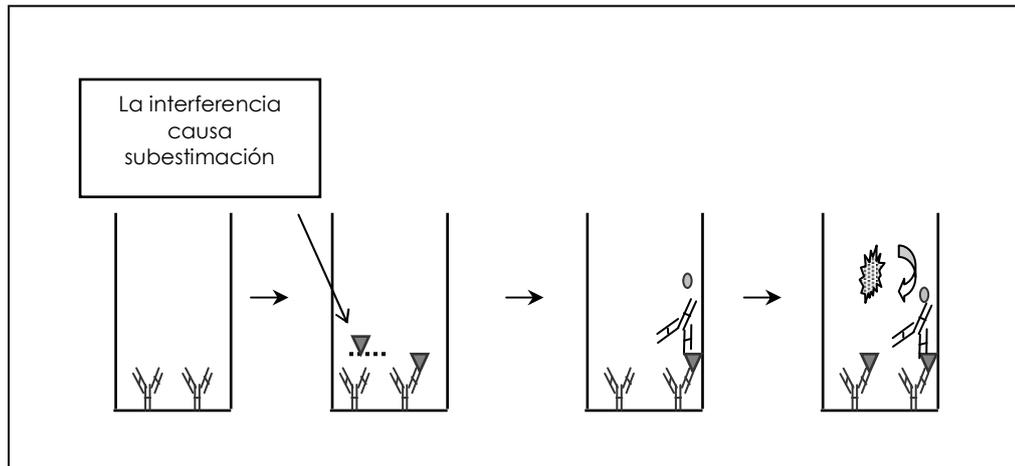


Figura 1.12. Interferencia de agentes reductores y desnaturalizantes en ELISA de captura.

Como consecuencia, aunque la inclusión de 2-ME 2% y GuHCl 2M en el procedimiento de extracción produce un incremento en la recuperación de gliadinas del alimento, sobre todo en productos procesados y sometidos a tratamiento térmico, la concentración determinada por ELISA es distinta a la obtenida cuando se utiliza el solvente convencional (etanol 60%).

La incertidumbre en la concentración de gliadinas detectada es consecuencia de diferentes efectos que se combinan dando como resultado una estimación falsa:

- a. el reconocimiento por anticuerpos específicos de gliadinas parcial o totalmente desnaturalizada puede estar severamente alterado.
- b. cantidades residuales de agentes reductores y desnaturalizantes alteran la interacción antígeno/ anticuerpo.
- c. como los resultados cuantitativos son obtenidos mediante la comparación con una curva de calibración usando un antígeno nativo no se produce una interacción antígeno/anticuerpo equivalente entre las gliadinas obtenidas en la extracción de la muestra y las gliadinas estándar (de la curva de calibración).

La magnitud de la interferencia depende entonces de los anticuerpos, del formato de ELISA y de la dilución a la que la muestra es analizada.

Además, debe tenerse en cuenta que el objetivo esencial es detectar el antígeno en productos en los cuales las gliadinas pueden encontrarse en muy bajas concentraciones (aquellos que han sido preparados especialmente como libres de gluten). Si la muestra se diluye lo suficiente como para eliminar el efecto de cantidades residuales de aditivos sobre la interacción antígeno/anticuerpo, veríamos sumamente reducida la capacidad de detección. Esto indefectiblemente conduciría a informar como contenido de gliadinas no detectable productos que en realidad presentan bajo contenido de gliadinas.

Estas consideraciones son relevantes a la hora de obtener resultados confiables en la certificación de alimentos libres de gluten. Como fue mencionado, si bien no existen resultados definitivos, es claro que la ingesta de bajas cantidades de gliadinas es suficiente para inducir alteraciones histológicas en pacientes celíacos. La posibilidad de seguir una estricta dieta libre de proteínas nocivas, único tratamiento efectivo, depende en primer lugar de la confiabilidad de los métodos de certificación de los productos destinados a pacientes celíacos.

1.5. Conclusión

El uso de 2-ME y GuHCl como aditivos en el procedimiento de extracción de prolaminas a partir de muestras procesadas aumenta la recuperación, especialmente en productos sometidos a tratamiento térmico. Sin embargo estos agentes interfieren en la cuantificación por métodos inmunoquímicos conduciendo a errores.

La interferencia es consecuencia de la alteración producida en la conformación del antígeno y del anticuerpo, y por consiguiente en su interacción.

La magnitud y el sentido del error en la concentración medida dependen del anticuerpo, el formato de ELISA, la concentración de aditivos en la extracción y la dilución de la muestra.

El empleo de agentes reductores y desnaturalizantes en métodos inmunoquímicos cuantitativos requiere una evaluación detallada del impacto que produce la desnaturalización del antígeno y del anticuerpo en la eficiencia analítica del ensayo.

1.6. Perspectivas

Debido a la incertidumbre en los resultados obtenidos en la cuantificación inmunoquímica cuando ésta se realiza luego de extraer la muestra con agentes reductores y desnaturalizantes, resulta imprescindible estudiar el comportamiento analítico del método. Como hemos demostrado en este trabajo el agregado de estos agentes conduce a resultados incorrectos en cuanto al contenido de gliadinas y por lo tanto, a errores en la certificación de alimentos libres de gluten.

Aunque las conclusiones obtenidas han sido elaboradas en base al estudio de un panel de anticuerpos convencionales que reconocen gliadinas, es esperable que similares efectos ocurran en otros sistemas de detección inmunoquímica. Por lo tanto, la desnaturalización parcial o completa del antígeno o de los anticuerpos debería ser evaluada más profundamente con el fin de garantizar que los resultados obtenidos en determinaciones cuantitativas correspondan a resultados verdaderos.

Capítulo 2

2.1. Introducción

Desde la introducción de la tecnología de los anticuerpos monoclonales estos han sido utilizados en numerosas aplicaciones. Sin embargo existen problemas técnicos que, en ocasiones, limitan su uso. Una de estas limitaciones es el alto costo de producción cuando se emplean sistemas *in vitro* para el cultivo de los hibridomas. Los costos pueden reducirse si la producción se realiza en bacterias partiendo de anticuerpos recombinantes. La aplicación de técnicas de biología molecular permite obtener estas construcciones con cierta facilidad. Sin embargo, la eficiencia en la obtención de anticuerpos funcionales es habitualmente muy baja ya que el plegamiento adecuado los dominios variables de cadena pesada y liviana para generar *in vitro* el paratope no siempre es posible.

Otro aspecto negativo del uso de los anticuerpos monoclonales convencionales es su elevada inmunogenicidad cuando se administran en humanos con fines terapéuticos. En este sentido, el uso de anticuerpos humanizados y de fragmentos recombinantes son estrategias que han mostrado utilidad.

Los fragmentos de anticuerpos como Fab y Fv (heterodímero VH-VL, sin unión covalente), han sido expresados exitosamente en bacterias, levaduras y hongos, y sus propiedades fisicoquímicas y funcionales han podido modificarse por ingeniería genética. [Adams and Weiner2005]. A pesar de estos progresos aún hay varias dificultades para la implementación de la tecnología de anticuerpos recombinantes a escala industrial.

Los fragmentos Fv pueden expresarse en forma estable si se conectan los dos dominios mediante un péptido hidrofílico y flexible para generar un fragmento de cadena única, "single-chain" Fv (scFV). Por la escasa probabilidad de lograr un plegamiento adecuado de estos fragmentos, en general, tienen menor afinidad que el anticuerpo de origen.

En algunos casos, se han intentado obtener fragmentos que comprenden sólo el dominio VH, que frecuentemente retienen la especificidad por el antígeno. Sin embargo, la ausencia del dominio VL deja expuesta una gran superficie hidrofóbica y conduce a la agregación y baja solubilidad [Muyldermans 2001]. En el año 1993, se descubrió que este trabajo de ingeniería genética es realizado continuamente en la naturaleza, ya que parte de la respuesta inmune humoral de llamas y camellos se basa en anticuerpos formados sólo por cadena pesada.

2.1.1. Anticuerpos de camélidos

Analizando el suero de camellos (*C. dromedarius*) mediante la combinación de cromatografía de afinidad con proteína A y proteína G, se aislaron tres fracciones cuantitativamente importantes, correspondientes a subclases de IgG [Hamers-Casterman et al.1993]. La fracción IgG₁ contiene moléculas de 170 KDa que, por reducción, generan cadenas pesadas de 50 KDa y cadenas livianas de 30 KDa. Las otras dos fracciones de inmunoglobulinas contienen moléculas de 100 KDa que por reducción generan sólo

cadena pesadas de 46 kDa y 43 kDa para IgG₂ e IgG₃, respectivamente. Estas dos clases de IgG “no convencionales” carecen completamente de cadena liviana, por lo que se denominan Anticuerpos de Cadena Pesada (HCAb, Heavy Chain Antibodies) (**Figura 2.1**).

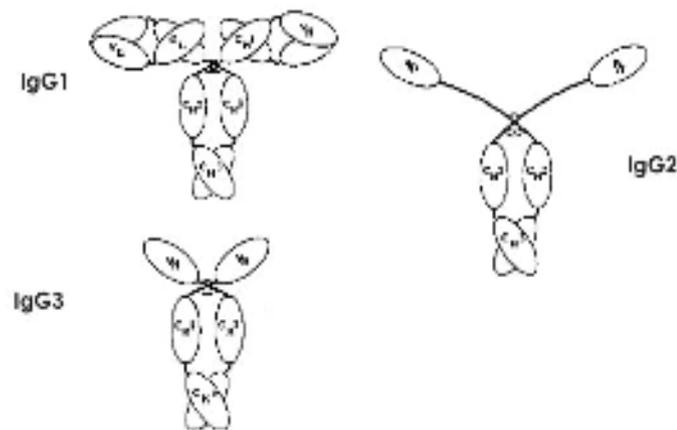


Figura 2.1. Representación esquemática de la organización estructural de las inmunoglobulinas de camélidos [Hamers-Casterman et al.1993].

Un estudio comparativo entre camélidos del viejo mundo (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*) y camélidos del nuevo mundo (*Lama pacos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*) mostró que las inmunoglobulinas de cadena pesada son abundantes en el suero de todas las especies examinadas. La concentración de IgG en el suero de dromedarios y llamas es aproximadamente 5-10 mg/ml. En dromedarios aproximadamente la mitad corresponde a anticuerpos de cadena pesada, mientras que las llamas tienen una menor proporción, entre 25 y 45% [Hamers-Casterman et al.1993].

El estudio de reactividad de las tres fracciones de IgG purificadas de un camello infectado con tripanosoma mostró que existía reconocimiento de diferentes antígenos del parásito en las tres clases de IgG. De esta manera, las cadenas pesadas (HCAb) son capaces de generar un extenso repertorio de reconocimiento.

Una característica llamativa en la estructura de estos anticuerpos es la ausencia del dominio CH1, presente normalmente en la cadena γ 1 de los mamíferos o γ 1 de camélidos. El dominio variable VH está inmediatamente seguido por la región bisagra. En IgG₃ la región bisagra es corta mientras que en IgG₂ es larga. En esta última, la ausencia de CH1 puede ser compensada por esta región bisagra extremadamente larga, la cual está compuesta por 12 repeticiones de la secuencia Pro-X (X= Gln, Glu o Lys).

Lo más relevante en los HCAb es que el sitio de unión de antígenos está formado por un único dominio variable, llamado VHH para distinguirlo del VH clásico [Muyldermans et al.1994]. El dominio VHH se pliega autónomamente y es el fragmento natural de menor tamaño (15-18 kDa) derivado de una inmunoglobulina funcional que conserva la capacidad de unirse a un antígeno (**Figura 2.2**).

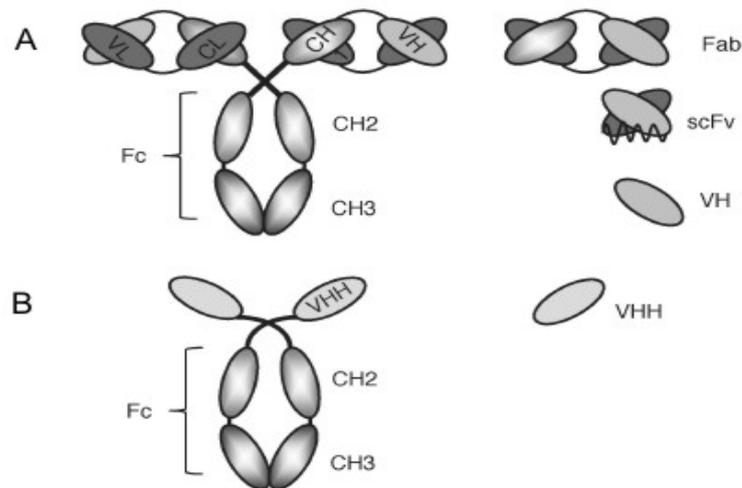


Figura 2.2. Representación esquemática de la estructura de anticuerpos y sus fragmentos derivados. (A) IgG convencional y fragmentos derivados: Fab, scFv y VH. **(B)** Anticuerpo de cadena pesada de camélidos y su fragmento correspondiente VHH [Saerens et al.2008a].

Si bien existen anticuerpos de cadena pesada provenientes de mielomas, estos resultan principalmente de la delección del dominio CH1 en una única célula productora de anticuerpos. Por el contrario, los anticuerpos de cadena pesada de camélidos surgen en un ambiente inmunológico normal y probablemente tengan las modificaciones en la afinidad que acompañan la maduración normal de los linfocitos B.

2.1.1.1. Genética de los anticuerpos de cadena pesada

Los genes de las regiones constantes tienen la organización típica de las IgG de mamíferos. Todos retienen la secuencia de CH1, pero tienen una mutación en el sitio de "splicing" que es responsable de la pérdida completa del primer dominio constante. Los residuos clave para las funciones efectoras y el sitio de glicosilación del penúltimo dominio constante están conservados.

Con respecto a los genes de la región variable, la identificación de segmentos VH y VHH en la línea germinal demuestra que, para generar los dominios respectivos, usan genes separados. Para los reordenamientos VHDJ y VHHDJ se emplea la misma línea germinal J, y también el mismo minigen D, pero diferentes genes V. Es posible que en la organización genómica del locus de cadena pesada en camélidos se pueda encontrar la típica estructura de múltiples segmentos codificantes : (V)n-(D)n-(JH)n-(CH)n. Dentro de la región V, se cree que los genes correspondientes a VHH y VH se encuentran organizados en mosaico o intercalados [Conrath et al.2003].

2.1.1.2. Diferencias en la secuencia

La organización del dominio variable de los anticuerpos de cadena pesada es muy similar a la de los anticuerpos convencionales. Sin embargo, VH y VHH tienen algunas diferencias, mínimas pero importantes, que explican la capacidad de los VHH de unir antígenos aún siendo un único dominio.

La región FR-2 está muy conservada en VH, con numerosos residuos hidrofóbicos que sirven de superficie de anclaje para el dominio VL. En los VHH existen 4 sustituciones muy conservadas: V37F o V37Y, G44E, L45R y W47G (de VH a VHH), que hacen que esta región del dominio sea más hidrofílica, presumiblemente disminuyendo la propensión del VHH a formar un heterodímero con un dominio VL [Muyldermans et al.1994]

Existen sustituciones adicionales como P14A, A83P y L11S que no se encuentran tan bien conservadas. En VH estos residuos se ubican en la antípoda del sitio de unión al antígeno y están en contacto con el dominio CH1. La ausencia de un dominio CH1 sugiere que los aminoácidos localizados en esta región están expuestos al solvente, por lo que es lógico proponer que el incremento en hidrofiliidad provocado por la mutación L11S ayudaría a mantener el dominio VHH soluble [Vu et al.1997].

2.1.1.3. Generación del repertorio de anticuerpos de cadena pesada

Distintos mecanismos permiten generar el repertorio de los HCAs y contribuye a la inmunidad humoral del huésped [Conrath et al.2003].

2.1.1.3.1. Diversidad de la línea germinal VHH y reordenamiento VDJ

Existe un uso preferencial de determinados segmentos V para el reordenamiento, empleando el mismo set de minigenes DH y JH. El uso de preferencial de ciertos segmentos, indicaría que se genera un repertorio primario limitado.

2.1.1.3.2. Mecanismos de diversificación del repertorio

La comparación de secuencia de genes reordenados con aquellos de la línea germinal indica que la diversificación somática es el principal mecanismo que genera el repertorio de anticuerpos de cadena pesada.

La longitud promedio de CDR3 en anticuerpos de camélidos es significativamente mayor que en anticuerpos convencionales, esto permitiría una compensación por la menor superficie de unión al antígeno (comparado con la superficie provista por la combinación de las cadenas pesada y liviana en los anticuerpos convencionales). En dromedarios la longitud promedio del CDR3 es de 11 a 17 aminoácidos y alrededor de 15 en llamas. Dado que el sitio de unión al antígeno en los HCAb está compuesto por sólo tres loops (comparado con seis de los anticuerpos convencionales), los VHH se benefician de un CDR3 más largo que crea una mayor superficie disponible para la unión del antígeno.

El patrón de cambios debido a hipermutación somática es mucho mayor que el observado en anticuerpos convencionales. Existen residuos en las regiones definidas como FR que son también variables: principalmente en la región FR1 (definido como CDR1a), pero también en FR2 y la región alrededor de los residuos 79 al 85 en FR3. Los aminoácidos en FR2 interaccionan con CDR3 de tal modo que la variación en FR2 provee un soporte geométrico heterogéneo para el loop CDR3. Estas mutaciones se observan exclusivamente en los VHH e indicarían la presencia de “hotspots” en los genes V.

Por otro lado, la incidencia de clones con una longitud diferente en el tamaño de la línea germinal es significativamente más alto entre los VHH que entre los VH (30% vs. 1,5%). Las inserciones y deleciones de oligonucleótidos se encuentran frecuentemente en la vecindad de secuencias palindrómicas o señales de recombinación. Varias inserciones o deleciones podrían ser el resultado de recombinación génica, donde la unión inapropiada conduce a la inserción o deleción de múltiples tripletes [Nguyen et al.2000].

2.1.1.4. Estructura de los VHHs

Los VHHs adoptan la estructura típica de los dominios convencionales. La obtención de estructuras cristalinas ha permitido comprender las adaptaciones que tuvieron lugar como consecuencia de la ausencia del dominio VL, y que se concentran en dos áreas: la región que estaría en contacto con dicho dominio y en los CDRs. Las sustituciones aminoacídicas descritas anteriormente contribuyen a hacer esa región más hidrofílica. Además, este efecto es aumentado por la rotación de las cadenas laterales de manera que la parte más polar quede expuesta al solvente. Adicionalmente, el CDR3 se pliega sobre esta región y cubre algunos de los aminoácidos que quedarían (en las Inmunoglobulinas convencionales) internos y debajo de VL. Los CDR1 y CDR2 de VHH frecuentemente se desvían de las estructuras observadas en VH. El CDR3 es más largo y queda más accesible al solvente.

El dominio VHH se encuentra estabilizado por un puente disulfuro, que conecta los dominios FR1 y FR3. Muchos contienen un puente disulfuro adicional que conecta CDR3 con el final de CDR1 (en camellos) o con el comienzo de CDR2 (en llamas) (**Figura 2.3.**).

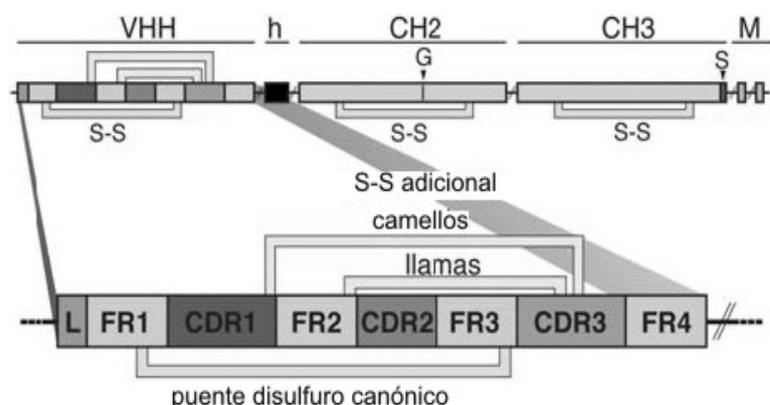


Figura 2.3. Esquema del dominio VHH de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos. Tomado de [Wesolowski et al.2009].

Además, de las estructuras canónicas, como cavidades o superficies planas, los sitios de unión al antígeno también incluyen loops que protruyen. La ausencia del dominio VL sugiere que el paratope está limitado en un área menor, y puede acceder a epítopes pequeños y escondidos, como el sitio activo de enzimas [Muyldermans et al.2001].

2.1.1.5. Estabilidad de los VHH

La estructura más simple y compacta de los VHHs con respecto a los dominios variables de los anticuerpos convencionales le otorga a éstos propiedades fisicoquímicas particulares. Las primeras evaluaciones de las propiedades bioquímicas de VHHs de llama no mostraron diferencias en la unión al antígeno en presencia de tiocianato de amonio (entre 0 y 4 mol/L) y de etanol hasta concentraciones de 50%, al comparar con anticuerpos monoclonales IgG de ratón. Sin embargo, los VHHs presentaron mayor estabilidad a altas temperaturas [van der Linden et al.1999].

Trabajando con VHHs específicos contra el microorganismo implicado en la formación de caspa (*M. furfur*), se seleccionaron clones funcionales en presencia de altas concentraciones de surfactantes contenidos en el shampoo. Las variantes seleccionadas por su estabilidad en shampoo también mostraron mayor resistencia en presencia de urea y cloruro de guanidinio [Dolk et al.2005].

En un estudio sobre el comportamiento térmico y la estabilidad de los HCAb (IgG₂ e IgG₃) y anticuerpos convencionales (IgG₁), los primeros mostraron tener mayor estabilidad térmica. Además de ser resistentes a la desnaturalización, estos tienen la capacidad de volver a su conformación original luego de ser incubados a alta temperatura, reteniendo la capacidad de unirse a antígeno. Probablemente, esta mayor eficiencia de renaturalización se deba a su estructura más simple [Omidfar et al.2007].

2.1.1.6. Aplicaciones de los VHHs

Es posible obtener VHHs con propiedades inmunoquímicas equivalentes en cuanto a reconocimiento y afinidad a las que presentan los anticuerpos convencionales, sin embargo la estructura simple de un solo dominio de los VHHs les confiere características únicas que posibilitan su uso como herramienta en diferentes aplicaciones bioquímicas, diagnósticas y terapéuticas.

La primera descripción sobre la obtención por biología molecular de una biblioteca de VHHs fue realizada por el grupo de Muyldermans, en 1997 [Ghahroudi et al.1997] luego de inmunizar un dromedario y clonar el repertorio de dominios variables de sus HCAB (VHHs) en una biblioteca de expresión en fagos. Esta metodología permite la expresión de fragmentos en la superficie de las partículas de fagos que también contienen el DNA codificante de ese clon VHH en particular. De esta manera, se establece un vínculo físico entre fenotipo (proteína expuesta) y genotipo (DNA encapsulado). Debido a su pequeño tamaño y simple mecanismo de plegamiento, los VHHs pueden ser eficientemente exhibidos en fagos. (Figura 2.4.)

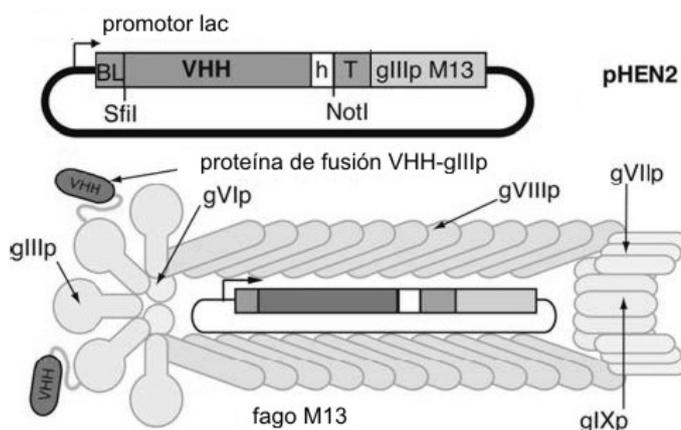


Figura 2.4. Esquema del vector pHEN2, y de la partícula de fago expresando el dominio VHH fusionado a la proteína de la cápside gIIIp. Tomado de [Wesolowski et al.2009].

De dicha biblioteca obtuvieron fragmentos con reconocimiento específico, y lograron también expresarlos como VHHs solubles en bacterias (*E. coli*). Estos VHHs solubles mostraron alta solubilidad y adecuada afinidad. Los fragmentos VHHs purificados fueron evaluados en cuanto a su estabilidad frente a incubaciones prolongadas a 37°C. Mientras estos retuvieron entre el 80 y 100% de su actividad original a las 200 horas, un scFv perdió su funcionalidad en 24 hs.

Luego se observó que las llamas también producen HCAB contra un universo diverso de antígenos y como son animales de menor tamaño y más fáciles de mantener e inmunizar que los camellos, se convirtieron en la fuente de elección para la generación de fragmentos VHH específicos [van der Linden et al.2000].

2.1.1.6.1. Ejemplos de sistemas en los que se ha aplicado la tecnología de VHH

Debido a sus particulares propiedades bioquímicas e inmunoquímicas, los VHHs pueden ser empleados en un gran número de aplicaciones biotecnológicas. Los VHHs han demostrado tener capacidad de reconocer el sitio activo de enzimas y bloquear su actividad, además de neutralizar una variedad de proteínas *in vitro* y en modelos animales, tal como se describe a continuación en algunos ejemplos.

Verheesen et al [Verheesen et al.2006] obtuvieron un VHH que reconoce una proteína involucrada en un desorden causado por agregación proteica. Al expresarlo intracelularmente en un modelo celular para esta patología, se evitó la agregación y redujo la presencia de los agregados existentes. Esto constituiría una excelente herramienta para el estudio y tratamiento de estas enfermedades.

Otro ejemplo lo constituye la inyección intravenosa de un VHH específico para una ectoenzima leucocitaria que induce la muerte de linfocitos T. Este VHH logró bloquear la actividad enzimática y citotóxica en órganos linfáticos. [Koch-Nolte et al.2007]

En el caso de la infección por rotavirus, el empleo de VHH específicos contra una proteína de la cápside de rotavirus mostró actividad neutralizante *in vitro* e *in vivo* en un modelo de ratón [Garaicoechea et al.2008]. Además, ha sido desarrollado un sistema para inmunoterapia pasiva en un modelo de ratón, donde la administración oral de lactobacilos expresando VHH contra rotavirus produjo una reducción en el tiempo y la severidad de la diarrea y en la carga viral [Pant et al.2006].

De manera similar, la administración oral de VHH anti-*E. coli* fue capaz de reducir la diarrea en cerdos, pero sólo a muy altas dosis debido a su degradación en el estómago. Por este motivo se hizo una selección teniendo en cuenta su estabilidad frente a la actividad proteolítica en fluido gástrico y de yeyuno. La aplicación oral del clon de VHH más estable en estas condiciones podría ser útil en la prevención de diarrea en cerdos [Harmsen et al.2006].

En un modelo en rata se vio que la administración de VHH anti-*Streptococcus mutans* reducía significativamente el desarrollo de caries [Krüger et al.2006].

Como estrategia para aumentar la avidéz de los VHH por su antígeno, se han generado construcciones bivalentes aplicadas por ejemplo al bloqueo de la actividad de TNF- α mediante la conjugación de dos VHHs anti-TNF α . Para incrementar la vida media en suero a la construcción se le incorporó un VHH anti-seroalbúmina, generando una construcción trivalente biespecífica, la cual fue probada en un protocolo terapéutico en un modelo murino de artritis, mostrando una muy buena eficiencia [Coppieters et al.2006].

De la misma manera se ensayaron construcciones para ser empleadas como sueros anti-venenos, obteniendo VHH anti-toxina de cobra en forma de pentámero [Stewart et al.2007] y construcciones bivalentes contra una toxina de escorpión. Esta última mostró tener capacidad neutralizante en modelos de ratón [Hmila et al.2008].

La expresión de VHH en forma secretada y de membrana en *Lactobacillus* ha sido empleada para reducir la infección de bacterias lácticas por bacteriofagos, lo cual constituye la principal causa de fracaso de las fermentaciones lácticas [Hultberg et al.2007].

Las propiedades de los VHHs los hacen aptos para ser empleados en columnas de afinidad. En este sentido se ha estudiado el uso de VHH anti-IgG y anti-seroalbúmina humana para aislar estas proteínas de la sangre, o mejorar la eficiencia de la hemodiálisis eliminando específicamente sustancias causantes de patologías (como IgG₃ en lupus) [Klooster et al.2007].

También se han obtenido VHHs anti-LPS, los que bloquean la unión de LPS a células blanco, inhibiendo la señalización por LPS que resulta en la generación de moléculas efectoras. En base a estos resultados se ha propuesto la generación de un sistema para capturar LPS del plasma de pacientes con sepsis con una eficiencia mayor que los sistemas actuales de aféresis [Khattabi et al.2006].

Además se ha considerado el uso de VHH específicos de antígenos tumorales para diagnóstico por imágenes o tratamiento [Cortez-Retamozo et al.2002] o bien acoplar péptidos anti-microbianos a VHHs que reconocen patógenos [Szynol et al.2006].

Se ha descrito el uso de VHH en distintos sistemas de detección de antígenos, como citometría de flujo [Saerens et al.2008b], inmunohistoquímica [Mai et al.2006] e inmunofluorescencia [Stijlemans et al.2004]. Sin embargo existen escasos reportes en cuanto a su aplicación en la cuantificación de antígenos. El acoplamiento a un biosensor ha sido evaluado para la detección de PSA (antígeno prostático específico) [Saerens et al.2005], y también acoplados a microesferas [Anderson et al.2007] [Goldman et al.2006]. Existen dos publicaciones que describen el desarrollo de un inmunoensayo en el formato de ELISA. Uno de ellos detecta antígenos de *T. solium*, distinguiendo entre muestras positivas y negativas [Deckers et al.2009]. El otro detecta entre 0,1 y 1 ufp/fosa del virus Marburg, aunque la eficiencia de este ensayo sólo ha sido evaluada en muestras de cultivo viral y se desconoce su comportamiento al analizar muestras de suero [Sherwood et al.2007].

En este trabajo se describe la obtención de fragmentos VHHs anti-gliadinas, y su empleo en el desarrollo de ensayos cuantitativos para la detección de gliadinas en alimentos. Además, mediante las estrategias de selección se busca obtener los fragmentos más estables en las condiciones de análisis (presencia de agentes reductores y desnaturizantes).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Obtención de VHH recombinantes anti-gliadinas

2.2.1.1. Inmunización

Para la construcción de la biblioteca se inmunizaron dos Llamas (*Lama glama*) los días 0, 21 y 51 con 5 mg de gliadinas (Sigma) en adyuvante de Freund (Sigma). Antes de cada inmunización se extrajo una muestra de sangre para analizar la respuesta anti-gliadinas generada por el plan de inmunización. Del animal con mejor respuesta, el día 75 se extrajo sangre heparinizada para aislar células mononucleares.

Para la generación de una segunda biblioteca la inmunización se realizó con extracto de harina de trigo del cultivar Oasis. Se procedió de la misma manera que en la sección 1.2.1.2., pero en la última extracción se empleó 2-ME 2% y GuHCl 2 M en etanol 60%, calentando 40 minutos a 50 °C. Esta muestra se dializó en PBS, empleando para cada inmunización 5 mg del producto obtenido.

2.2.1.2. Evaluación de la respuesta policlonal

Se inmovilizó gliadina estándar (Sigma) 1µg/ml en PBS en placas Maxisorp (Nunc) durante 16 hs a 4 °C y se bloqueó con leche descremada 3% en PBS 2 horas a 37 °C. A continuación se incubó con diluciones seriadas del suero de llama 1 hora a 37 °C. Las IgG de llama retenidas en la placa fueron reveladas por incubación sucesiva con suero policlonal de conejo anti-llama y con conjugado anti-IgG conejo- HRP (Sigma). Se reveló con OPD, deteniendo la reacción a los 15 minutos con H₂SO₄ 4 N. Luego de cada paso se realizaron 3 lavados con PBS-T. Las diluciones se hicieron en leche 1% en PBS-T. La DO_{492nm} de cada fosa fue leída en un lector de microplacas.

2.2.1.3. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de VHHs de llamas

2.2.1.3.1. Obtención de cDNA

A partir de la sangre heparinizada de la Llama 9204 (primera biblioteca) y de la Llama 5024 (segunda biblioteca) se aislaron células mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). El RNA total fue purificado con TRIZOL (Pharmacia) y a partir de éste se sintetizó cDNA. Para esto se incubaron 3 µg de RNA y 1,5 µg de oligo-dT₃₀ en 7,5 µl durante 10 min a 70°C y luego se enfrió en hielo. Se agregó dNTPs 0,4 mM, RT buffer 1X, 200U M-MLV RT (Promega) y 25U RNAsin (Promega) en un volumen total de 25 µl y se incubó 1 h a 42°C. Se detuvo la reacción a 70 °C por 15 minutos.

El cDNA codificando el dominio VHH completo y parte de la región bisagra se amplificó por PCR empleando los primers VH1Back-Sfil o VH6Back-Sfil en combinación con el primer Lamb7-NotI o Lamb8-NotI teniendo de esta manera 4 reacciones de PCR diferentes.

Los primers VHBack-Sfil corresponden a secuencias consenso del extremo N-terminal del VHH. Los primers Lamb7-NotI y Lamb8-NotI hibridizan con parte de la región bisagra corta y larga, respectivamente. Sus secuencias son: VH1Back-Sfil: GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG; VH6Back-Sfil: GCT GGA TTG TTA TTA TCT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTG CAG CTG CAG GCG TCT GGR GGA GG; Lamb7-NotI: G ATG GTG ATG ATG ATG TGC GGC CGC GCT GGG GTC TTC GCT GTG GTG CG; Lamb8-NotI: G ATG GTG ATG ATG ATG TGC GGC CGC TGG TTG TGG TTT TGG TGT CTT GGG. Las secuencias de restricción están subrayadas.

Las reacciones de PCR constaron de un ciclo inicial de desnaturalización (5 min a 95°C), 30 ciclos de amplificación (1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C) y un ciclo final de elongación (10 min a 72°C).

Los fragmentos resultantes de las cuatro reacciones de PCR, de aproximadamente 500 pb, fueron purificados a partir de geles de agarosa 2% (GFX PCR DNA & Gel band purification Kit, Pharmacia),

2.2.1.3.2. Obtención del vector

Para la construcción de la biblioteca se utilizó el vector de expresión en fagos pHEN2. Para obtener este vector en mayor cantidad se transformaron *E. coli* DH5a competentes, agregando el plásmido a una suspensión de las mismas en hielo durante 30 minutos, calentando 90 segundos a 42°C y 5 minutos en hielo, luego de lo cual se agregó medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l), se incubó 1 hora a 37°C y se plaqueó en LB-ampicilina.

A partir de las colonias obtenidas se preparó el DNA plasmídico (miniprep). El lisado de las bacterias se obtuvo con el kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Para la purificación del DNA presente en el sobrenadante del lisado bacteriano se agregó un volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente y luego de centrifugar se separó la fase superior. Luego, se agregó un volumen de isopropanol, obteniendo un pellet por centrifugación que se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua. El producto obtenido se analizó en un gel de agarosa 0,5%.

2.2.1.3.3. Digestión y ligación

Los fragmentos purificados y el vector pHEN2 fueron digeridos secuencialmente con las enzimas de restricción Sfil y NotI y repurificados.

Para la construcción de la biblioteca, se ligaron 5 µg del plásmido y 5 µg del fragmento digerido durante 16 hs a 16°C. Los insertos fueron introducidos en el marco de lectura del gen de la proteína de cápside pIII en el vector pHEN2.

La reacción de ligación (200 µl) se purificó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, se extrajo 2 veces con cloroformo y se precipitó con 20 µg de glucógeno, 30 µl de Acetato de sodio 2M pH 5.2 y 440 µl de etanol durante 24 hs a -80°C. Luego de centrifugar, el

precipitado se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 2 ml de H₂O. Se concentró con un centricon YM-3 (Amicon) a 15 µl en agua milliQ estéril.

2.2.1.3.4. Transformación por electroporación

Para obtener células electrocompetentes *E. coli* XL Blue MRF' se inocularon 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo de 16 horas de la bacteria y se incubó a 37°C con agitación hasta una DO_{600nm} de 0,6. Se enfrió en hielo durante 30 minutos y se cosecharon las células por centrifugación a 4000g por 15 minutos a 4°C. Se lavaron 2 veces con 250 ml de glicerol 10% enfriado en hielo. Se resuspendió en un volumen final de 1 ml de GYT frío (glicerol 10%, extracto de levadura 0,125 % y triptona 0,25%), se fraccionó en alícuotas de 50 µl y se almacenó a -80°C. La eficiencia de transformación de las bacterias electrocompetentes obtenidas fue de aproximadamente 7x10⁸ ufc/µg de ADN.

Se procedió entonces a transformar estas células con el producto de ligación. Se realizaron 10 electrotransformaciones en un electroporador (BioRad Gene Pulser II System), cuyos parámetros se establecieron en 2,5 kV, 25 µF y 200Ω. Se resuspendieron las células electroporadas en 10 ml totales de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM y MgCl₂ 10 mM) y se incubó 1 hora a 37°C con agitación para permitir la expresión de la resistencia a ampicilina otorgada por el plásmido.

Una alícuota se plaqueó en LB ampicilina 100 µg/ml en distintas diluciones para calcular el tamaño de la biblioteca. Se chequeó la diversidad por secuenciación. Al resto del cultivo se le agregó 400 ml de medio 2XYT (triptona 16 g/l, extracto de levadura 10 g/l y NaCl 5 g/l) ampicilina glucosa 1%, y se creció 12 horas a 30°C.

A partir de una fracción se extrajo DNA para guardar un stock y el resto de la biblioteca se separó en alícuotas que se guardaron a -80°C en glicerol 10%.

2.2.1.4. Selección de fagos –VHH específicos de gliadinas

2.2.1.4.1. Obtención de fagos-VHH

Para obtener partículas de fagos que expresen los fragmentos VHHs como proteína de fusión con pIII es necesario producir previamente fago helper. Con este fin se obtuvo un cultivo de *E. coli* TG1 en 10 ml de 2XYT hasta fase exponencial, durante aproximadamente 2 hs. Se agregó 20 µl de fago helper y se incubó 2 horas a 37°C. Luego de agregar 50 ml de 2XYT con kanamicina se incubó 16 horas a 37°C. El cultivo se centrifugó 15 minutos a 2500 g, obteniendo los fagos en el sobrenadante. Para obtener el título de la preparación se mezclaron 10 µl de diferentes diluciones del fago con 100 µl de *E. coli* TG1 crecidas 16 horas en 2XYT, para luego agregar 100 µl de fago/bacteria a 3 ml de Top Agar (triptona 10gr/l, NaCl 8gr/l, agarosa 6gr/l) a 55°C. Esta mezcla se colocó en una placa de LB y se incubó 16 horas a 37°C. El recuento de placas de lisis permite obtener el número de unidades formadoras de placa/ml.

Para preparar fagos policlonales, una fracción del stock de la biblioteca o las células preinfectadas con fagos eluidos en el panning fueron crecidas en 2XYT ampilicina glucosa 1% hasta DO_{600nm} 0,5 a 37 °C y luego infectadas con al menos un exceso de 10 veces de fago helper para asegurar la infección de todas las células y por ende la representación de todos los fagos. Se dejó en la mesada 15 minutos y luego se incubó 1 h a 37°C con agitación. Se centrifugó y se resuspendió en 2XYT ampilicina-kanamicina (resistencia del fago). Después de crecer 16 horas a 30°C, se recuperaron los fagos del sobrenadante mediante precipitación con 4% PEG 8,000, 0,5 M NaCl concentración final durante 1 hora a 4°C. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS estéril /100 ml de cultivo, para ser usado en el "panning".

2.2.1.4.2. Selección

Para enriquecer la biblioteca en fagos específicos de gliadinas se realizó el "panning" en placas de cultivo de 24 fosas (Hamilton). Se sensibilizó con 5 µg/fosa de gliadinas (por duplicado) 2 hs a temperatura ambiente. Se emplearon 2 fosas sin sensibilizar como control de unión inespecífica. Después de bloquear con leche en polvo 3% en PBS 16 horas a 4°C, se agregaron aproximadamente 10^{13} VHH-fagos (previamente cuantificados) en 1% leche-PBS y se incubó 2 hs con agitación suave para permitir la unión de los VHH a gliadinas inmovilizadas. Se lavó 10 veces con PBS-T y luego los fagos-VHH fueron eluidos por incubación en glicina-HCl 100 mM pH 2.2 durante 10 minutos. El eluido se transfirió a un tubo conteniendo Tris-HCl 2 M pH 8.0 para neutralizar.

El título de los fagos "input" y "output" en cada paso se estimó por recuento de colonias resistentes a ampilicina de células TG1 infectadas con fagos en diferentes diluciones. Con los fagos eluidos se realizó el proceso de infección y "panning" dos veces más.

Este procedimiento se volvió a realizar sobre la misma biblioteca empleando como antígeno gliadinas desnaturalizadas con 2-ME y GuHCl.

2.2.1.5. Producción de fagos individuales

Luego de las rondas de "panning" se empleó un ELISA indirecto para determinar la cantidad de "binders", para lo cual es necesario obtener fagos a partir de cada colonia individual de las placas de titulación.

El cultivo se desarrolló en placas de 96 fosas. Las colonias resistentes a ampilicina infectadas con los fagos provenientes de la elución se crecieron durante toda la noche en medio 2XYT ampilicina a 28 °C. Este cultivo se utilizó para inocular 150 µl de 2XYT ampilicina-glucosa y se incubó a 37°C hasta fase exponencial ($OD_{600nm}=0,5$). Se agregó fago "helper" en una relación fago: bacteria 20:1, se dejó reposar 15 minutos y se incubó 1 hora a 37°C. Luego de centrifugar 30 minutos a 5000 rpm las células se resuspendieron en 150 µl de 2xyT ampilicina-kanamicina y se incubó toda la noche a 28 °C. Con el sobrenadante obtenido se desarrolló un ELISA indirecto.

Los clones que reconocieron gliadinas se amplificaron para lograr luego su caracterización. Se siguió el mismo procedimiento pero a mayor escala (20 ml de cultivo para cada clon). Como el sobrenadante almacenado a 4°C pierde actividad en pocos días se realizó la purificación mediante doble precipitación con PEG 8000. El pellet se resuspendió en glicerol 50% en PBS conteniendo inhibidores de proteasas y se almacenó a -80°C.

2.2.1.6. Secuenciación de clones de interés

A partir de colonias aisladas se creció 16 horas a 37°C con agitación en medio selectivo, para luego obtener DNA plasmídico en preparación de baja escala ("miniprep") utilizando un kit comercial Wizard Plus SV Minipreps (Promega). La integridad y pureza de la preparación fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 1%. A partir de muestras de buena calidad y concentración mayor de 200 ng/μl, el inserto se secuenció utilizando los primers LMB3 (5' caggaaacagctatgac 3') y Fdseq1 (5' gaattttctgtatgagg 3'), complementarios a regiones del vector flanqueantes al sitio de clonado (servicio de secuenciación de la Fundación Instituto Leloir).

2.2.1.7. Obtención de VHH soluble

Para obtener el VHH26 como proteína soluble se clonó el DNA en el vector de expresión pAB1. Para esto se usaron los primers VH6Back-Sfil y Lamb9-EcoRI. Este último contiene un sitio de restricción EcoRI. La secuencia es: ACG GCC AGT GAA TTC TTA TTA CCC ATT CAG ATC C (la secuencia de EcoRI está subrayada). Después de la digestión con Sfil y EcoRI, se ligaron los fragmentos de PCR purificados en el vector pAB1 predigerido, el cual contiene 6xHis en el extremo C-terminal y se transformaron células de *E. coli* HB2151.

A partir de 1 litro de cultivo bacteriano se indujo la expresión del VHH agregando IPTG 1 mM final e incubando 4 horas a 37°C. Se aisló luego la fracción periplásmica por shock osmótico, resuspendiendo el pellet obtenido por centrifugación en TES frío (Tris 200 mM pH 8, EDTA 0.5 mM, sacarosa 500 mM), incubando en hielo durante 10 minutos y centrifugando 20 minutos en frío a 4000 g. El pellet se resuspendió en 40 ml de TES: H₂O 1:4 frío, se incubó nuevamente en hielo y se centrifugó. El sobrenadante se dializó contra NIN 10 (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, Imidazol 250mM, pH 8) durante 16 horas a 4°C. El sobrenadante conteniendo el VHH soluble se purificó mediante FPLC.

En una primera etapa se realizó una cromatografía de afinidad, aplicando la fracción soluble de la diálisis a flujo lento (0,5 ml/min) en una columna de afinidad de níquel (Hi-Trap chelating HP column, Pharmacia) preequilibrada con buffer NIN 10. Luego de lavar extensivamente con el mismo buffer las proteínas retenidas se eluyeron aplicando NIN 250 en un gradiente continuo de 0 a 100 % en 60 minutos.

El producto obtenido se sometió a un segundo paso de purificación por columna de intercambio catiónico (columna mono S, Pharmacia). La columna se equilibró con MES 50 mM (Sigma) pH 5,2 y para la elución se utilizó NaCl 1M en el mismo buffer. Los picos

observados en DO_{280nm} fueron colectados y evaluados por SDS-PAGE 17%. La identidad de la banda de interés se corroboró por Western Blot, revelando con un anticuerpo monoclonal anti-poliHistidina-peroxidasa (Sigma). La muestra conteniendo el VHH purificado se dializó contra PBS y se almacenó a $-20^{\circ}C$.

2.2.2. Ensayos inmunoquímicos

2.2.2.1. ELISA indirecto con los fagos-VHH

Para seleccionar los clones específicos provenientes de las etapas de "panning" se sensibilizaron placas de ELISA durante toda la noche con $1 \mu g/ml$ de gliadinas. Después de bloquear 2 horas a $37^{\circ}C$ con leche 3% en PBS, los sobrenadantes de cultivo conteniendo los fagos se diluyeron 2 veces en leche 2% en PBS y se incubó 2 horas a $37^{\circ}C$. Después de lavar 3 veces con PBS-Tween, se incubó con anti-M13-HRP (Pharmacia). Se lavó nuevamente, se reveló con OPD y se detuvo la reacción a los 15 minutos con H_2SO_4 4 N.

El mismo procedimiento se utilizó para en los ensayos de estabilidad pero empleando la dilución adecuada del fago purificado en buffer conteniendo los aditivos a evaluar (etanol o 2ME/GuHCl).

2.2.2.2. ELISA competitivo secuencial

Se inmovilizó gliadina comercial diluída en PBS 16 horas a $4^{\circ}C$. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a $37^{\circ}C$. Después de lavar una vez con PBS-Tween 0,05%(PBS-T), se bloquearon las placas 2h con leche en polvo descremada al 3% en PBS y se lavó nuevamente. Las muestras problema o estándares se incubaron en tubos de 1,5 ml durante 2 horas con la dilución apropiada de fago-VHH en una relación 1:1. Como diluyente se usó leche en polvo descremada 1% en PBS-Tween 0,05%. Estas muestras fueron transferidas a las fosas con antígeno inmovilizado e incubadas durante 30 min. Las placas se lavaron 3 veces y luego se incubó 1 hora con el anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con peroxidasa (Pharmacia). Se lavaron nuevamente las placas 3 veces y se agregó el sustrato de la enzima (1 mg/ml OPD; $1 \mu l/ml$ H_2O_2 en buffer citrato pH 5). La reacción se detuvo con H_2SO_4 2M después de 15 minutos y se leyó la absorbancia a 492 nm.

2.2.2.3. ELISA de inhibición

El procedimiento es igual al anterior, pero el fago-VHH se preincuba con extractos etanólicos de diferentes vegetales (trigo, cebada, centeno, maíz, soja o arroz).

2.2.2.4. ELISA de captura

Se inmovilizó el VHH 26 diluído en PBS ($5 \mu g/ml$) en placas maxisorp (Nunc) 16 horas a $4^{\circ}C$. Todas las incubaciones siguientes se realizaron a $37^{\circ}C$. Las soluciones de bloqueo, lavado y diluyente son las mismas que en ELISA competitivo secuencial. Después de lavar

una vez, se bloquearon las placas 2h y se lavó nuevamente. Las muestras o estándares diluidos apropiadamente se transfirieron a las fosas y se incubó una hora. Se lavó 3 veces y se incubó con los anticuerpos monoclonales anti-gliadinas biotinilados. Después de realizar 3 lavados se incubó con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma, Skeinheim, Germany) 1 hora. Por último se hicieron 3 lavados con PBS-T y uno con buffer dietanolamina (dietanolamina 1M, 2mM MgCl₂, pH 9,8) y se agregó el sustrato de la enzima (1 mg/ml p-nitrofenil fosfato en buffer dietanolamina). La reacción se detuvo a los 30 minutos con EDTA 0,1 M y se leyó la absorbancia a 405 nm.

El mismo procedimiento se realizó también sensibilizando con los anticuerpos monoclonales, y empleando el VHH como segundo anticuerpo. Este ensayo se reveló con el anticuerpo monoclonal anti-poliHistidina-peroxidasa (Sigma).

2.2.3. Análisis de afinidad

La afinidad del VHH 26 se midió estudiando la unión a gliadinas utilizando un equipo IAsys plus Affinity Sensor (TermoLabsystems).

- Inmovilización: La inmovilización del VHH26 (en acetato de sodio 10 mM, pH 5,3) en la cubeta de carboximetildextrano fue llevada a cabo utilizando un protocolo de activación en EDC/NHS ya establecido (manual de usuario Affinity Sensors). Luego de la conjugación los grupos éster-NHS sin reaccionar se bloquearon con etanolamina 1M y se removieron los restos de proteína no conjugada con ácido fórmico.
- Cinética de asociación y disociación: Se registró la respuesta generada por la aplicación de al menos 5 concentraciones distintas de gliadinas (ensayos por duplicado), así como también para la cinética de disociación al reemplazar la solución de gliadinas por buffer. Los datos fueron analizados usando el software FAST plot (TermoLabsystems) y Grafit5 (Erithacus Software).

2.3. Resultados

Los resultados presentados en el Capítulo 1 muestran que los agentes reductores y desnaturalizantes usados en la extracción de prolaminas de muestras de alimentos para la cuantificación de gliadinas modifican la conformación de los anticuerpos alterando su funcionalidad.

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas particulares de los anticuerpos de cadena pesada de los camélidos se decidió construir una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH anti-gliadinas para evaluar su aplicabilidad en la detección de antígenos en presencia de agentes capaces de alterar la actividad biológica de los anticuerpos convencionales.

2.3.1. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH anti-gliadinas

2.3.1.1. Generación de la biblioteca

Se inmunizaron dos Llamas con una preparación de gliadinas comercial y la evolución de la respuesta humoral se siguió por titulación en ELISA indirecto. En ambos animales se obtuvo alta reactividad contra gliadinas (**Figura 2.5.**).

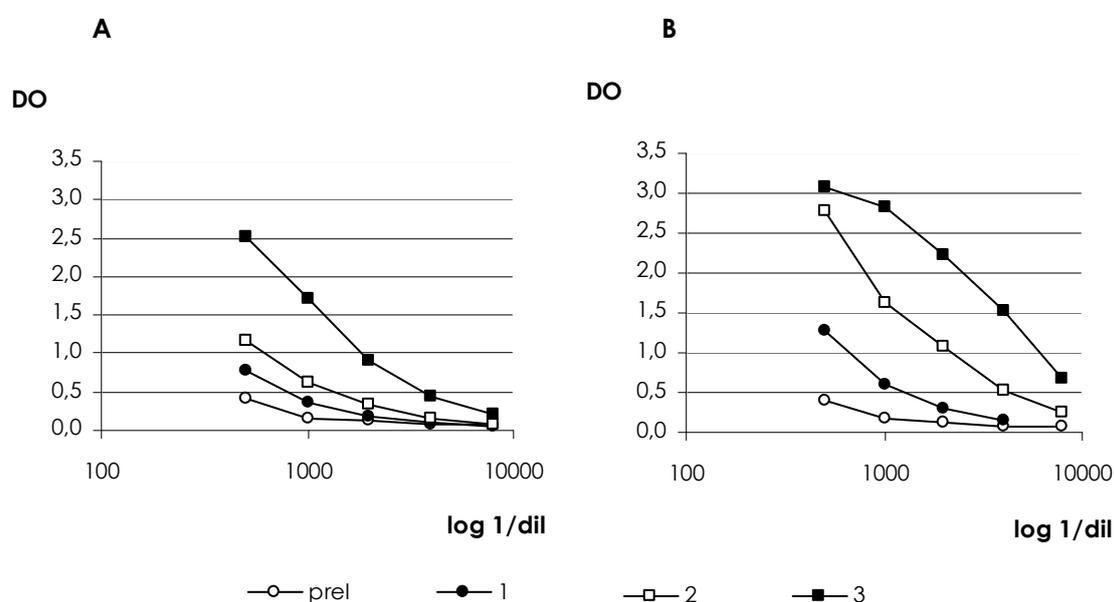


Figura 2.5. Respuesta específica de anticuerpos de sangre periférica de llamas inmunizadas con gliadinas. Titulación por ELISA indirecto de la reactividad anti-gliadinas del suero de las llamas 9201 (A) y 9204 (B) de muestras preinmunización (prel) y luego de la primera, segunda y tercera inmunización (1, 2 y 3), respectivamente.

Con el fin de generar una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH se obtuvo sangre periférica de la llama que presentó el mayor título. A partir de células mononucleares de sangre periférica se aisló RNAm total y se sintetizó el cDNA. La amplificación del cDNA correspondiente al dominio VHH se realizó utilizando *primers* específicos obteniendo una banda de amplificación de alrededor de 500 pares de bases. Estos productos de PCR se clonaron en el vector de display en fagos pHEN2. Para esto, tanto el vector como los productos de PCR se digirieron sucesivamente con las enzimas de restricción Sfi I y Not I, y mediante electroforesis en gel de agarosa se verificó la digestión completa de los mismos.

En la **Figura 2.6.A.** se muestra la digestión correspondiente al inserto de aproximadamente 500 pares de bases, que disminuye su tamaño luego de las digestiones. En la **Figura 2.6.B.** se muestra la digestión del vector, donde las distintas bandas correspondientes al DNA plasmídico se transforman en una, al quedar el DNA lineal luego de la primera digestión, y la liberación del inserto de 500 pares de bases luego de la segunda.

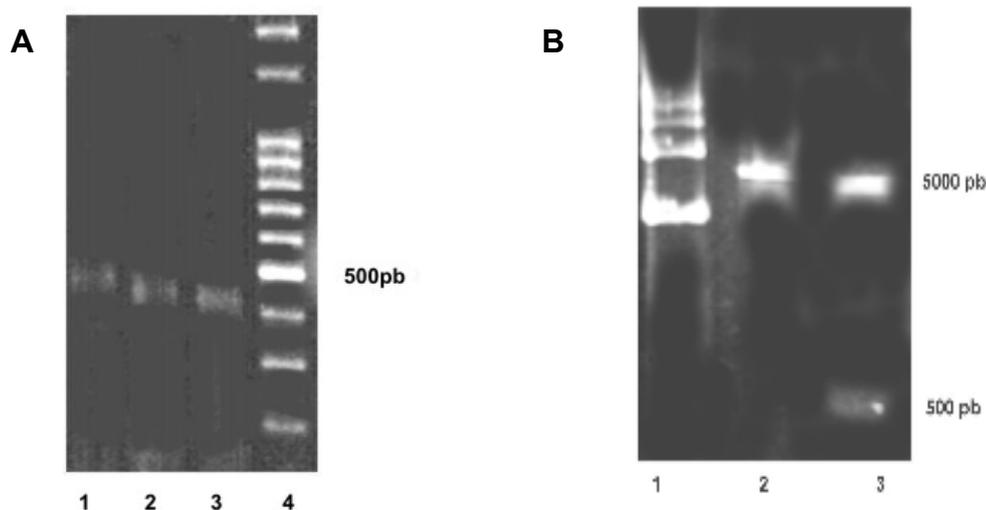


Figura 2.6. Electroforesis en Gel de agarosa de los productos de digestión. (A) Digestión del inserto: (1) sin digerir, (2) digestión con Sfi I, (3) digestión con Sfi I y Not I, (4) marcador de PM. **(B)** Digestión del vector: (1) sin digerir, (2) digestión con Sfi I, (3) digestión con Sfi I y Not I

Luego de purificar los fragmentos, éstos se ligaron y se realizó la transformación de *E. coli* XL1 electrocompetentes por electroporación, obteniendo una biblioteca formada por 8×10^7 clones. La calidad de la biblioteca se verificó mediante la secuenciación de 15 clones tomados al azar. Todas las secuencias obtenidas fueron diferentes, lo cual sugiere que la biblioteca tiene una alta variabilidad.

2.3.1.2. Selección de fagos-VHH que reconocen gliadinas

Sobre la biblioteca obtenida se realizaron tres rondas de selección consecutivas con el fin de lograr el enriquecimiento en fagos-VHH específicos para gliadinas. Para esto se incubaron los fagos en fosas sensibilizadas con gliadinas y luego de lavar, se eluyeron las partículas que habían quedado unidas específicamente. El número de partículas eluidas en cada ronda se estimó mediante recuento de *E. coli* TG1 infectadas. En paralelo, se desarrolló el mismo procedimiento en fosas sin sensibilizar para controlar la unión no específica.

Aunque la cantidad partículas iniciales ("input") fue aproximadamente igual, alrededor de 10^{13} , la cantidad de partículas eluidas (unión específica) fue aumentando en las sucesivas rondas, mientras que se mantuvo la diferencia con el control negativo (unión no específica). Esto indica que se obtuvo una mayor proporción de fagos-VHH específicos de gliadinas en cada ronda (**Tabla 2.1.**).

Para evaluar la actividad se seleccionaron al azar clones obtenidos en las diferentes rondas a partir de los cuales se produjeron fagos-VHH y se determinó por ELISA indirecto la reactividad contra gliadinas. Como era esperable se observó un aumento en la proporción de clones positivos en las sucesivas rondas de *panning* (6,4%, 21% y 40%, para la primera, segunda y tercera ronda, respectivamente).

Tabla 2.1. Selección de clones específicos y evaluación por ELISA.

	1° ronda	2° ronda	3° ronda
<i>Input</i>	2×10^{14}	$4,3 \times 10^{13}$	$2,8 \times 10^{13}$
Unión específica	$1,6 \times 10^6$	$6,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$
Unión no específica	4×10^5	$3,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$
Clones positivos	6,4%	21%	40%

2.3.1.3. Producción de fagos-VHH anti-gliadinas

Para proceder a la caracterización inmunoquímica, se comenzó con la producción a mayor escala de los 44 clones específicos obtenidos en la tercera ronda de selección. El sobrenadante de cada cultivo se analizó por ELISA indirecto, para comprobar la presencia de fagos-VHH con actividad anti-gliadinas.

La eficiencia en la producción fue muy variable tanto para los distintos clones como para el mismo clon en diferentes lotes, obteniendo en cada lote de producción aproximadamente el 50% de resultados positivos. Además, se observó que los sobrenadantes de cultivo almacenados a 4 °C perdían actividad rápidamente. Por tal motivo, se procedió a la obtención de mayores volúmenes de cultivo, para concentrarlos mediante precipitación con polietilenglicol y almacenarlos en glicerol a -20 °C. De esta manera, se

lograron obtener con buena eficiencia 28 clones de los 44 existentes, los cuales se titularon por ELISA indirecto en placas sensibilizadas con gliadinas, seleccionando como dilución de trabajo para los ensayos posteriores, aquella correspondiente a una Densidad Óptica de 1,5.

2.3.2. Caracterización de la actividad de los fagos-VHH en las condiciones de análisis

Como fue mencionado anteriormente, en la certificación de alimentos libres de gluten y previo al análisis inmunoquímico, las proteínas son extraídas del alimento con etanol acuoso 60%, siendo posible incrementar la eficiencia en la recuperación mediante la adición de 2-ME y GuHCl. El comportamiento en estas condiciones de los fagos-VHH anti-gliadina obtenidos, se evaluó mediante ensayos similares a los descritos en la sección anterior con los anticuerpos convencionales.

2.3.2.1. Capacidad de unión en presencia de etanol

Para caracterizar la actividad biológica de los 28 clones de fagos-VHH en presencia de etanol, la unión específica se analizó por ELISA indirecto en placas sensibilizadas con gliadinas. Para esto, se realizó la dilución previamente establecida para cada clon en buffer conteniendo distintas concentraciones de etanol. Como era esperable la unión disminuye al incrementar la concentración de etanol para todos los clones estudiados, pero se encontraron diferencias en la sensibilidad a este solvente para los distintos clones.

Con el fin de tener una referencia de comparación, se seleccionó la condición de 15% de etanol, (ya que esta concentración se obtendría diluyendo 4 veces una muestra extraída con etanol 60%). Así se observó que 6 clones: 11, 13, 19, 26, 33 y 36, conservaron más del 80% de actividad en etanol 15% y que, entre estos, el clon 26 se destacaba por mantener el 92% de actividad (**Figura 2.7.**). De este análisis se infiere que estos clones, en contraposición con los anticuerpos convencionales, podrían ser funcionales y aplicables en ensayos inmunoquímicos en presencia de etanol 15%. Como se observa en la figura, el mAb 2A1C4 disminuye su reactividad al 46% en estas condiciones.

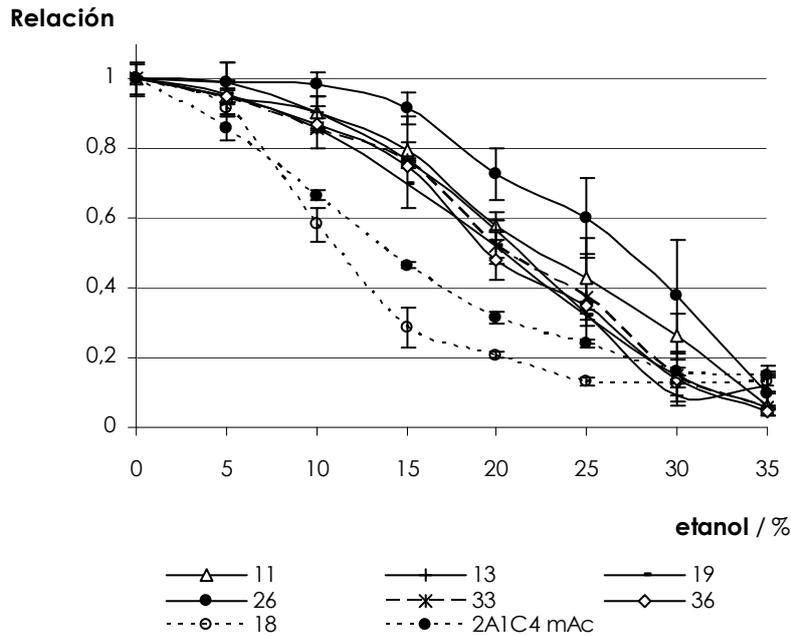


Figura 2.6. Interferencia de etanol en la unión de fagos VHH anti-gliadina

Se evaluó la unión a gliadina inmobilizada de diferentes fagos-VHH por ELISA indirecto en buffer conteniendo etanol entre 0 y 35%. Se incluye el clon 18 como ejemplo de fago-VHH no estable y el anticuerpo monoclonal 2A1C4. Los resultados se expresan como relación de $DO \pm DS$ referida al control sin etanol (Relación =1). Se muestran resultados de duplicados de un experimento representativo.

2.3.2.2. Capacidad de unión en 2-ME y GuHCl

Para evaluar el efecto de 2-ME y GuHCl sobre la capacidad de unión, se preparó la dilución adecuada de cada fago-VHH en buffer conteniendo diferentes combinaciones de los aditivos. La unión de los clones 11, 13, 19, 26, 33 y 36 resultó ser más resistente a estas condiciones agresivas que los otros clones estudiados. Como referencia para la comparación se eligió la condición 2-ME 0,5% y GuHCl 0,5 mol/L, que correspondería a una dilución 1:4 de la muestra extraída con el buffer de extracción propuesto por Garcia et al [García et al.2005].

Aunque el fago-VHH26 mostró una estabilidad levemente superior en condiciones desnaturalizantes, los 6 clones más estables mantuvieron el 50% de actividad en la condición de referencia. Dicha estabilidad fue superior a lo observado para los anticuerpos monoclonales estudiados (**Figura 2.8.**). En base a estos resultados (estabilidad en etanol y en 2-ME/GuHCl) se seleccionaron estos 6 clones para estudios posteriores.

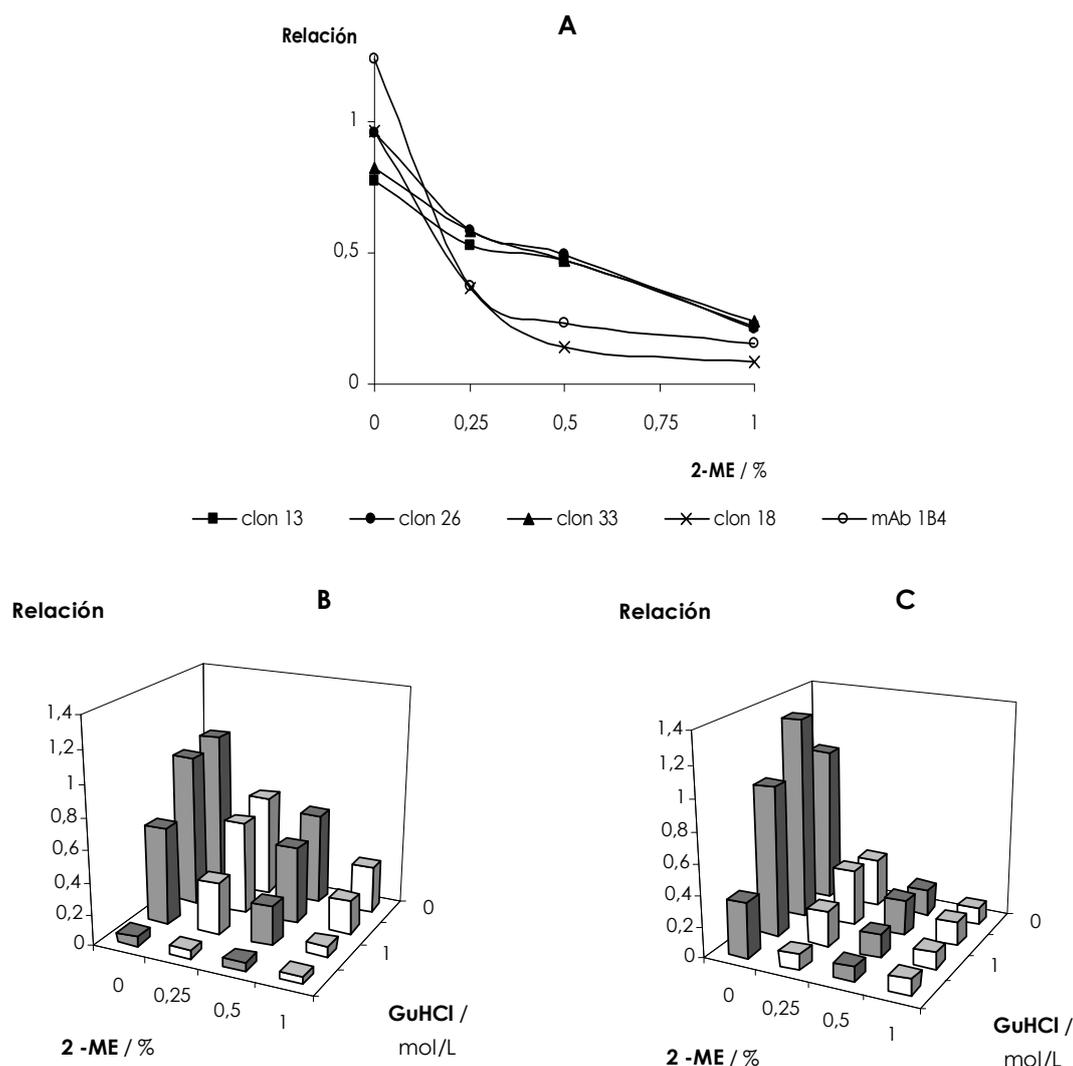


Figura 2.8. Interferencia en la unión del anticuerpo en presencia de 2-ME y GuHCl.

(A) Se evaluó la unión en ELISA indirecto a gliadinas inmobilizada de los fagos VHH seleccionados (13,18, 26 y 33) y el anticuerpo monoclonal 1B4E9 en GuHCl 0,5 mol/L y diferentes concentraciones de 2-ME. (B) Unión del fago-VHH26 y (C) del anticuerpo monoclonal 1B4E9 en presencia de diferentes combinaciones de 2-ME y GuHCl. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DS de la relación de DO referida a la misma dilución de anticuerpo sin aditivos (relación=1). Los resultados mostrados corresponden al promedio de duplicados de un experimento representativo.

2.3.3. Reactividad de los clones seleccionados contra otras proteínas vegetales

Los métodos utilizados para la certificación de alimentos libres de gluten requieren la detección específica de las proteínas tóxicas. Para evitar falsos positivos los anticuerpos empleados en los ensayos cuantitativos no deben reconocer proteínas inocuas de otras fuentes utilizadas comúnmente en la manufactura de alimentos. Con el fin de evaluar la reactividad de los clones seleccionados se realizó un ELISA competitivo secuencial en placas sensibilizadas con extracto etanólico de harina de trigo a una concentración de 10 μ g/ml. La unión de los fagos-VHH a gliadinas en fase sólida se compitió con proteínas en fase soluble provenientes del extracto etanólico de trigo, cebada, centeno, maíz, soja o arroz (Figura 2.9.).

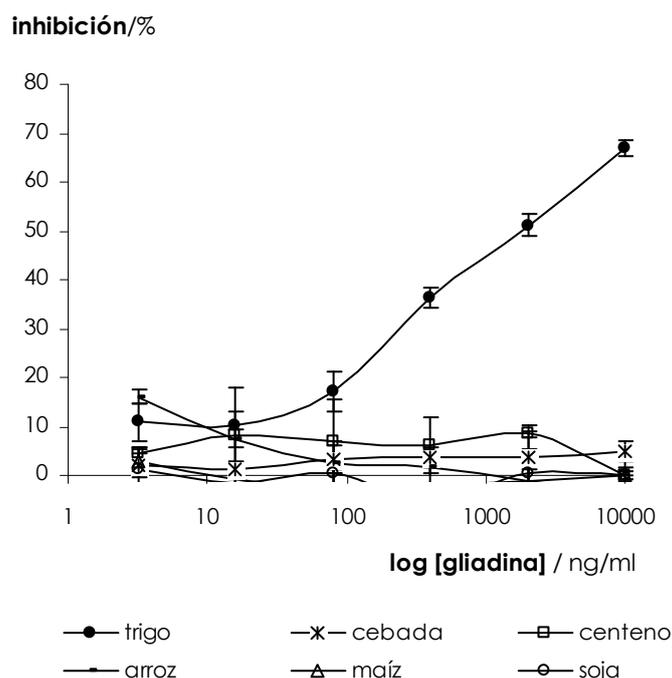


Figura 2.9. Reactividad del fago-VHH 26 frente a distintas proteínas.

Se realizó un ELISA competitivo secuencial en fosas sensibilizadas con extracto etanólico de trigo, compitiendo con extractos etanólicos de trigo, cebada, centeno, maíz, soja y arroz. Los resultados se expresan como el valor promedio de la inhibición \pm DS. Se muestran resultados de duplicados de un experimento representativo.

Los 6 clones evaluados mostraron el mismo comportamiento. Sólo el extracto de trigo compite por la unión a las gliadinas adsorbidas en la placa, mientras que los extractos proteicos de otros vegetales no afectan la interacción aún a concentraciones de 10 μ g/ml. Aunque las prolaminas de trigo, cebada y centeno presentan alta homología, y consecuentemente alta reactividad cruzada, los fagos-VHH seleccionados sólo reaccionaron con proteínas de trigo, sugiriendo que los epitopes reconocidos por los VHHs seleccionados sólo estarían presentes en gliadinas.

2.3.4. Análisis de secuencia de los clones seleccionados

El análisis de secuencia de los 6 clones de fagos-VHH seleccionados reveló que cuatro de ellos, los clones 11, 19, 33 y 36, tenían la misma secuencia, es decir que correspondían al mismo clon (**Figura 2.10.**). Disponemos entonces de 3 clones diferentes. Una situación similar ha sido descrita en otro sistema, como en una biblioteca contra una toxina, donde de 17 clones seleccionados sólo 6 eran diferentes [Anderson et al.2007].

Los clones 13 y 33 difieren en sólo un residuo presente en FR3. El clon 26 difiere del 33 en 10 residuos, tres de los cuales están en CDR3. Es notable que los 3 clones presenten un CDR3 largo de 20 residuos

Estos clones presentan las típicas sustituciones presentes en FR2. Es común encontrar en los VHHs descritos en bibliografía un puente disulfuro *interloop* entre Cys23-FR1 y Cys104-FR3. Aquí además se encontraron dos cisteínas adicionales en CDR3 separadas entre sí por 4 residuos, que presumiblemente podrían formar un puente disulfuro interno, disminuyendo la flexibilidad de este largo loop.

El análisis de secuencia muestra la naturaleza oligoclonal de la reactividad anti-gliadinas de los fagos-VHH seleccionados en condiciones agresivas de reacción (etanol, 2-ME y GuHCl). La oligoclonalidad del reconocimiento altamente estable en condiciones desnaturalizantes podría ser consecuencia de una solución estructural limitada frente a esta presión de selección.

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2
	20	30	40 50	60
13	GGGLVQAGGSLRLSCVAS	GRTFSSYT	MGWFRQAPGKEREFGA	VSWG GDT
33
26I	..A.....A..	S.....

Clon	FR3	CDR3	FR4	aa CDR3
	70 80 90 100	110 120		
13	YYADSV E-GRFTVSRVNAKNTVNIQMNSLKPEDAAVYYC	AEND-NY C SGY G CFDPMS--YDY	WGQG	20
33K.....	20
26K.....H.....Y.....Y.Y.G.....	..P.	20

Figura 2.10. Secuencia de los clones 13, 26 y 33.

Se muestran las secuencias alineadas de los 3 clones seleccionados, indicando las regiones CDR y FR. El clon VHH 26 se resalta en fondo gris. Además se indica la longitud de los CDR. Los residuos de cisteína están marcados en negrita.

2.3.5. Ensayos cuantitativos usando fagos-VHH

2.3.5.1. Optimización de un ELISA competitivo secuencial

Con los 3 clones seleccionados en base a sus características de estabilidad, y luego de comprobar que reconocían específicamente gliadinas, se comenzó a diseñar un ensayo inmunoquímico que pudiera ser utilizado para la determinación cuantitativa de gliadinas.

Se optimizaron las condiciones de ensayo de un ELISA competitivo secuencial, obteniendo curvas dosis/respuesta similares para los 3 clones con muy bajos límites de detección (**Figura 2.11.**). En particular el ELISA desarrollado con el fago-VHH 26 mostró tener el menor límite de detección: 3,5 ng gliadinas/ml en comparación con 20 ng/ml y 15 ng/ml para los clones 13 y 33, respectivamente (calculado con un test t=0,99).

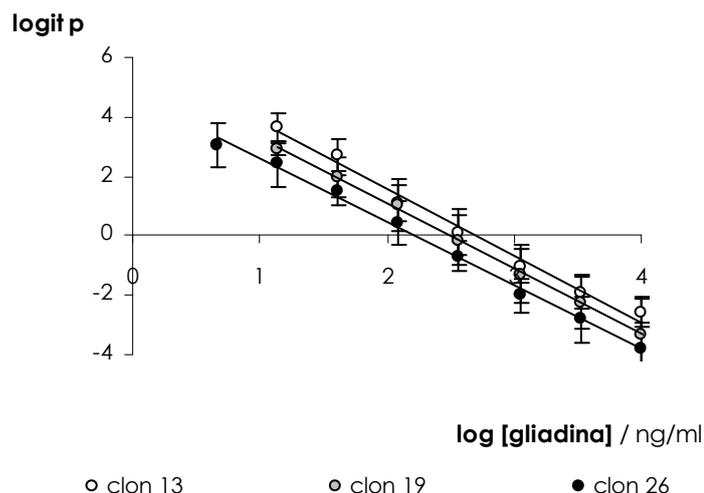


Figura 2.11. ELISA competitivo usando fagos-VHH.

Curvas de calibración con gliadina estándar (desde 10000 ng/ml a 4,5 ng/ml, diluciones 1:3) usando los clones 13, 19 y 26. Los resultados son el valor promedio \pm DS de 4 curvas independientes

2.3.5.2. Interferencia de etanol, 2-ME y GuHCl en ensayos cuantitativos

2.3.5.2.1. Interferencia de etanol

Se evaluó el efecto del etanol sobre el ensayo cuantitativo desarrollado con el fago-VHH26. Para esto se prepararon diluciones de gliadinas estándar en buffer conteniendo distintas concentraciones de este solvente.

Como era de esperar teniendo en cuenta los resultados anteriores, la presencia de etanol 15% no modificó la curva de calibración, aunque se observó un leve corrimiento de la curva hacia mayores concentraciones (**Figura 2.12.**). Sin embargo, la curva se alteró con concentraciones de etanol superiores a 20%. En este caso la interferencia se hace significativa a bajas concentraciones de gliadinas perdiendo linealidad por debajo de 100 ng gliadinas/ml.

Según estos resultados, este ensayo es apto para ser usado en el análisis de muestras conteniendo 15% de etanol, es decir realizando sólo una dilución 1:4 del extracto etanólico (concentración de etanol 60%) de la muestra.

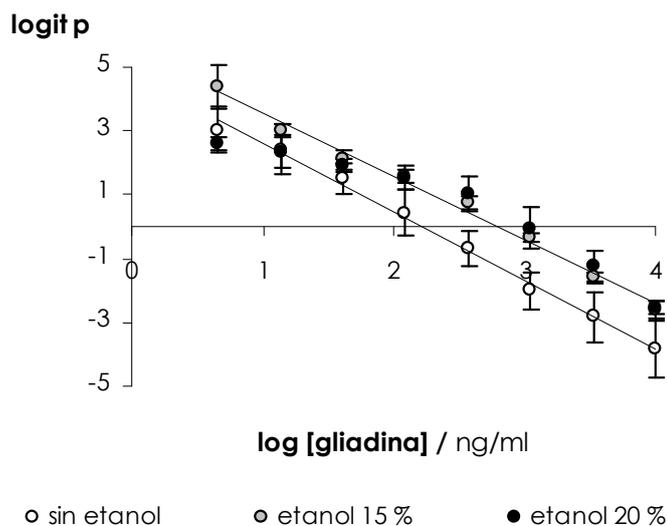


Figura 2.12. ELISA competitivo usando fagos-VHH en presencia de etanol.

Interferencia de etanol en el ensayo cuantitativo con el fago-VHH26. Las curvas de calibración se prepararon en PBS, etanol 15% o etanol 20%. Los resultados son el valor promedio \pm DS de 8 curvas independientes (2 ensayos independientes, cada uno con 4 curvas).

2.3.5.2.2. Interferencia de 2-ME y GuHCl

Para estudiar la interferencia de 2-ME y GuHCl en la cuantificación de gliadinas, se preparó una solución de gliadinas estándar con una concentración 500 ng/ml en buffer conteniendo diferentes combinaciones de aditivos, y se comparó el resultado obtenido para la muestra control (la misma muestra sin aditivos).

Empleando el fago-VHH26 en ELISA competitivo se observó una importante interferencia para concentraciones superiores a 2-ME 0,1% y GuHCl 0,01 mol/L, máxima concentración a la cual este método sería aplicable (**Figura 2.13.**). La presencia de 0,5% de 2-ME produjo una importante sobreestimación de la concentración, independientemente de la presencia de GuHCl. Resultados similares se obtuvieron con los clones 13 y 33.

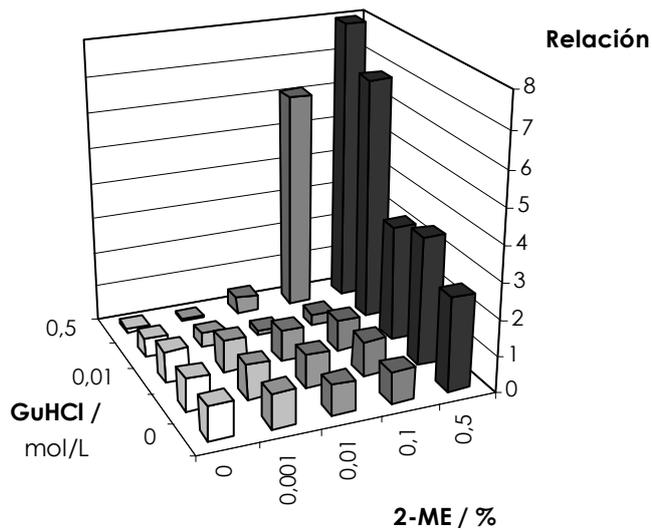


Figura 2.13. Interferencia de 2-ME y GuHCl en ELISA competitivo con el fago-VHH 26.

Se preparó una solución de gliadina estándar en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME y GuHCl y se analizó mediante ELISA competitivo con el fago-VHH 26. Los resultados se expresan como el valor promedio de la relación de concentraciones referida a la misma muestra sin aditivos (Relación=1).

2.3.5.2.3. Efecto de la desnaturalización del antígeno sobre la detección por fagos-VHH

Según los resultados mostrados en el capítulo 1, la interferencia en la interacción antígeno/anticuerpo puede deberse al cambio en la estructura del antígeno y/o del anticuerpo, hecho que modifica los parámetros cinéticos que definen el equilibrio de esta interacción. Por tal motivo, se analizaron muestras de gliadina estándar pretratadas con 2-ME y GuHCl, y diluídas (antes de realizar el ensayo) para eliminar el posible efecto directo de los aditivos sobre el fragmento VHH. Este estudio mostró que el efecto producido sobre el antígeno ocasiona una pérdida de reconocimiento por parte de los fragmentos VHH al incrementar la concentración de 2-ME, mientras que el GuHCl produce el efecto contrario (**Figura 2.14.**)

Para la combinación 2-ME 0,5 % y GuHCl 0,5 M, el reconocimiento del antígeno empleando el clon VHH26 fue el 52 % con respecto al antígeno no tratado. Resultados similares se obtuvieron con los clones 13 y 33. Aunque los VHHs fueron más resistentes a condiciones agresivas que los anticuerpos convencionales, también existe una pérdida de reconocimiento al alterarse la conformación del antígeno, interfiriendo de esta manera en la cuantificación.

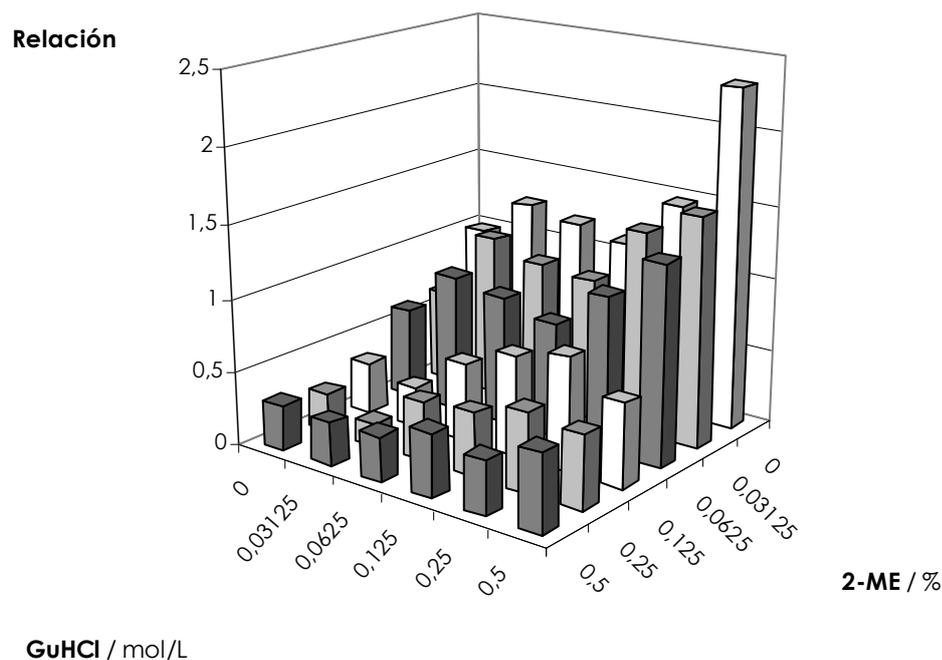


Figura 2.14. Efecto del tratamiento con 2-ME y GuHCl en la determinación de gliadinas por ELISA competitivo con fagos-VHH.

Se incubaron soluciones de gliadina estándar (500 $\mu\text{g/ml}$) a 50°C durante 40 minutos en buffer conteniendo diferentes concentraciones de 2-ME (0% – 2%) y GuHCl (0 – 2 mol/L). Luego, cada muestra fue diluída 1000 veces en buffer sin aditivos y la concentración de gliadinas se determinó por ELISA competitivo usando el fago-VHH 26. Los resultados se expresan como el valor promedio de la relación de concentraciones determinadas, referida al control sin aditivos (Relación=1). Se muestran duplicados de un experimento representativo

2.3.6. Producción y caracterización del fragmento VHH 26 como proteína soluble

2.3.6.1. Expresión y purificación del fragmento VHH26 soluble

En base a los resultados previos, se seleccionó el clon VHH26 por sus características de estabilidad en etanol, 2-ME y GuHCl, y por su capacidad de generar un ensayo cuantitativo con el mejor límite de detección. Para obtener dicho fragmento en forma soluble se reclonó en un vector de expresión. Para esto se amplificó el VHH26 inserto en el vector pHEN2 con los *primers* VH6Back-Sfil y Lamb9-EcoRI. Después de digerir el fragmento purificado se insertó en el vector pAB1 predigerido, para finalmente transformar *E. coli* HB2151.

Se probaron distintas condiciones de expresión en cuanto a tiempo y temperatura de inducción para tener una mayor eficiencia en la producción. También se evaluó el uso de 2XYT o LB como medio de cultivo. La evaluación de las distintas condiciones se realizó mediante Western Blotting a partir del cultivo, por comparación de la intensidad de las bandas correspondientes al VHH. A partir de este análisis se optimizó el protocolo de inducción (4 horas a 37°C en medio LB).

Luego de expresar la proteína en el espacio periplásmico de la bacteria, se extrajo mediante un shock osmótico, cambiando el medio con sacarosa 500 mM a 125 mM. El fragmento obtenido se purificó por FPLC en una columna de Ni²⁺ aprovechando la presencia de una cola de Histidina presente en el vector de expresión. Las proteínas extraídas y las fracciones provenientes de la purificación se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida, y se comprobó la identidad de la banda por Western Blot (**Figura 2.15.**). Si bien después de este paso hubo un importante enriquecimiento en la proteína de interés, se realizó una segunda purificación por FPLC en una columna de intercambio iónico, para asegurar la pureza de la preparación. La cantidad de producto purificado obtenido fue aproximadamente de 5 mg/l de cultivo.

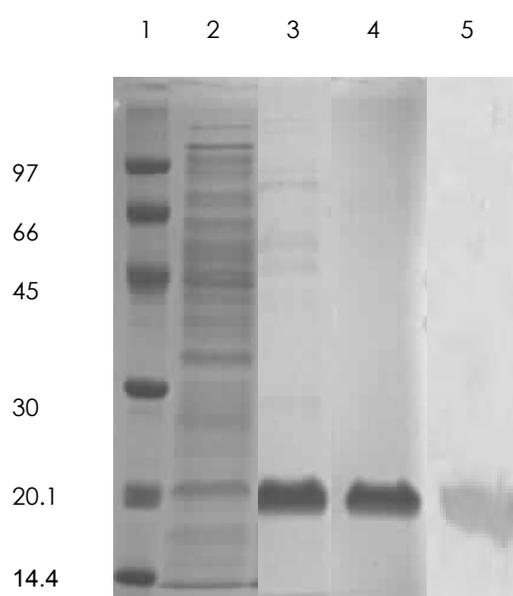


Figura 2.15. Producción de VHH 26 soluble.

Gel SDS-PAGE 17 % teñido con Coomassie blue. **(1)** Marcador de Peso Molecular **(2)** proteínas extraídas del espacio periplásmico de *E. Coli* **(3)** primera purificación: FPLC con columna Hi-Trap **(4)** Segunda purificación: FPLC con columna de intercambio catiónico MonoS **(5)** Western Blot correspondiente del monómero VHH detectado mediante un anticuerpo anti- Histidina.

2.3.6.2. Determinación de la constante de afinidad de la interacción fragmento VHH26/gliadinas

El VHH26 purificado se utilizó para medir su afinidad por distintas preparaciones de gliadinas (Sigma, PWG y extracto etanólico de harina variedad Oasis) en un biosensor lasys.

2.3.6.2.1. Inmovilización a la superficie del sensor

Para estudiar la interacción entre dos moléculas mediante el uso de un biosensor es necesario acoplar uno de los componentes del complejo a la superficie del *chip* sensor y pasar el otro componente, en estado soluble, sobre dicha superficie para que se produzca la unión. El acople de un componente al hidrogel del *chip* provee condiciones más favorables que el uso de la adsorción directa a la superficie debido a que en el primer caso

las moléculas están más accesibles y “flotando” libremente en sus 3 dimensiones adoptando un comportamiento similar al que tendrían en solución.

El primer paso en la inmovilización de un ligando al *chip* es la pre-concentración que se basa en el establecimiento de interacciones electrostáticas entre grupos carboxilos no modificados de la superficie del sensor y las cargas positivas del ligando. Esta interacción es influenciada principalmente por el pH y la fuerza iónica del buffer. Es necesario usar un buffer cuyo pH esté por debajo del punto isoeléctrico (pI) del ligando y preferiblemente por arriba del pKa de los grupos carboxilos, el cual es próximo a 3,5. Por otro lado, la reacción de acoplamiento entre los grupos amina de la proteína y la superficie de la matriz activada con ésteres de N-hidrosuccinimida, demanda grupos aminos del ligando no cargados, y es entonces favorecido por alto pH. Además del pH, es importante que el buffer de acoplamiento tenga una fuerza iónica baja para favorecer las interacciones electrostáticas entre el hidrogel y el ligando. Es importante tener presente que en este tipo de inmovilización no se deben usar buffers que contengan grupos aminas primarias debido a que interfieren con los grupos aminas de los ligandos a inmovilizar.

En una primera aproximación las gliadinas se inmovilizaron al *chip*. Debido a la gran heterogeneidad del sistema, compuesto por cientos de proteínas con un rango de puntos isoeléctricos, no fue posible encontrar las condiciones que permitieran asegurar un buen acoplamiento. Por tal motivo se procedió a la inmovilización del VHH26.

Nuestra primer elección de buffer fue el acetato de sodio 10 mM pH= 5,3, el cual mostró ser efectivo, obteniendo una eficiencia de acoplamiento de 150 arco segundos.

2.3.6.2.2. Medición de la afinidad

Luego de la inmovilización del fragmento VHH26 en el *chip* se procedió a la medida de afinidad. Debido a las particularidades del sistema antigénico fue necesario hacer modificaciones sobre el protocolo estándar para poder realizar las medidas.

Para estudiar la **asociación** se ponen en contacto soluciones de distinta concentración de ligando con el VHH26 acoplado al *chip*. Antes de adicionar la solución de proteínas se estabiliza una línea de base con el mismo buffer en el que están disueltas (en este caso PBS-Tween 0,05%, PBS-T). Al unirse al VHH26 se produce un aumento en la señal. Sin embargo, como el stock de gliadinas está en etanol 60%, al diluirlo a la concentración correspondiente, el etanol residual da origen a un cambio en el índice de refracción del medio cuyo efecto es el aumento de la señal, que interfiere en el análisis de las curvas de asociación. Por tal motivo fue necesario establecer, para cada concentración de muestra, la línea de base con el contenido de etanol correspondiente.

Par analizar el proceso de **disociación** se debe primero alcanzar el equilibrio para luego adicionar el buffer de dilución. En este caso también fue necesario que el PBS-T contuviera la cantidad de etanol correspondiente a cada muestra.

Después de pasar cada muestra es necesario **regenerar** la superficie, para eliminar el ligando unido y que el sistema vuelva a las condiciones iniciales. Normalmente se emplean soluciones ácidas (ej. HCl 10 mM) pero en este caso no fue efectivo. Encontramos que el etanol 18% en PBS-T era la forma de regeneración más eficiente.

En la **figura 2.16.** se muestra un ejemplo de la cinética obtenida para una solución de gliadinas. El mismo procedimiento se realizó por duplicado para al menos 5 concentraciones diferentes, con cada una de las tres fuentes de gliadinas.

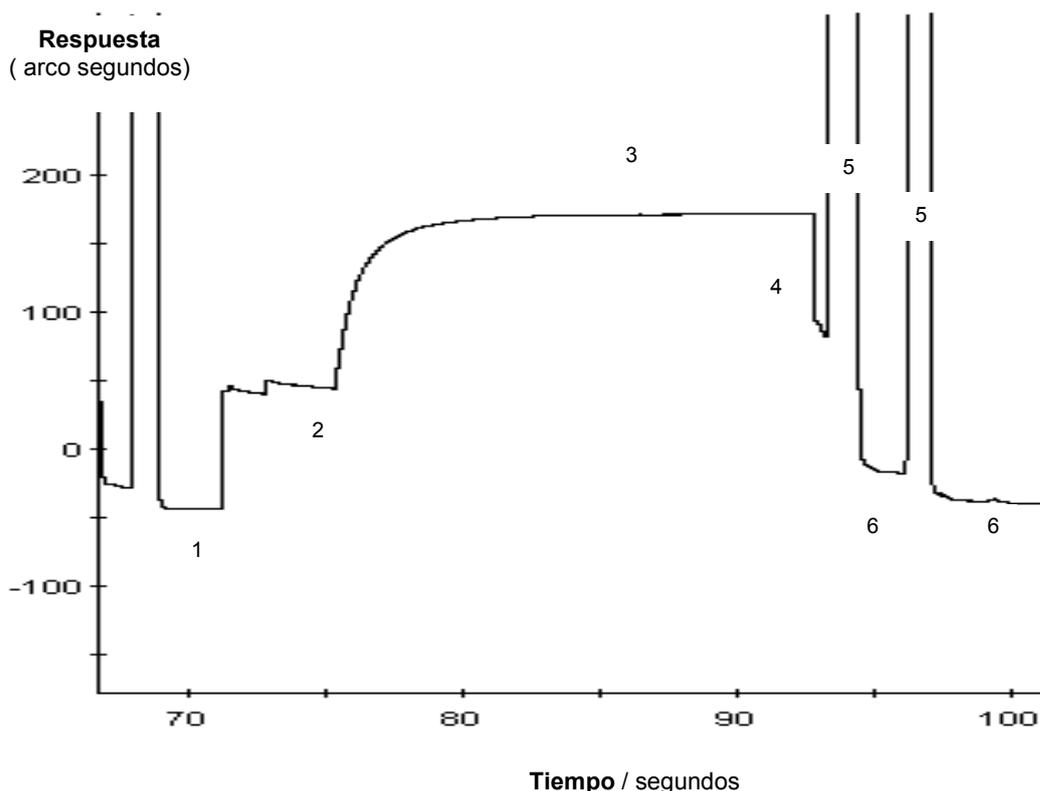


Figura 2.16. Medida de la cinética de asociación y disociación

(1) línea de base con PBS-T (2) línea de base con PBS-T y etanol a igual concentración que la dilución de gliadinas (3) curva de asociación (4) curva de disociación (5) regeneración (6) estabilización con PBS-T.

2.3.6.2.3. Análisis de los datos de los estudios cinéticos

Análisis de la asociación

La cantidad de complejo formado en el tiempo t, denominado [C]t, está dado por:

$$[C]_t = [C]_{eq} [1 - \exp(-k_{on} t)]$$

En esta ecuación, [C]eq es la concentración del complejo en el equilibrio. kon es la constante de pseudoprimer orden para la interacción antígeno/anticuerpo, donde:

$$k_{on} = k_{ass}[Ag] + k_{diss}$$

Así, kon varía con la concentración de ligando, en este caso el antígeno.

La respuesta del instrumento R (medida en arco segundos) es proporcional a la masa de ligando unido, lo que resulta en:

$$R_t = (R_{eq} - R_0)[1 - \exp(-k_{on}.t)] + R_0$$

Donde Rt es la respuesta a tiempo t, R0 es la respuesta inicial y Req es la respuesta máxima

Los parámetros mencionados son determinados experimentalmente, quedando como única incógnita k_{on} . Se pueden obtener múltiples determinaciones de k_{on} mediante experimentos de asociación a varias concentraciones de ligando.

Así, un gráfico de k_{on} en función de la concentración de ligando correspondiente permite la determinación de k_{ass} (pendiente) y k_{diss} (ordenada).

Dado que el valor de k_{diss} es cercano a cero, la determinación a partir de este gráfico tiene mucho error, por lo que se determina mediante el análisis directo de los datos de disociación.

Análisis de la disociación

Para la determinación de k_{diss} es necesario remover el ligando libre de la cuveta, reemplazándolo por buffer de interacción. La respuesta disminuye debido a la disociación del ligando del complejo.

La curva de disociación es descripta por la siguiente ecuación:

$$R_t = R_0 \exp(-k_{diss} t)$$

En teoría, en un solo experimento se puede obtener el valor de k_{diss} , pero es conveniente realizar varias determinaciones para obtener un valor más significativo.

Con los resultados obtenidos para k_{ass} y k_{diss} se puede calcular K_D como

$$K_D = k_{diss}/k_{ass}$$

Para el análisis de los datos se requiere expresar la concentración de ligando como concentración molar. Como en este caso el ligando corresponde a gliadinas, que constituyen un sistema proteico compuesto por cientos de proteínas con un rango de pesos moleculares, para el cálculo se consideró como peso molecular "promedio" el valor de 35 kDa.

Mediante el análisis descripto se obtuvieron las constantes correspondientes a la interacción del VHH26 con las tres fuentes de gliadinas (**Tabla 2.2.**)

Tabla 2.2. Análisis cinético de la interacción VHH 26/gliadinas. Análisis cinético de la reacción de diferentes preparaciones de gliadinas con VHH 26, determinado mediante un biosensor IAsys.

Gliadina	$K_{ass}(M^{-1}s^{-1})$	$K_{diss}(s^{-1})$	K_D (nM)
Sigma	1.2×10^4	2.1×10^{-2}	1.7
Oasis	2.4×10^4	2.1×10^{-2}	0.89
PWG	1.7×10^4	1.2×10^{-2}	0.69

Los resultados obtenidos en los valores de KD muestran que el VHH26 reconoce las tres fuentes de gliadinas con una afinidad comparable. Esto es de relevancia ya que en los ensayos de cuantificación empleando el fragmento VHH26, el valor informado sería menos dependiente de la variabilidad entre gliadinas de distintos orígenes.

2.3.6.3. Desarrollo de ensayos cuantitativos empleando VHH 26 soluble

En función de los resultados obtenidos en las secciones anteriores empleando el fago-VHH26, se evaluó el uso del fragmento VHH26 soluble en la generación de ensayos cuantitativos para la detección de gliadinas.

En una primera aproximación, se empleó el VHH26 soluble en ELISA competitivo sin obtener una curva dosis/respuesta adecuada. Por tal razón, se realizó la optimización de un ELISA de captura, combinando el VHH26 con tres anticuerpos monoclonales anti-gliadinas de nuestro panel, en las dos combinaciones posibles: capturando con el anticuerpo monoclonal y empleando el VHH26 como segundo anticuerpo, o al revés.

De los tres anticuerpos monoclonales probados, el 3B4H1 fue el único capaz de producir una adecuada diferencia de señal entre el blanco y una muestra positiva. Esto sugiere que los otros dos anticuerpos monoclonales, que son funcionales en cualquier otro formato de ELISA, podrían tener un impedimento estérico al reconocer epitopes similares o cercanos espacialmente a los reconocidos por el VHH26.

Por lo tanto, una vez ajustadas las condiciones del ensayo en base al par mAb 3B4H1/VHH26, se evaluó la curva dosis/respuesta en los dos formatos mencionados. Se obtuvo un mejor límite de detección (6 ng gliadinas/ml) capturando con el VHH26 que capturando con el 3B4H1.

El hecho que este formato produzca una adecuada curva de calibración constituye una importante ventaja, ya que siendo el VHH26 el anticuerpo de captura se podría aplicar la muestra en presencia de etanol, sin provocar interferencia. Para confirmar esta hipótesis, se construyó la misma curva dosis respuesta en presencia de etanol 15%. Encontramos que el VHH26 soluble mantiene la misma resistencia al etanol que el fago VHH26 (**Figura 2.17**).

Por otro lado, no hubo diferencias en las curvas obtenidas con el estándar comercial Sigma y el PWG (**Figura 2.17**), resultado que está de acuerdo con lo obtenido en las medidas de afinidad. Esto introduce una ventaja adicional ya que permite la evaluación de muestras de alimentos fabricadas con trigos de muy distintos orígenes sin causar diferencias en la respuesta cuantitativa del ensayo.

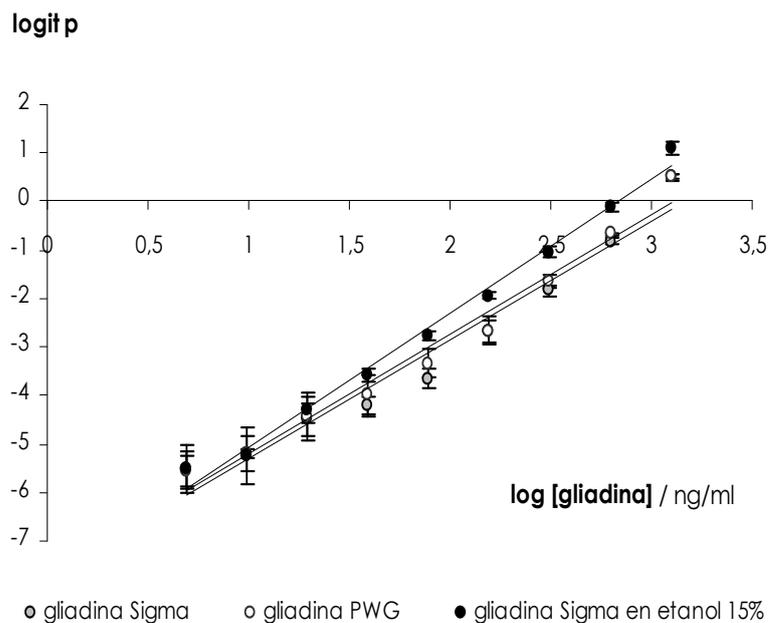


Figura 2.17. Curvas de calibración del ELISA de captura con VHH26 soluble.

Las curvas de calibración se prepararon usando como estándar: gliadina comercial (Sigma), gliadina PWG o gliadina comercial (Sigma) en buffer conteniendo etanol 15%. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm DS de 4 ensayos independientes.

2.3.6.4. Determinación del contenido de gliadinas en muestras comerciales

Las etapas previas de optimización de las condiciones del ensayo se realizaron utilizando gliadina estándar. Para comprobar si el ensayo es aplicable en el análisis de alimentos se seleccionaron productos comerciales de distintas características (formulación y proceso de fabricación) y con diferente contenido de gliadinas. Los mismos extractos de las muestras comerciales fueron analizados en paralelo por un ELISA competitivo secuencial que emplea anticuerpos policlonales anti-gliadinas (método de certificación empleado de rutina en nuestro laboratorio para la certificación de productos libres de gluten). Los resultados obtenidos sobre 21 muestras mediante este nuevo ensayo correlacionaron con los obtenidos en el ensayo competitivo (**Tabla 2.3.**).

Cabe destacar que fue posible detectar la presencia de gliadinas en dos muestras que tenían una concentración inferior al límite de detección del ensayo competitivo. De esta manera, se puede concluir que el ELISA de captura basado en el fragmento VHH26 es operativo en el análisis de muestras comerciales y que tiene una detectabilidad real superior a la del método usado actualmente. De la misma manera resulta superior a los ensayos comerciales disponibles en el mercado.

Tabla 2.3. Determinación cuantitativa de gliadinas en muestras comerciales. Los resultados se expresan en ppm. nd: no detectable.

muestra	ELISA competitivo	ELISA VHH soluble
cacao	nd	nd
fécula de mandioca	nd	nd
galleta de arroz	nd	nd
gelatina	nd	nd
merengue	nd	nd
mermelada	nd	nd
salchicha	nd	nd
galletita de vainilla	nd	0,04
galletita de almendra	nd	0,06
bondiola	0,1	0,17
caldo de finas hierbas	2,6	1,1
caldo de gallina	1,1	1,7
caldo de verduras	1,6	1,2
canela	0,1	0,3
chorizo	0,3	0,26
condimento para pizza	3	4
galletita de vainilla	0,1	0,2
helado	20	22
longaniza	18	7,7
pimentón	54	63
premezcla	0,7	2,5
sopa espárragos	4,2	1,3
tapa alfajor	5,1	14

2.3.7. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH con capacidad de reconocer gliadinas desnaturalizadas

Como los clones seleccionados inicialmente a partir de nuestra biblioteca no fueron capaces de reconocer gliadinas desnaturalizadas, se intentó un nuevo proceso de selección empleando la misma biblioteca, pero sensibilizando las fosas con gliadinas desnaturalizadas (pretratadas con 2-ME 2% y GuHCl 2M durante 40 minutos a 50 °C). Luego de realizar 3 rondas de selección no se encontraron diferencias significativas en el número de partículas de fago eluidas de las fosas sensibilizadas y de los controles de unión inespecífica (fosas sin sensibilizar). Aún así, se realizó la producción de fagos a partir de 250 colonias aisladas para evaluar la reactividad anti-gliadinas desnaturalizadas, sin obtener resultados positivos.

Con el objetivo entonces de obtener una nueva biblioteca, se inmunizaron dos Llamas con un extracto de harina de trigo obtenido en presencia de etanol 60%, 2-ME 2% y GuHCl 2 mol/L. Luego de tres inoculaciones, el suero de las Llamas fue analizado en ELISA indirecto. La respuesta frente al antígeno desnaturalizado (Llama 5024) es mayor que en el suero de la Llama a partir de la cual se realizó la construcción de la primera biblioteca (Llama 9204) (**Figura 2.17.**), indicando que existe una mayor reactividad contra el antígeno de interés.

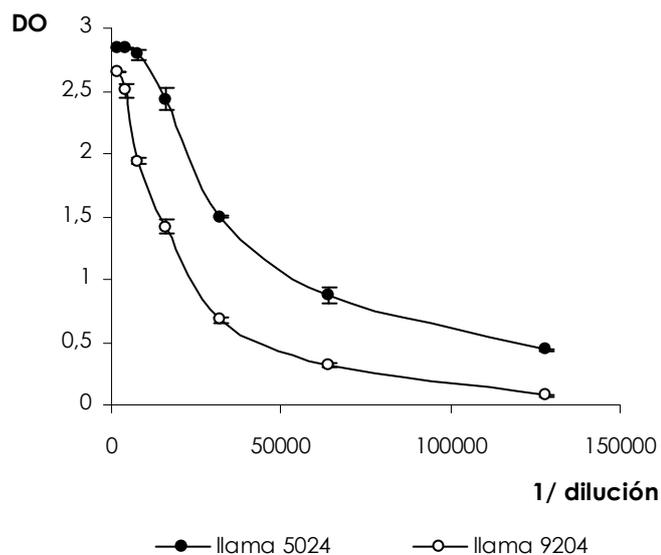


Figura 2.17. Reactividad de sueros de llama frente a gliadinas desnaturalizadas.

Titulación por ELISA indirecto de la reactividad anti-gliadinas desnaturalizadas del suero de las Llamas 9204 (primera biblioteca) y 5024 (segundo plan de inmunización).

Se espera que a partir de células de sangre periférica de esta Llama se pueda generar una segunda biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHHs que reconozcan al antígeno desnaturalizado con mayor afinidad, trabajo que se encuentra en ejecución.

2.4. Discusión

Para realizar la cuantificación de gliadinas en alimentos destinados a enfermos celíacos estas proteínas deben ser extraídas de la matriz del producto en análisis. El buffer de extracción, ya sea el solvente convencional (etanol 60%) o la mezcla propuesta por el grupo del Dr. Mendez (que incluye 2-ME 2% y GuHCl 2 mol/L) [García et al.2005] producen modificaciones en la estructura de los anticuerpos que alteran su reactividad. Para reducir la interferencia es necesario diluir las muestras extraídas previo al ensayo inmunoquímico. Esto puede conducir a que en aquellos productos con un contenido muy bajo de gliadinas, la concentración en la muestra previa al ensayo pueda quedar por debajo del límite de detección del método y el producto resulte finalmente informado como falso negativo.

Los anticuerpos de cadena pesada de camélidos han sido utilizados en numerosas aplicaciones biotecnológicas debido a sus propiedades fisicoquímicas particulares. En este trabajo son de especial interés por su mayor estabilidad frente a condiciones agresivas de reacción.

Hemos obtenido una biblioteca de expresión en fagos de fragmentos VHH anti-gliadinas, a partir de la cual se seleccionaron los clones más estables en presencia de agentes desnaturizantes con el fin de generar ensayos cuantitativos.

Luego de la tercera ronda de selección se obtuvieron 44 clones capaces de reconocer gliadinas en ELISA indirecto. Debido a la variabilidad en la producción a mayor escala para realizar los estudios de estabilidad sólo fue posible trabajar con 28 de los clones originales. Como primer criterio de selección, se eligieron aquellos clones que conservasen más del 80% de reactividad en etanol 15%. Se obtuvieron 6 clones (11, 13, 19, 26, 33 y 36) estables en etanol. En forma independiente se analizó la estabilidad de estos 28 clones frente a 2-ME y GuHCl, encontrando que los más estables eran los mismos 6. Este hallazgo correlaciona con la observación que las mismas mutaciones que protegen contra algún tipo de estrés externo también protegen contra otras formas de estrés. Por ejemplo, los VHH seleccionados por su estabilidad en una mezcla detergente también mostraron mayor resistencia en urea y GuHCl [Dolk et al.2005].

El análisis de secuencia de los seis clones mencionados mostró que cuatro de ellos (11,19, 33 y 36) tenían la misma secuencia. Por lo tanto, contamos con sólo tres clones independientes de secuencia distinta: 13, 26 y cuatro que son iguales (11,19, 33 y 36). Es interesante destacar que estas tres secuencias, tienen en común un CDR3 de 20 aminoácidos, más largo que el encontrado usualmente en los HCABs de Llama (15 aminoácidos). Además, tienen una cisteína extra en CDR3, que podría formar un puente disulfuro estabilizando este loop de mayor longitud. El hecho que este cambio se encuentre conservado en los 3 clones más estables podría ser responsable de una mayor estabilidad estructural y mayor resistencia a agentes desnaturizantes.

La certificación de alimentos libres de gluten requiere el empleo de anticuerpos específicos de las proteínas tóxicas. En particular, dichos anticuerpos no deben interactuar con proteínas de otros vegetales usados como sustitutos del trigo en la fabricación de alimentos, como arroz, soja o maíz. Mediante ELISA de inhibición se comprobó que los clones seleccionados (13,33 y 26) eran específicos para trigo, sin observar reacción cruzada aún a altas concentraciones con los otros vegetales. Estos clones tampoco reconocen proteínas de cebada y centeno, a pesar del alto grado de homología con trigo.

A partir de cada uno de estos clones de fagos VHH anti-gliadinas fue posible desarrollar un ensayo cuantitativo, en el formato de ELISA competitivo secuencial con adecuados límites de detección: 3,5, 15 y 20 ng/ml para los clones 26, 33 y 13, respectivamente.

Aunque estos clones mantienen su actividad en presencia de agentes reductores y desnaturizantes, tienen menor afinidad por el antígeno parcialmente desnaturizado. Si bien la caída en el reconocimiento no es tan drástica como para los anticuerpos monoclonales, este efecto conduce a errores en el ensayo cuantitativo. Este problema se podría solucionar seleccionando clones que además de ser estables en las condiciones de aplicación sean capaces de reconocer al antígeno desnaturizado. En este sentido, es posible generar nuevos anticuerpos con las características buscadas utilizando otras estrategias de inmunización y selección. Dicha estrategia ya la hemos iniciado.

Por otro lado, observamos que la curva de calibración con el fago VHH26 en presencia de etanol 15% no se alteró. Teniendo en cuenta que la extracción se realiza en etanol 60%, una dilución 1:4 de la muestra antes del ensayo inmunoquímico es suficiente para eliminar la interferencia. Dado que en los ensayos basados en anticuerpos convencionales es necesario realizar una dilución 1:20, nuestro desarrollo permite incrementar en cinco veces la capacidad de detección.

Aunque el uso de fagos-VHH permite una gran amplificación de la señal debido a la multiplicidad del antígeno de la cápside viral M13, estos tienen una menor vida media y la producción es muy variable. Por este motivo decidimos emplear un sistema de expresión que permita obtener el clon VHH26 como proteína recombinante soluble.

Cuando analizamos el VHH26 soluble en inmunoensayos, encontramos que no permitió desarrollar un ELISA competitivo secuencial, pero si pudimos optimizar ensayos cuantitativos en el formato de ELISA de captura al combinarlo con el mAb anti-gliadinas 3B4H1. Ambos esquemas, captura con VHH26 o con el mAb 3B4H1 funcionaron adecuadamente, aunque la mayor eficiencia analítica se obtuvo empleando el VHH26 como anticuerpo de captura. Este hecho nos conduce a una situación que es particularmente favorable ya el anticuerpo de captura (en este caso el VHH26, que es el fragmento VHH más estable) es el que debe soportar el solvente en el que se encuentra el antígeno.

El VHH26 soluble mantuvo las mismas propiedades de estabilidad en etanol que el fago-VHH26. Observamos, de acuerdo a lo previsto, que la curva de calibración (y la eficiencia analítica del ensayo) en presencia de etanol 15% fue equivalente a la curva control sin el agregado de etanol. Por lo tanto, con el fin de seleccionar clones con determinadas propiedades, la tecnología de *display* en fagos ha resultado de mucha utilidad, y en especial los VHHs obtenidos como proteínas recombinantes han conservado las propiedades del fago-VHH de origen.

Como el sistema proteico en estudio es muy heterogéneo, la afinidad de un anticuerpo puede variar dependiendo de la fuente de gliadinas empleada. Por tal motivo se determinó por biosensor la afinidad de la interacción del VHH26 con gliadinas provenientes de distintos orígenes: gliadinas comercial (Sigma) ampliamente usada, el estándar preparado por el PWG, y un extracto etanólico de una variedad de trigo local. La afinidad resultó ser comparable para las tres fuentes de gliadinas, lo cual indica que el reconocimiento del conjunto de epitopes es similar para los casos estudiados. Esto está de acuerdo con lo hallado al comparar las curvas de calibración obtenidas con gliadina comercial (Sigma) y el estándar del PWG. Los valores obtenidos para la constante de disociación están en el orden nanomolar, correspondiendo a valores obtenidos para otros VHHs descritos en bibliografía [Conrath et al.2009] [Anderson et al.2007]. La menor complejidad estructural de las VHHs facilitaría también la aplicación de técnicas de biología molecular para aumentar su afinidad, como la pentamerización de unidades VHH [Zhang et al.2004].

El ensayo generado (ELISA empleando el VHH26 como anticuerpo de captura) mostró además ser aplicable al análisis de muestras comerciales, y superior al empleado de rutina en nuestro laboratorio para la certificación de alimentos libres de gluten.

El uso de VHHs en inmunoensayos tiene varias ventajas con respecto a los anticuerpos convencionales. Además de su mayor estabilidad, estos son producidos más fácilmente, a menor costo y con mayor rendimiento. Si bien en este caso la expresión se realizó en bacterias, está descrito que los VHHs recombinantes se pueden obtener con un mayor rendimiento en otros sistemas de expresión, como levaduras [Rahbarizadeh et al.2006] y plantas [Ismaili et al.2007].

2.5. Conclusión

En este trabajo se demuestra una nueva aplicación de los anticuerpos de cadena pesada de camélidos como unidades de reconocimiento capaces de generar inmunoensayos donde se requiere la detección específica de muy bajas concentraciones de antígenos en condiciones agresivas (etanol y 2-ME/GuHCl).

Se obtuvieron 3 clones específicos para proteínas de trigo que se destacaron por su estabilidad en estas condiciones, los cuales tienen en común un CDR3 más largo que lo habitual y una Cisteína adicional que podría estar involucrada en la estabilización de este dominio mediante la formación de un puente disulfuro interno.

Con estos fagos-VHH fue posible desarrollar ensayos cuantitativos en el formato de ELISA competitivo secuencial. El fago-VHH26 mostró ser aplicable en presencia de etanol 15%.

Los fragmentos VHH seleccionados presentan menor afinidad por el antígeno desnaturalizado haciendo incompatible su uso en muestras extraídas con 2-ME y GuHCl.

El clon 26 fue expresado como VHH soluble, permitiendo generar un ELISA de captura, también aplicable en etanol 15%. Este reconoce las distintas fuentes de gliadinas evaluadas con una afinidad comparable.

La determinación de gliadinas en muestras comerciales mostró que este ensayo es superior al empleado actualmente en nuestro laboratorio en cuanto a capacidad de detección y superior a los ensayos comerciales disponibles en el mercado.

2.6. Perspectivas

La menor afinidad por el antígeno desnaturalizado de los VHHs seleccionados dificulta su empleo en muestras extraídas con 2-ME y GuHCl. La generación de una biblioteca específica para gliadinas desnaturalizadas permitiría resolver este problema.

Utilizando distintas estrategias en la inmunización y en la selección, se pueden obtener anticuerpos con la especificidad deseada, que reconozcan por ejemplo el antígeno nativo y desnaturalizado, o que reconozcan cebada y centeno además de trigo.

Según la caracterización realizada del comportamiento de los VHH, es posible obtener a partir de una biblioteca de fagos-VHH, fragmentos con una estabilidad superior a los anticuerpos convencionales, que permitan luego desarrollar inmunoensayos cuantitativos empleando VHHs en forma soluble. Este procedimiento se podría realizar con los fagos-VHH que tengan la especificidad buscada, no sólo para la detección de prolaminas, sino también para cualquier otro sistema antigénico.

Una vez encontrado el VHH con las características óptimas se podrían obtener construcciones multivalentes, lo cual permitiría aumentar la afinidad,

Además se pueden evaluar otros sistemas de expresión que permitan obtener un mayor rendimiento en la producción de VHH soluble.

En conjunto, varias de estas estrategias podrán ser abordadas en trabajos futuros.

Capítulo 3

3.1. Introducción

Para numerosas aplicaciones en investigación y diagnóstico se necesitan métodos que combinen alta sensibilidad y especificidad. El aumento en la sensibilidad de los métodos de cuantificación de antígenos posibilitaría su detección aún en aquellos casos donde se presenten en muy baja concentración, expandiendo la aplicación de los anticuerpos a una amplia variedad de sistemas analíticos.

En un ensayo inmunoquímico tradicional una enzima conjugada a un anticuerpo convierte al sustrato en un producto detectable mediante espectrofotometría, cuya absorbancia se puede correlacionar con la concentración de antígeno presente en la muestra.

El aumento en la sensibilidad de un ensayo dado se puede lograr mediante modificaciones en el sistema de detección. Por ejemplo, la actividad de la enzima unida al segundo anticuerpo se puede evaluar mediante un sustrato que se transforma en un producto detectable por fluorescencia. La detección también se puede realizar cambiando el conjugado enzimático por un anticuerpo acoplado a un fragmento de DNA. Esta técnica, llamada Inmuno-PCR, se describe a continuación.

3.1.1. Inmuno-PCR

La PCR es una técnica analítica que permite una gran amplificación de señal posibilitando la detección de un pequeño número de oligonucleótidos o moléculas de ácido nucleico. La eficacia de esta técnica está basada en su enorme capacidad de amplificación de un segmento de ADN mediante *primers* específicos, obteniendo un elevado número de copias del fragmento amplificado. Por otro lado, la alta especificidad por la secuencia blanco está determinada por el par de *primers*, diseñados de forma de evitar la generación de falsas señales a partir de otras moléculas de ácidos nucleicos que pudieran estar presentes en las muestras.

Para extender la aplicabilidad de esta técnica a la detección de proteínas, Sano et al. 1992 [Sano et al.1992] desarrollaron el método de inmuno-PCR, acoplando la detección de antígenos mediante inmunoensayos a la PCR, para combinar la versatilidad del ELISA con el poder de amplificación de la PCR. Mientras que en ELISA una enzima conjugada a un anticuerpo (comúnmente, peroxidasa o fosfatasa alcalina) convierte al sustrato en un producto detectable espectrofotométricamente, en la inmuno-PCR un oligonucleótido se une al anticuerpo como marcador. El número de amplicones producidos a partir de este fragmento de DNA es proporcional a la cantidad inicial de antígeno a ser detectado.

3.1.1.1. Metodología

Debido a la gran sensibilidad de la amplificación por PCR, los requerimientos para Inmuno-PCR son mucho más estrictos que para un ELISA convencional, particularmente en cuanto a la síntesis del conjugado anticuerpo-DNA y al método de detección del DNA

amplificado. Estos dos pasos son la claves para convertir un determinado ELISA en una Inmuno-PCR altamente sensible [Niemeyer et al.2005].

3.1.1.1.1. Reactivos y formatos de ensayo

Para transformar un ELISA en inmuno-PCR hay que encontrar la forma de ligar el anticuerpo al oligonucleótido. En el trabajo inicial de Sano et al. (1992)[Sano et al.1992], utilizaron una quimera de proteína A-estreptavidina, capaz de unirse a la porción Fc de IgG y a DNA biotinilado respectivamente, pero este sistema no era compatible con una Inmuno-PCR basada en un ELISA de captura, ya que el reactivo se uniría tanto al anticuerpo de detección como al de captura produciendo señal aún en ausencia de antígeno. A pesar de esta limitación este formato fue usado en varias aplicaciones basadas en ELISA directo.

Para la aplicación en ELISA de captura es necesario unir el anticuerpo de detección al DNA reportero. Debido a la versatilidad y alta afinidad de la unión estreptavidina/ biotina muchos grupos han explorado este sistema de acoplamiento. El ensamblaje de complejos generadores de señal *in situ* mediante pasos sucesivos de incubación (anticuerpo biotinilado, (estrept) avidina, DNA biotinilado), inicialmente reportado por Zhou et al. [Zhou et al.1993], como Inmuno-PCR universal, es el formato más comunmente usado en la mayoría de las aplicaciones.

Sin embargo esta metodología tiene algunas desventajas. El equilibrio termodinámico debe ser alcanzado para cada una de las etapas de incubación. En el tiempo de una hora, empleado normalmente en los inmunoensayos, la formación del complejo inmune es incompleta y la señal obtenida es menor que empleando complejos presintetizados. Así, la eficiencia de un ensayo de Inmuno-PCR puede ser mejorada significativamente mediante el uso de conjugados proteína-DNA, conectados mediante mecanismos supramoleculares o por unión covalente.

En el primer caso, se ensamblan redes mediante DNA bis-biotinilado y estreptavidina como agente de entrecruzamiento. La elección cuidadosa de los parámetros de la reacción (concentración y relación de reactivos) conduce a la formación de redes ramificadas bidimensionales que contienen un gran número de estreptavidinas terminales. Estas proveen sitios de unión para anticuerpos biotinilados. La eficiencia de estos reactivos oligoméricos es superior a la de los conjugados monoméricos convencionales [Niemeyer et al.1999] [Adler 2005].

En el segundo caso, la producción de estos conjugados, anticuerpo-DNA, no es sencilla, ya que muchos anticuerpos son inestables como para soportar las condiciones del acoplamiento químico y en particular, los indispensables pasos de purificación por cromatografía, ya que aún pequeñas cantidades de DNA o anticuerpo sin reaccionar conducen a una reducción en la intensidad de la señal [Hendrickson et al.1995].

3.1.1.1.2. Diseño del DNA reportero

Joerger et al. (1995)[Joerger et al.1995] evaluaron varios factores en cuanto al diseño del DNA reportero, tales como la longitud del DNA, la secuencia de los *primers* y el número de hebras del DNA (simple o doble cadena). El DNA de doble cadena presenta algunas ventajas sobre el de simple cadena: a) la segunda hebra puede mejorar la estabilidad, b) la segunda hebra, al no estar unida al anticuerpo, es liberada a la solución durante el primer ciclo de desnaturalización, permitiendo la replicación sin interferencia estérica y c) el DNA de simple cadena se obtiene a partir de síntesis química limitando su longitud a menos de 100 pares de base, en cambio se puede generar DNA de doble cadena de miles de pares de bases mediante técnicas bioquímicas. Los productos de PCR de mayor tamaño son más fáciles de detectar. Aún teniendo en cuenta estas consideraciones, las diferencias en la eficiencia de amplificación no condujeron a una mejora en el límite de detección.

La secuencia de DNA usada como marcador puede ser elegida libremente. En la mayoría de los métodos descritos se emplean secuencias estándar de plásmidos, como pBluescript –M13mp18 o pUC 19. Sin embargo es importante utilizar un marcador que no sea manipulado frecuentemente en el trabajo de rutina del laboratorio. Aunque se han descrito ensayos usando fragmentos desde 100 pb hasta plásmidos enteros, fragmentos entre 150 y 300 pb han sido los más frecuentemente usados porque son eficientemente amplificados por PCR [Niemeyer et al.2005].

3.1.1.1.3. Detección del DNA amplificado

Para que la técnica de immuno-PCR se pueda establecer como método de rutina se requiere un método rápido de análisis y cuantificación del DNA amplificado. Se han utilizado diferentes formatos para la detección del DNA amplificado. La electroforesis en gel de agarosa ha sido usada en investigación pero es un método engorroso si se requiere analizar un gran número de muestras. También se han empleado técnicas de detección de DNA en microplaca, como PCR-ELISA y PCR-ELOSA, pero estas técnicas requieren manipulación adicional de la muestra, asociado con mayor costo y mayor riesgo de contaminación [Maia et al.1995] [Niemeyer et al.1997].

3.1.1.1.3.1. PCR cuantitativa en tiempo real

El desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real ha eliminado la variabilidad tradicionalmente asociada a la PCR cuantitativa, permitiendo así la cuantificación de rutina de los productos de PCR mediante el acceso rápido y confiable a datos digitales para cada muestra individual durante la PCR. Uno de los avances fue el uso del colorante SYBR Green I en la detección de DNA en Real Time PCR, incrementando la fluorescencia al unirse a DNA de doble cadena sin inhibir la reacción de PCR. Este colorante permite la detección de cualquier DNA de doble cadena, con lo que puede ser usado para detectar cualquier

producto amplificado. La desventaja es que tanto productos específicos como no específicos generan señal.

En un gráfico de amplificación se observa la señal de fluorescencia versus el número de ciclos (**Figura 3.1**). En los ciclos iniciales hay poco cambio en la señal de fluorescencia, esto define la línea de base. El parámetro C_t se define como el número fraccional de ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral fijado por sobre la línea de base.

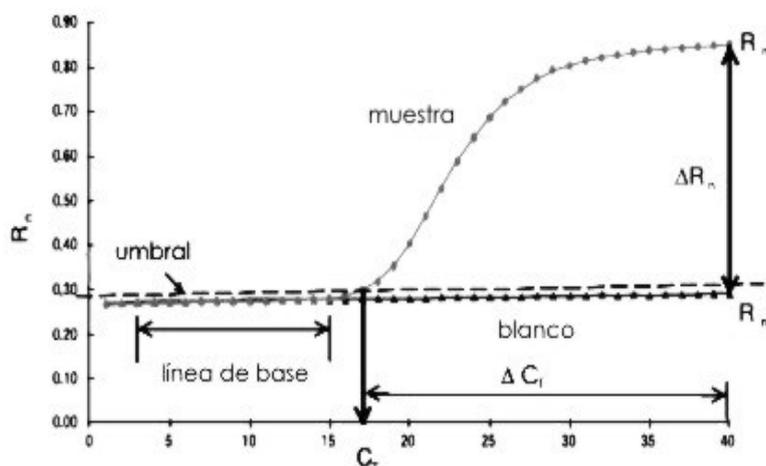


Figura 3.1. Detección de ADN mediante PCR en Tiempo Real. Se muestran las curvas correspondientes a una muestra positiva y un blanco (sin DNA molde). La señal R_n se mide online y se grafica en función del número de ciclo. Se normaliza contra la línea de base y se establece el umbral. Los valores de C_t se determinan como la intersección de la señal de la curva y el umbral. También se puede expresar como $\Delta C_t = 40 - C_t$ (40 es el número total de ciclos de amplificación).

Las reacciones se caracterizan por el punto en el tiempo de ciclado en el que la amplificación es detectada, en lugar de la cantidad de producto acumulado después de un número fijo de ciclos (técnica de punto final, por ejemplo análisis por electroforesis del producto amplificado). Cuanto mayor sea el número inicial de copias de la secuencia blanco, más pronto se observará un aumento significativo en la fluorescencia por encima del umbral. Los gráficos de amplificación intersectan el umbral en la fase exponencial de la reacción, durante la cual ninguno de los reactivos es limitante; como resultado los valores de C_t son muy reproducibles para reacciones con el mismo número de copias iniciales. Por el contrario, la cantidad de producto presente al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en la mezcla de reacción. Además, este sistema elimina el procesamiento post-PCR de los productos amplificados, lo cual disminuye las contaminaciones y elimina potenciales fuentes de error.

3.1.1.2. Aplicaciones de la inmuno-PCR

Desde su descripción inicial por Sano et al en 1992 [Sano et al.1992], la tecnología de inmuno-PCR ha evolucionado y es actualmente empleada en un amplio rango de aplicaciones en investigación y diagnóstico. Por ejemplo, podemos citar que se han desarrollado inmuno-PCR contra distintos antígenos virales, como hepatitis B [Maia et al.1995] y HIV [Barletta et al.2004], además de antígenos contra diversos patógenos [Chye et al.2004] y toxinas [Chao et al.2004], que pueden ser detectadas aún cuando están en baja concentración en las etapas tempranas de infección. O para el caso de marcadores tumorales o asociados a enfermedades, como TNF- α [Saito et al.1999] y PSA [Lind and Kubista2005].

Al presente, existe una sola descripción del uso de inmuno-PCR en la detección de gliadinas [Henterich et al.2003], sin obtener muy buenos resultados. Desde entonces no hay descripciones en bibliografía.

En este trabajo se describe el desarrollo de un ensayo de inmuno- PCR de alta capacidad de detección de gliadinas.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Síntesis del DNA reportero

Para la síntesis del DNA reportero biotinilado se amplificó un fragmento de 227 pb del plásmido Bluescript. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Eppendorf) empleando los primers M13 biotinilado y M13 reverso y el siguiente protocolo: 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, y 30 segundos a 72 °C, y finalmente 5 minutos a 72 °C.

```
(GTAAAACGACGGCCAGT  
GAGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGTACCGGGCC  
CCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACT  
AGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATT  
GCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCC)
```

3.2.2. ELISA de captura

3.2.2.1. Con los anticuerpos monoclonales 1B4E9/2A1C4 biotinilado

Se realizó el protocolo descrito en la Sección 1.2.2.3., con el mAb 1B4E9 como captura y el 2A1C4 biotinilado como anticuerpo de detección.

3.2.2.1. Con VHH26/3B4H1 biotinilado

Se realizó el protocolo descrito en la Sección 2.2.2.4., con el VHH 26 como captura y el 3B4H1 biotinilado como anticuerpo de detección.

3.2.3. Inmuno-PCR

Se llevó a cabo en strips Top Yield (Nunc) en las mismas condiciones que el ELISA de captura hasta la incubación con el mAb 2A1C4 biotinilado, excepto por las soluciones de bloqueo, lavado y diluyente para las que se evaluaron diferentes condiciones. Luego de lavar se adicionó Neutravidin (Pierce), se lavó nuevamente y se incubó con el DNA reportero biotinilado. Luego de lavar se procedió a la amplificación del oligonucleótido unido.

3.2.3.1. PCR convencional

Se adicionaron 25 µl de mezcla por fosa conteniendo los primers (T3 y T7), dNTPs, MgCl₂, y Taq Polimerasa, y se taparon las fosas con un sellador de strips (Nunc). La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador (Eppendorf) empleando el siguiente protocolo: 5 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 58 °C, y 1 minuto a 72 °C, y finalmente 5 minutos a 72 °C.

El producto de amplificación tiene un tamaño de 167 pb.

(GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCCCTCGAGGTTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTAGTGAGGGTAATT)

La cantidad de producto amplificado se estimó a partir de un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

3.2.3.2. PCR en tiempo real

Se adicionaron 25 µl de mezcla por fosa conteniendo IQ SYBR Green Supermix (BioRad) y los primers T3 y T7. Las fosas se sellaron con ABI Prism Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems), y la PCR se llevó a cabo en My IQ Single Color Real Time PCR Detection System (BioRad) con 40 ciclos (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60°C), luego de una activación inicial 2 minutos a 50°C y 10 minutos 95°C. Mediante el análisis de las curvas de *melting* se corroboró que la señal de amplificación correspondía al producto deseado.

3.2.4. Análisis de muestras de alimentos.

La preparación de los extractos de las muestras a analizar se realizó siguiendo el protocolo descrito en la Sección 1.2.1.3. Las muestras fueron diluídas en Low Cross Buffer (1:20 para la I-PCR con mAbs y 1:4 para la I-PCR con VHH).

3.3. Resultados

3.3.1. Técnicas de amplificación por fluorimetría

Como ensayo modelo se empleó el ELISA competitivo secuencial utilizado de rutina en nuestro laboratorio, el cual se revela mediante un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa y empleando OPD como sustrato. Con el fin de acoplar a otros sistemas de lectura se modificó el sistema de detección, empleando un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de conejo biotinilado y luego estreptavidina-fosfatasa alcalina, utilizando dos sistemas de revelado: colorimétrico (sustrato PNPP) y fluorométrico (sustrato 4-metilumbeliferil fosfato que es transformado en el producto fluorescente metilumbeliferona). Para el ensayo inmunofluorométrico el empleo de placas blancas opacas condujo a mejores resultados que las placas transparentes usadas habitualmente.

Al cambiar las proteínas de leche por seroalbúmina bovina (BSA) como sistema de bloqueo la señal de fluorescencia aumentó notablemente. Sin embargo, al comparar las curvas estándar obtenidas en los tres ensayos, no se encontraron diferencias relevantes que justifiquen un cambio en la metodología. Además la reproducibilidad fue superior en el sistema colorimétrico (**Figura 3.2.**).

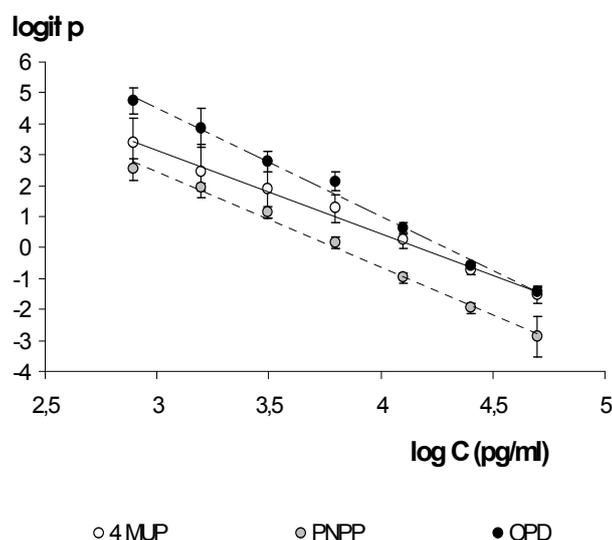


Figura 3.2. ELISA competitivo secuencial revelado mediante diferentes sistemas. Se compararon las curvas estándar del ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales revelando con un conjugado anti-inmunoglobulinas de conejo peroxidasa, o un anti-inmunoglobulinas de conejo biotinilado seguido de avidina-fosfatasa alcalina usando PNPP o 4-MUP como sustrato.

3.3.2. Inmuno-PCR

La técnica de Inmuno-PCR consiste en una sucesión de pasos de amplificación. En cada etapa existe un balance entre la unión deseada y la inespecífica del reactante correspondiente. Con el fin de lograr la máxima relación entre señal específica y la no específica es necesario optimizar las condiciones correspondientes a un ensayo

inmunoquímico convencional así como los procedimientos propios de la etapa de amplificación. En la **Figura 3.3.** se esquematiza un ELISA de captura convencional y la inmuno-PCR derivada del mismo ELISA, cuya optimización se describe a continuación.

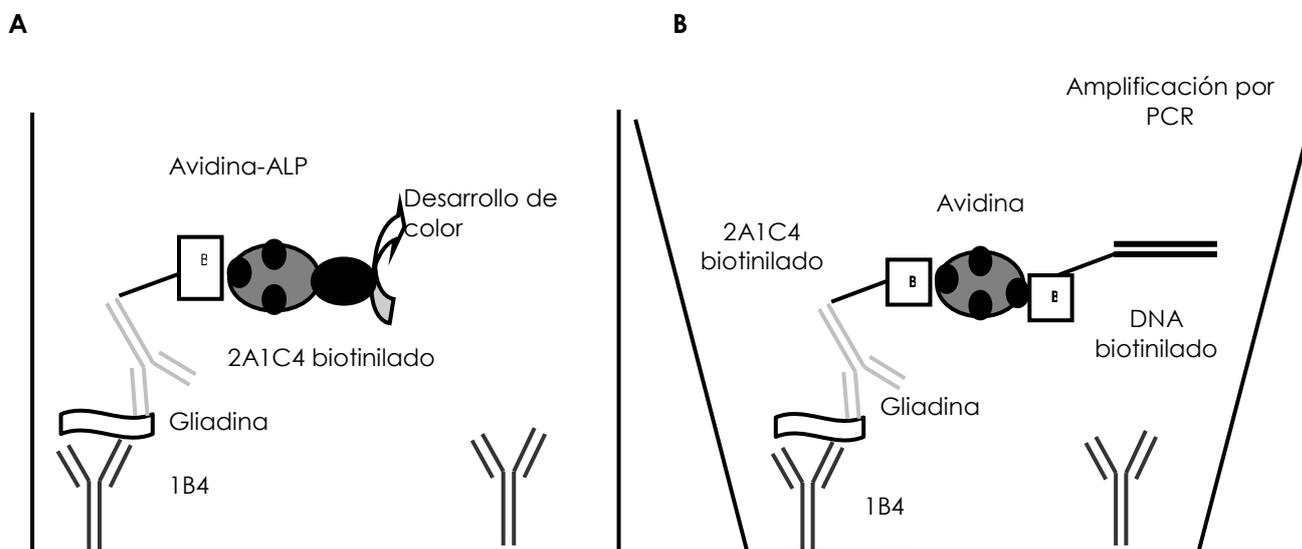


Figura 3.3. Esquema de ELISA (A) e Inmuno-PCR (B) para la detección de gliadinas.

3.3.2.1. Etapa inmunoquímica

Como plataforma inmunoquímica para la implementación de la técnica de inmuno-PCR, se empleará un ELISA de captura. En ensayos previos se evaluaron de a pares (captura y detección con anticuerpos biotinilados) tres anticuerpos monoclonales anti-gliadinas de nuestro panel. De los pares evaluados, los mejores resultados (menor límite de detección) se obtuvieron con el par 1B4E9 y 2A1C4 biotinilado como captura y detección, respectivamente.

3.3.2.2. DNA reportero

En Inmuno-PCR la detección del complejo inmune formado se realiza mediante la amplificación y cuantificación de un fragmento de DNA. Siguiendo un protocolo descrito por Sano et al., (1995), el DNA empleado en nuestro sistema comprende sitios de clonado del plásmido Bluescript, secuencia construida artificialmente. De esta manera, es muy poco probable que los *primers* reaccionen con DNA de otro origen que pueda estar presente en las muestras.

Para obtener el fragmento de DNA para ser empleado como DNA reportero se amplifica el plásmido utilizando los *primers* M13 biotinilado y M13 reverso obteniendo un fragmento de 227 pares de bases. El empleo de un *primer* biotinilado permite que este fragmento sea capaz de unirse específicamente a avidina, conectándose de esta manera con el anticuerpo de detección.

Este fragmento será el detectado luego en la Inmuno-PCR mediante los *primers* T3 y T7 para obtener un producto de 167pb.

3.3.2.3. Soporte empleado en inmuno-PCR

La realización de la etapa inmunoquímica y de la PCR en el mismo soporte disminuye las fuentes de error y la posibilidad de contaminación. Para poder realizar el procedimiento completo en la misma fosa, las placas utilizadas con este fin deben estar construídas con un material que cumpla con ciertos requerimientos: alta y homogénea capacidad de unión de proteínas sin adsorción inespecífica de DNA, deben soportar las temperaturas empleadas durante la PCR, tener una forma que sea compatible con el ciclador térmico, y además ser apto para la medida de fluorescencia para PCR en Tiempo Real. Los strips Top Yield (Nunc) cumplirían con estas condiciones.

Para evaluar si estos tienen una alta eficiencia en el pegado de proteínas se construyó la curva de calibración correspondiente al ELISA de captura utilizado como base para la Inmuno-PCR paralelamente en strips Top Yield y Maxisorp (comúnmente usados en ELISA convencional). Se obtuvieron dos curvas superpuestas, demostrando que la etapa inmunoquímica se puede realizar en este material sin modificaciones en la eficiencia del ensayo (no mostrado).

Por otra parte, se comprobó la aptitud de este material para ser usado en un ciclador térmico al mismo tiempo que se evaluó la capacidad de los primers de amplificar el oligonucleótido, tanto en una PCR convencional como en una PCR en Tiempo Real.

3.3.2.4. Optimización de las condiciones de inmuno-PCR

En esta técnica, el problema técnico más importante es la amplificación del DNA unido en forma inespecífica. Las fosas sin antígeno donde se realizan todas las etapas de la inmuno-PCR son los controles que indican esta interferencia. Por lo tanto, es esencial la eliminación de las moléculas de DNA que no se unieron específicamente mediante los procedimientos de bloqueo, lavado y la utilización de un diluyente adecuado.

3.3.2.4.1. PCR convencional

La primera etapa de optimización se realizó analizando, por electroforesis en gel de agarosa, los productos de PCR de muestras amplificadas y comparando las intensidades de las bandas teñidas con bromuro de etidio. En la etapa inmunoquímica, las concentraciones de anticuerpos empleadas fueron las establecidas previamente. Para los reactivos específicos de Inmuno-PCR se hizo una primera aproximación usando 5 µg/ml de avidina y 10 ng/ml de DNA. En estas condiciones, se obtuvo una adecuada diferencia entre la intensidad de las bandas correspondientes a las fosas con y sin antígeno.

Con el objetivo de disminuir la intensidad de la banda del producto amplificado originada en la muestra blanco, se evaluaron las condiciones de bloqueo. Se examinaron

varias concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) y leche en polvo descremada para bloquear la unión inespecífica de proteínas. Además, se incluyó un bloqueante de los sitios de unión de DNA (DNA de esperma de salmón). Si bien se observó que la BSA y que el bloqueante de DNA disminuían la señal no específica, éste método de detección del DNA amplificado no permitió arribar a resultados concluyentes en cuanto a las concentraciones óptimas a ser utilizadas.

En estas pruebas también se observó que el aumento en la concentración de detergente (Tween 20) en la solución de lavado contribuía a disminuir el pegado inespecífico.

3.3.2.4.2. PCR en tiempo real

Para obtener resultados definitivos en cuanto a las condiciones del ensayo fue necesario cuantificar el DNA reportero mediante PCR en Tiempo Real. Para esto, se probaron distintas condiciones de bloqueo y diluyente, empleando BSA y DNA de esperma de salmón en diferentes concentraciones. Se encontró que la condición en la que se obtenía mayor diferencia entre una muestra positiva y una negativa era bloqueando con una solución 5% de BSA, en combinación con DNA de esperma de salmón 0,1 mg/ml en PBS. Además, se probó como diluyente un buffer comercial (Low Cross buffer) con mejores resultados que las diferentes combinaciones BSA-DNA de esperma de salmón.

Como había sido observado cualitativamente en la PCR convencional que la concentración de Tween en la solución de lavado era importante para disminuir el valor de los blancos se probaron distintas condiciones definiendo como solución de trabajo PBS-Tween 0,2%. El número de pasos de lavados luego de cada etapa también fue importante para disminuir la señal inespecífica sin extender demasiado el tiempo empleado en el ensayo. Luego del análisis de esta variable, se encontró que los mejores resultados se obtenían con: 5 lavados luego de cada etapa, y diez luego de la última, con solución de lavado y dos lavados adicionales con PBS solo (en todos los casos 3 minutos con agitación).

Se debe destacar que durante todo el desarrollo del ensayo es importante utilizar material estéril, (tanto el material descartable como el PBS), prestando especial atención a mantener la limpieza del área de trabajo. La manipulación del DNA reportero es conveniente realizarla en un área diferente y con material reservado para tal fin, con el objetivo de evitar la contaminación.

Con todas estas variables ajustadas se procedió a optimizar las concentraciones de avidina y DNA reportero, analizando la diferencia de señal entre controles negativos y positivos.

Se utilizó Neutravidin Immuno Pure grade (Pierce) en lugar de estreptavidina. La primera es una avidina modificada para producir una unión inespecífica menor. Se definió su concentración en 1 µg/ml y la de DNA reportero en 0,5 ng/ml.

También fue necesario evaluar el volumen de reacción óptimo para reducir el gasto de reactivos sin afectar la reproducibilidad del ensayo. Esta mejora notablemente al realizar todos los pasos en un volumen de 50 μl y 25 μl sólo en la mezcla de PCR que representa el mayor costo de esta técnica.

3.3.2.5. Curva de calibración estándar

Teniendo todas las variables optimizadas se procedió a definir el rango de aplicación de la curva dosis/respuesta, mediante diluciones seriadas del estándar comercial de gliadinas. Comparando con la curva correspondiente al ELISA, con los mismos anticuerpos, se observa que esta se desplaza a valores menores de concentración (**Figura 3.4.**)

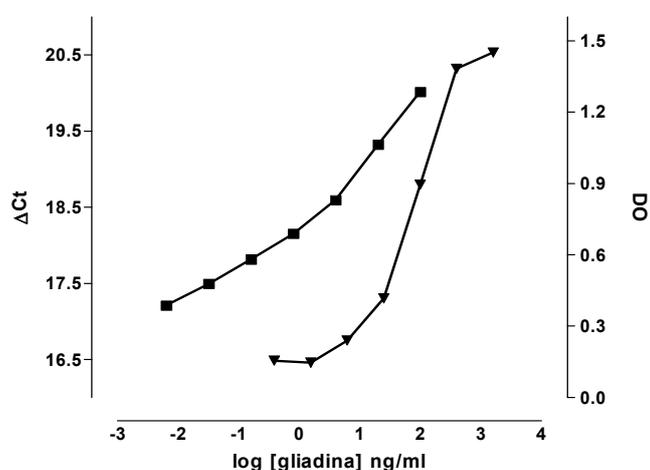


Figura 3.4. Comparación de las curvas estándar correspondientes a los ensayos de ELISA e Inmuno-PCR. Los resultados se expresan como DO y ΔCt respectivamente y corresponden a triplicados de un experimento representativo.

Para linealizar la curva se aplicó la función matemática $\text{logit } p$ (**Figura 3.5.**). La repetición del ensayo de Inmuno-PCR permitió calcular el límite de detección, siendo este **50 pg gliadinas/ml**. Si se compara con el límite de detección del ELISA, que es de **1 ng/ml** se observa un incremento de 20 veces.

Teniendo en cuenta que sobre el extracto se realiza una dilución 1:20 para eliminar la interferencia del etanol presente en el buffer de extracción la capacidad de detección en Inmuno-PCR es de **0,001 ppm**, comparado con **0,02 ppm** en ELISA.

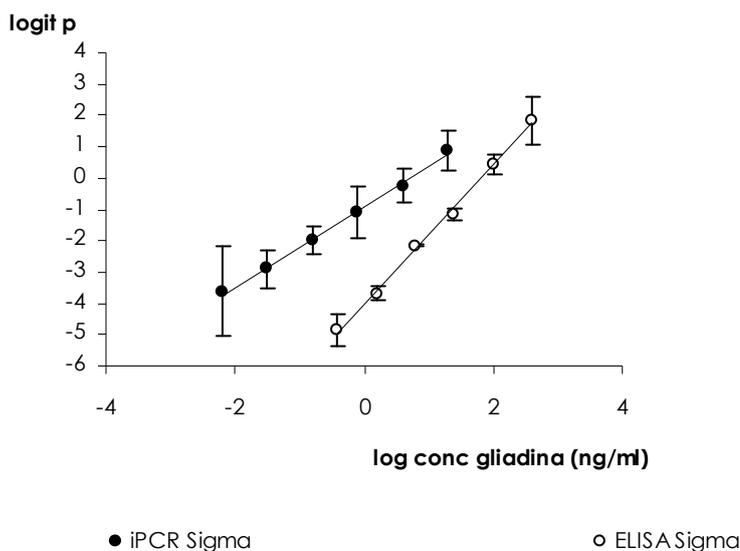


Figura 3.5. Comparación de la curva estándar (en función logit p) correspondientes a los ensayos de ELISA e Inmuno-PCR. Los resultados se expresan como logit p ± DS, y corresponden al valor promedio de 4 curvas independientes de los ensayos de ELISA (o) e Inmuno-PCR (●). Se indica la expresión de las rectas de regresión.

3.2.6. Estándar de gliadinas del grupo europeo PWG

Como las gliadinas son una mezcla compleja y muy heterogénea de proteínas, los resultados pueden variar dependiendo de la composición del estándar empleado. Se construyó la curva de calibración mediante el mismo procedimiento realizado previamente, pero reemplazando el estándar comercial (SIGMA) por el estándar producido por el grupo europeo PWG. Como se observa en la **Figura 3.6.**, la comparación de ambas curvas muestra que estas son equivalentes.

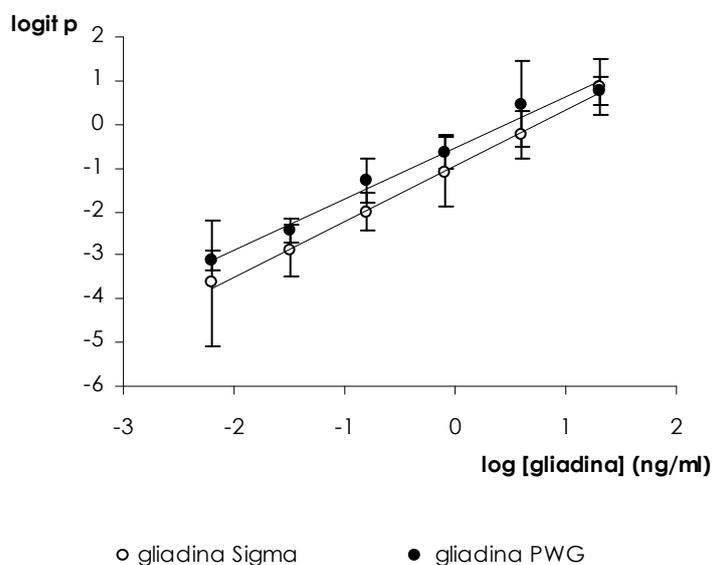


Figura 3.6. Inmuno-PCR con estándar de gliadina comercial (Sigma)(o) y del grupo europeo-PWG (●). Los resultados se expresan como logit p ± DS, y corresponden al valor promedio de 4 curvas independientes.

3.3.2.7. Inmuno-PCR basada en VHH

Sobre la plataforma del ELISA de captura que emplea un fragmento VHH como captura y el anticuerpo monoclonal 2A1C4 biotinilado como anticuerpo de detección, desarrollado anteriormente, se propuso aplicar la metodología de Inmuno-PCR. Se realizó todo el procedimiento bajo las condiciones ya optimizadas, y se determinó el rango de respuesta lineal.

El límite de detección resultó ser **0,2 ng gliadinas/ml** que corresponde a **0,0008 ppm** teniendo en cuenta que en este caso una dilución 1:4 de la muestra es suficiente para eliminar la interferencia del etanol. El incremento en el límite de detección con respecto al ELISA (**6 ng gliadinas/ml**) es de 30 veces. El desplazamiento de las curvas y del límite de detección es evidente en la **Figura 3.7**.

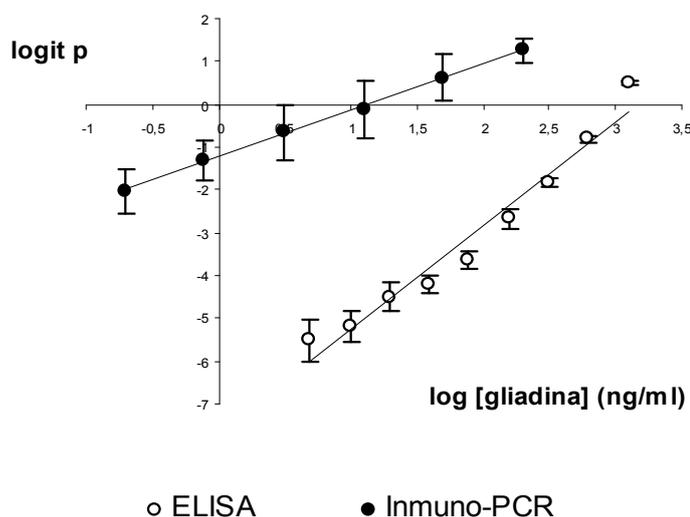


Figura 3.7. Comparación entre ELISA de captura e Inmuno-PCR empleando la misma plataforma inmunoquímica con el fragmento VHH26. Los resultados se expresan como logit p ± DS, y corresponden al valor promedio de 4 curvas independientes.

3.3.2.8. Cuantificación de gliadinas en muestras comerciales

Se evaluó la aplicabilidad de los ensayos de Inmuno-PCR desarrollados para la cuantificación de gliadinas en muestras comerciales. La selección de muestras a ser analizadas se hizo teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla 2.3. (cuantificación de gliadinas por ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales y ELISA de captura basado en fragmentos VHH). De especial interés fue analizar muestras con bajo contenido de gliadinas y muestras negativas.

En la **Tabla 3.1.** se muestran los resultados obtenidos mediante diferentes ensayos: inmuno-PCR, tanto con anticuerpos monoclonales como con VHH, así como los resultados mostrados en el Capítulo 2 (ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales y ELISA de captura con VHH).

Los resultados obtenidos con los diferentes métodos de análisis son comparables. Los tres métodos desarrollados en este trabajo fueron capaces de detectar la presencia de gliadinas en dos muestras rotuladas como negativas (galletitas de almendra y galletitas de vainilla) según el método empleado de rutina.

Tabla 3.1. Contenido de gliadinas en muestras comerciales de alimentos. Los resultados se expresan en ppm y corresponden al promedio de triplicados. nd: no detectable. nr: determinación no realizada

Muestra	ELISA comp	ELISA VHH	IPCR mAbs	IPCR VHH
Cacao	nd	nd	nr	nr
fécula de mandioca	nd	nd	nd	nd
galleta de arroz	nd	nd	nd	nd
Gelatina	nd	nd	nr	nr
merengue	nd	nd	nr	nr
mermelada	nd	nd	nd	nd
salchicha	nd	nd	nd	nd
Galletita de almendra	nd	0,06	0,03	0,03
Galletita de vainilla	nd	0,04	0,06	0,02
bondiola	0,1	0,17	0,12	0,16
caldo de finas hierbas	2,6	1,1	nr	nr
caldo de gallina	1,1	1,7	nr	nr
caldo de verduras	1,6	1,2	2	1,8
Canela	0,1	0,3	0,3	0,15
Chorizo	0,3	0,26	0,2	0,27
condimento para pizza	3	4	0,4	0,8
Galletita de vainilla Ecovida	0,1	0,2	0,13	0,16
Helado	20	22	13	17
longaniza	18	7,7	nr	nr
pimentón	54	63	3	11
Premezcla	0,7	2,5	2,3	2,8
sopa espárragos	4,2	1,3	1	0,6
tapa alfajor	5,1	14	nr	nr

3.4. Discusión

La detectabilidad de un ensayo inmunoquímico puede ser mejorada mediante el uso de sistemas de amplificación de la señal. En nuestro caso, no se obtuvieron resultados favorables mediante el empleo de un sustrato fluorescente.

Decidimos el desarrollo de una plataforma de inmuno-PCR que había sido propuesta a principios de la década del '90, metodología que combina la detección específica por anticuerpos con el poder de amplificación de la reacción de PCR.

Un trabajo mostró el empleo de esta metodología para la cuantificación de gliadinas [Henterich et al.2003]. Inicialmente, estos autores emplearon el anticuerpo R5 (ya mencionado) en un ELISA de captura, obteniendo valores altos para los blancos. Luego, usaron un formato de ELISA directo. Aunque obtuvieron un incremento de 30 veces en el límite de detección, existía reactividad con proteínas de maíz y arroz, probablemente debido a la aplicación directa de la muestra (antígeno) sobre la superficie de la placa.

En nuestro trabajo desarrollamos una inmuno-PCR sobre la base de un ELISA de captura, formato más adecuado para un inmunoensayo cuantitativo que un ELISA directo.

Para la aplicación de esta metodología se evaluaron todos los factores que pudieran tener un impacto en la diferencia de señal entre muestras control positivas y negativas.

El uso de placas Top Yield, que permiten realizar todo el procedimiento en el mismo soporte, elimina la fuente de error generada cuando la cuantificación del ADN debe hacerse en otra placa.

El empleo del buffer comercial Low Cross Buffer permitió reducir notablemente el pegado inespecífico, impactando en el límite de detección del método.

Por otro lado, la medida del DNA mediante PCR en tiempo real, permite la evaluación de un mayor número de muestras y con mayor precisión, que cuando se hace una evaluación semicuantitativa mediante la comparación de intensidad de bandas en un gel de agarosa.

De esta manera, se estableció el protocolo optimizado, permitiendo obtener un límite de detección de 50 pg gliadinas/ml (equivalente a 0,001 ppm).

Además, este ensayo permite obtener curvas de calibración comparables empleando el estándar comercial y el preparado por el grupo europeo (PWG).

Por extensión la metodología puesta a punto en este trabajo podría ser aplicada para transformar cualquier ELISA en una inmuno-PCR. En particular, demostramos que dicho protocolo se puede aplicar al ELISA de captura que emplea fragmentos VHHs, logrando un incremento de 30 veces en el límite de detección, siendo este 0,2 ng gliadinas/ml (equivalente a 0,0008 ppm). El empleo de fragmentos VHH en inmuno-PCR no había sido descrito previamente. Esto introduciría numerosas ventajas al combinar el incremento en la amplificación de señal generado por el ensayo de inmuno-PCR con un aumento de detectabilidad generado por el empleo de fragmentos VHH de mayor estabilidad.

La técnica de inmuno-PCR es aplicable a la cuantificación de gliadinas en muestras comerciales, obteniendo resultados comparables a los obtenidos con el ELISA competitivo secuencial, pero posibilitando la detección en muestras con muy bajo contenido, lo cual no es posible con el método de rutina.

3.5. Conclusión

Se desarrolló un ensayo de Inmuno-PCR para la cuantificación de gliadinas en muestras de alimentos. La optimización de cada etapa del ensayo permitió reducir la unión inespecífica. De esta manera se alcanzó un límite de detección de 50 ng gliadinas/ml (equivalente a 0,001 ppm).

Se obtuvieron curvas de calibración comparables al emplear el estándar comercial y el producido por el grupo europeo PWG.

El protocolo optimizado pudo ser extendido al uso de fragmentos VHH de Llama obteniendo un límite de detección de 0,02 ng gliadinas/ml (equivalente a 0,0008 ppm). Esta aplicación no había sido descrita previamente.

Ambos ensayos de Inmuno-PCR (con anticuerpos monoclonales y fragmentos VHH) son aplicables al análisis de muestras comerciales, y superiores al método de rutina de nuestro laboratorio.

3.6. Perspectivas

Empleando la metodología descrita se podría transformar un ELISA basado en otros anticuerpos, por ejemplo nuevos VHHs obtenidos con otras características de reconocimiento, en un ensayo de Inmuno-PCR.

Si bien el sistema de acoplamiento entre anticuerpo y DNA mediante un puente de avidina permitió obtener buenos resultados, estos podrían ser mejorados mediante la conjugación del oligonucleótido directamente al anticuerpo, o mediante el empleo de complejos avidina-DNA preformados. Estrategias que intentaremos desarrollar a la mayor brevedad.

Conclusión

General

CONCLUSIÓN GENERAL

En este Trabajo de Tesis hemos abordado la detección de proteínas tóxicas en productos destinados a consumo por pacientes celíacos.

La cuantificación precisa del contenido de proteínas tóxicas, en especial cuando éstas se encuentran en bajos niveles, es de suma importancia ya que la salud de los pacientes depende del seguimiento de una dieta estricta.

La determinación cuantitativa de estas proteínas presenta diversos inconvenientes desde el punto de vista técnico, algunos de los cuales han sido analizados en detalle en este trabajo.

Hemos generado metodologías cuantitativas empleando plataformas analíticas novedosas alcanzado resultados muy satisfactorios en cuanto a especificidad, alta capacidad de detección y aplicabilidad.

Bibliografía

1. [Abdulkarim et al.2002] Abdulkarim, A. S., Burgart, L. J., See, J., and Murray, J. A. (2002). Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol*, 97(8):2016–2021.
2. [Adams and Weiner2005] Adams, G. P. and Weiner, L. M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23(9):1147–1157.
3. [Adler 2005] Adler, M (2005). Detection of femtogram amounts of biogenic amines using self assembled DNA-protein nanostructures. *Nature Methods*, 2:147–149
4. [Anderson et al.2007] Anderson, G. P., Matney, R., Liu, J. L., Hayhurst, A., and Goldman, E. R. (2007). Multiplexed fluid array screening of phage displayed anti-ricin single domain antibodies for rapid assessment of specificity. *Biotechniques*, 43(6):806–811.
5. [Arentz-Hansen et al.2004] Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Øyvind Molberg, Scott, H., Koning, F., Jung, G., Roepstorff, P., Lundin, K. E. A., and Sollid, L. M. (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*, 1(1):e1.
6. [Aubrecht and Toth 1995] Aubrecht, E. and Toth, A. (1995) Investigation of gliadin content of wheat flour by ELISA method. *Acta Alimentaria* 24:23–29.
7. [Ayob et al 1988] Ayob, M.K., Rittenburg, J., Allen, J.C. and Smith, C.J. (1988) Development of a rapid enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for gliadin determination in food. *Food Hydrocolloids*, 2:39–49.
8. [Barletta et al.2004] Barletta, J. M., Edelman, D. C., and Constantine, N. T. (2004). Lowering the detection limits of hiv-1 viral load using real-time immuno-pcr for hiv-1 p24 antigen. *Am J Clin Pathol*, 122(1):20–27.
9. [Brandtzaeg2006] Brandtzaeg, P. (2006). The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett*, 105(2):127–139.
10. [Brottveit and Lundin2008] Brottveit, M. and Lundin, K. E. A. (2008). [Cancer risk in coeliac disease]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 128(20):2312–2315.
11. [Caillat-Zucman2009] Caillat-Zucman, S. (2009). Molecular mechanisms of hla association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens*, 73(1):1–8.
12. [Camarca et al.2009] Camarca, A., Anderson, R. P., Mamone, G., Fierro, O., Facchiano, A., Costantini, S., Zanzi, D., Sidney, J., Auricchio, S., Sette, A., Troncone, R., and Gianfrani, C. (2009). Intestinal t cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *J Immunol*, 182(7):4158–4166.
13. [Case2005] Case, S. (2005). The gluten-free diet: how to provide effective education and resources. *Gastroenterology*, 128(4 Suppl 1):S128–S134.
14. [Catassi et al.2007] Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., Vitis, I. D., Pianelli, G., Gesuita, R., Carle, F., Mandolesi, A., Bearzi, I., and Fasano, A. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*, 85(1):160–166.
15. [Chao et al.2004] Chao, H.-Y., Wang, Y.-C., Tang, S.-S., and Liu, H.-W. (2004). A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for clostridium botulinum neurotoxin type a. *Toxicon*, 43(1):27–34.
16. [Chirido et al 1995] Chirido, F.G., Anon, M.C. and Fossati, C.A. (1995) Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food and Agricultural Immunology*, 7:333–343.
17. [Chirido et al 1998] Chirido, F.G., Anon, M.C. and Fossati, C.A. (1998) Development of high-sensitive enzyme immunoassays for gliadin quantification using the streptavidin-biotin amplification system. *Food and Agricultural Immunology*, 10:143–155.
18. [Chirido et al.1999] Chirido, F. G., Rumbo, M., Carabajal, P., Castagnino, N., Mavromatopulos, E., Cirincione, V., Añón, M. C., and Fossati, C. A. (1999). Analysis of anti-gliadin antibodies by immunoblot analysis and enzyme-linked immunosorbent assay using gliadin fractions as antigens. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 29(2):171–177.
19. [Chirido et al.2000] Chirido, F. G., Rumbo, M., Carabajal, P., Mavromatópulos, E., Castagnino, N., Añón, M. C., and Fossati, C. A. (2000). Determination of anti-omega-gliadin antibodies in serologic tests for coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*,

- 35(5):508–516.
20. [Chirido et al.2005] Chirido, F. G., Garrote, J. A., and Arranz, E. (2005). [Celiac disease. new therapeutic alternatives based on a better knowledge of molecular pathogenesis]. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 35(3):183–189.
 21. [Chye et al.2004] Chye, S.-M., Lin, S.-R., Chen, Y.-L., Chung, L.-Y., and Yen, C.-M. (2004). Immuno-pcr for detection of antigen to *angiostromylus cantonensis* circulating fifth-stage worms. *Clin Chem*, 50(1):51–57.
 22. [Ciccocioppo et al.2005a] Ciccocioppo, R., Sabatino, A. D., Bauer, M., Riccia, D. N. D., Bizzini, F., Biagi, F., Cifone, M. G., Corazza, G. R., and Schuppan, D. (2005a). Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest*, 85(3):397–407.
 23. [Ciccocioppo et al.2005b] Ciccocioppo, R., Sabatino, A. D., and Corazza, G. R. (2005b). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*, 140(3):408–416.
 24. [Ciclitira and Lennox1983] Ciclitira, P. J. and Lennox, E. S. (1983). A radioimmunoassay for alpha- and beta-gliadins. *Clin Sci (Lond)*, 64(6):655–659.
 25. [Ciclitira et al.2005a] Ciclitira, P. J., Ellis, H. J., and Lundin, K. E. A. (2005a). Gluten-free diet—what is toxic? *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 19(3):359–371.
 26. [Ciclitira et al.2005b] Ciclitira, P. J., Johnson, M. W., Dewar, D. H., and Ellis, H. J. (2005b). The pathogenesis of coeliac disease. *Mol Aspects Med*, 26(6):421–458.
 27. [Clemente et al.2003] Clemente, M. G., Virgiliis, S. D., Kang, J. S., Macatagney, R., Musu, M. P., Pierro, M. R. D., Drago, S., Congia, M., and Fasano, A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52(2):218–223.
 28. [Conrath et al.2003] Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S., and Nguyen, V. K. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in camelidae. *Dev Comp Immunol*, 27(2):87–103.
 29. [Conrath et al.2009] Conrath, K., Pereira, A. S., Martins, C. E., Timóteo, C. G., Tavares, P., Spinelli, S., Kinne, J., Flaudrops, C., Cambillau, C., Muyldermans, S., Moura, I., Moura, J. J. G., Tegoni, M., and Desmyter, A. (2009). Camelid nanobodies raised against an integral membrane enzyme, nitric oxide reductase. *Protein Sci*, 18(3):619–628.
 30. [Coppieters et al.2006] Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., de Wiele, C. V., Staelens, L., Hostens, J., Revets, H., Remaut, E., Elewaut, D., and Rottiers, P. (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor alpha vhh proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 54(6):1856–1866.
 31. [Cortez-Retamozo et al.2002] Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Gh, G. H., Gobert, M., Conrath, K., Muyldermans, S., Baetselier, P. D., and Revets, H. (2002). Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer*, 98(3):456–462.
 32. [Deckers et al.2009] Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., Vercruysse, J., Muyldermans, S., and Dorny, P. (2009). Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of taenia solium cysticercosis. *Int J Parasitol*, 39(5):625–633.
 33. [Denery-Papini et al 1999] Denery-Papini S., Nicolas Y. and Popineau Y. (1999) Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-free Foods. *Journal of Cereal Science*, 30:121–131
 34. [Dewar et al.2006] Dewar, D. H., Amato, M., Ellis, H. J., Pollock, E. L., Gonzalez-Cinca, N., Wieser, H., and Ciclitira, P. J. (2006). The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 18(5):483–491.
 35. [DICKE et al.1953] DICKE, W. K., WEIJERS, H. A., and KAMER, J. H. V. D. (1953). Coeliac disease. ii. the presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*, 42(1):34–42.
 36. [Dieterich et al.1997] Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., and Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 3(7):797–801.
 37. [Dolk et al.2005] Dolk, E., van der Vaart, M., Hulsik, D. L., Vriend, G., de Haard, H., Spinelli, S., Cambillau, C., Frenken, L., and Verrips, T. (2005). Isolation of llama antibody

- fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl Environ Microbiol*, 71(1):442–450.
38. [Drago et al.2006] Drago, S., Asmar, R. E., Pierro, M. D., Clemente, M. G., Tripathi, A., Sapone, A., Thakar, M., Iacono, G., Carroccio, A., D'Agate, C., Not, T., Zampini, L., Catassi, C., and Fasano, A. (2006). Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*, 41(4):408–419.
 39. [Ellis et al.1990] Ellis, H. J., Freedman, A. R., and Ciclitira, P. J. (1990). Detection and estimation of the barley prolamins content of beer and malt to assess their suitability for patients with coeliac disease. *Clin Chim Acta*, 189(2):123–130.
 40. [Ellis et al.1994a] Ellis, H. J., Doyle, A. P., Day, P., Wieser, H., and Ciclitira, P. J. (1994a). Demonstration of the presence of coeliac-activating gliadin-like epitopes in malted barley. *Int Arch Allergy Immunol*, 104(3):308–310.
 41. [Ellis et al.1994b] Ellis, H. J., Doyle, A. P., Wieser, H., Sturgess, R. P., Day, P., and Ciclitira, P. J. (1994b). Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a sequenced peptide of alpha-gliadin from the coeliac-activating domain I. *J Biochem Biophys Methods*, 28(1):77–82.
 42. [Ellis et al.1998] Ellis, H. J., Rosen-Bronson, S., O'Reilly, N., and Ciclitira, P. J. (1998). Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of alpha-gliadin. *Gut*, 43(2):190–195.
 43. [Fasano et al.2003] Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P. H. R., Guandalini, S., Hill, I. D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S. S., Murray, J. A., and Horvath, K. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*, 163(3):286–292.
 44. [Ferguson et al.1993] Ferguson, A., Arranz, E., and O'Mahony, S. (1993). Clinical and pathological spectrum of coeliac disease—active, silent, latent, potential. *Gut*, 34(2):150–151.
 45. [Freedman et al.1987] Freedman, A. R., Galfrè, G., Gal, E., Ellis, H. J., and Ciclitira, P. J. (1987). Monoclonal antibody elisa to quantitate wheat gliadin contamination of gluten-free foods. *J Immunol Methods*, 98(1):123–127.
 46. [Friis 1988] Friis, S.U.(1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clinica and Chemica Acta*, 178:261–270.
 47. [Garaicoechea et al.2008] Garaicoechea, L., Olichon, A., Marcoppido, G., Wigdorovitz, A., Mozgovej, M., Saif, L., Surrey, T., and Parreño, V. (2008). Llama-derived single-chain antibody fragments directed to rotavirus vp6 protein possess broad neutralizing activity in vitro and confer protection against diarrhea in mice. *J Virol*, 82(19):9753–9764.
 48. [García et al.2005] García, E., Llorente, M., Hernando, A., Kieffer, R., Wieser, H., and Méndez, E. (2005). Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17(5):529–539.
 49. [Ghahroudi et al.1997] Ghahroudi, M. A., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., and Muyldermans, S. (1997). Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*, 414(3):521–526.
 50. [Gianfrani et al.2005] Gianfrani, C., Auricchio, S., and Troncone, R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett*, 99(2):141–145.
 51. [Goldman et al.2006] Goldman, E. R., Anderson, G. P., Liu, J. L., Delehanty, J. B., Sherwood, L. J., Osborn, L. E., Cummins, L. B., and Hayhurst, A. (2006). Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem*, 78(24):8245–8255.
 52. [Gomez et al.2001] Gomez, J. C., Selvaggio, G. S., Viola, M., Pizarro, B., la Motta, G., de Barrio, S., Castelletto, R., Echeverría, R., Sugai, E., Vazquez, H., Mauriño, E., and Bai, J. C. (2001). Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the la plata area. *Am J Gastroenterol*, 96(9):2700–2704.
 53. [Gomez et al.2002] Gomez, J. C., Selvaggio, G., Pizarro, B., Viola, M. J., Motta, G. L., Smecuol, E., Castelletto, R., Echeverría, R., Vazquez, H., Mazure, R., Crivelli, A., Sugai, E., Mauriño, E., and Bai, J. C. (2002). Value of a screening algorithm for celiac disease using tissue transglutaminase antibodies as first level in a population-based study. *Am J Gastroenterol*, 97(11):2785–2790.

54. [Hamers-Casterman et al.1993] Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., and Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428):446–448.
55. [Harmsen et al.2006] Harmsen, M. M., van Solt, C. B., van Zijderveld-van Bommel, A. M., Niewold, T. A., and van Zijderveld, F. G. (2006). Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(3):544–551.
56. [Hendrickson et al.1995] Hendrickson, E. R., Truby, T. M., Joerger, R. D., Majarian, W. R., and Ebersole, R. C. (1995). High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent dna-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, 23(3):522–529.
57. [Henterich et al.2003] Henterich, N., Osman, A. A., Méndez, E., and Mothes, T. (2003). Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung*, 47(5):345–348.
58. [Hmila et al.2008] Hmila, I., R. B. A.-B. A., Saerens, D., Benlasfar, Z., Conrath, K., Ayebe, M. E., Muyldermans, S., and Bouhaouala-Zahar, B. (2008). Vhh, bivalent domains and chimeric heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin aahi'. *Mol Immunol*, 45(14):3847–3856.
59. [Holtmeier and Caspary2006] Holtmeier, W. and Caspary, W. F. (2006). Celiac disease. *Orphanet J Rare Dis*, 1:3.
60. [Howdle2006] Howdle, P. D. (2006). Gliadin, glutenin or both? the search for the holy grail in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 18(7):703–706.
61. [Hultberg et al.2007] Hultberg, A., Tremblay, D. M., de Haard, H., Verrips, T., Moineau, S., Hammarström, L., and Marcotte, H. (2007). Lactobacilli expressing llama vhh fragments neutralise lactococcus phages. *BMC Biotechnol*, 7:58.
62. [Ismaili et al.2007] Ismaili, A., Jalali-Javaran, M., Rasaei, M. J., Rahbarizadeh, F., Forouzandeh-Moghadam, M., and Memari, H. R. (2007). Production and characterization of anti-(mucin muc1) single-domain antibody in tobacco (*nicotiana tabacum* cultivar xanthi). *Biotechnol Appl Biochem*, 47(Pt 1):11–19.
63. [Ivarsson et al.2002] Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H., and Persson, L. A. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr*, 75(5):914–921.
64. [James and Scott2000] James, M. W. and Scott, B. B. (2000). Endomysial antibody in the diagnosis and management of coeliac disease. *Postgrad Med J*, 76(898):466–468.
65. [Janatuinen et al.2002] Janatuinen, E. K., Kempainen, T. A., Julkunen, R. J. K., Kosma, V.-M., Mäki, M., Heikkinen, M., and Uusitupa, M. I. J. (2002). No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut*, 50(3):332–335.
66. [Joerger et al.1995] Joerger, R. D., Truby, T. M., Hendrickson, E. R., Young, R. M., and Ebersole, R. C. (1995). Analyte detection with dna-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem*, 41(9):1371–1377.
67. [Jones et al. 1959] Jones RW, Taylor NW, Senti FR.(1959) Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Arch Biochem Biophys*, 84:363–76.
68. [Kagnoff2007] Kagnoff, M. F. (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest*, 117(1):41–49.
69. [Khatabi et al.2006] Khatabi, M. E., Adams, H., Heezius, E., Hermans, P., Detmers, F., Maassen, B., van der Ley, P., Tommassen, J., Verrips, T., and Stam, J. (2006). Llama single-chain antibody that blocks lipopolysaccharide binding and signaling: prospects for therapeutic applications. *Clin Vaccine Immunol*, 13(10):1079–1086.
70. [Kim et al.2004] Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM.(2004) Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 23; 101(12):4175-9.
71. [Klooster et al.2007] Klooster, R., Maassen, B. T. H., Stam, J. C., Hermans, P. W., Haaff, M. R. T., Detmers, F. J. M., de Haard, H. J., Post, J. A., and Verrips, C. T. (2007). Improved anti-igg and hsa affinity ligands: clinical application of vhh antibody technology. *J Immunol Methods*, 324(1-2):1–12.
72. [Koch-Nolte et al.2007] Koch-Nolte, F., Reyelt, J., Schössow, B., Schwarz, N., Scheuplein, F., Rothenburg, S., Haag, F., Alzogaray, V., Cauerhff, A., and Goldbaum, F. A. (2007). Single domain antibodies from llama effectively and specifically block t cell ecto-adt-ribosyltransferase art2.2 in vivo. *FASEB J*, 21(13):3490–3498.

73. [Kroner2002] Kroner G.(2002). An overview of long-term experience with the production of gluten-free wheat starch. *Proceeding of the 17th Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*,59-63
74. [Krüger et al.2006] Krüger, C., Hultberg, A., Marcotte, H., Hermans, P., Bezemer, S., Frenken, L. G. J., and Hammarström, L. (2006). Therapeutic effect of llama derived vhh fragments against streptococcus mutans on the development of dental caries. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72(4):732-737.
75. [Kupper2005] Kupper, C. (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*, 128(4 Suppl 1):S121-S127.
76. [Lammers et al.2008] Lammers, K. M., Lu, R., Brownley, J., Lu, B., Gerard, C., Thomas, K., Rallabhandi, P., Shea-Donohue, T., Tamiz, A., Alkan, S., Netzel-Arnett, S., Antalis, T., Vogel, S. N., and Fasano, A. (2008). Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor cxcr3. *Gastroenterology*, 135(1):194-204.e3.
77. [Lind and Kubista2005] Lind, K. and Kubista, M. (2005). Development and evaluation of three real-time immuno-pcr assemblages for quantification of psa. *J Immunol Methods*, 304(1-2):107-116.
78. [Lundin et al.2003] Lundin, K. E. A., Nilsen, E. M., Scott, H. G., Løberg, E. M., Gjøen, A., Bratlie, J., Skar, V., Mendez, E., Løvik, A., and Kett, K. (2003). Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*, 52(11):1649-1652.
79. [Mai et al.2006] Mai, K. T., Perkins, D. G., Zhang, J., and Mackenzie, C. R. (2006). Es1, a new lung carcinoma antibody—an immunohistochemical study. *Histopathology*, 49(5):515-522.
80. [Maia et al.1995] Maia, M., Takahashi, H., Adler, K., Garlick, R. K., and Wands, J. R. (1995). Development of a two-site immuno-pcr assay for hepatitis b surface antigen. *J Virol Methods*, 52(3):273-286.
81. [Maiuri et al.2000] Maiuri, L., Ciacci, C., Auricchio, S., Brown, V., Quarantino, S., and Londei, M. (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 119(4):996-1006.
82. [Maiuri et al.2003] Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quarantino, S., and Londei, M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic t cells in coeliac disease. *Lancet*, 362(9377):30-37.
83. [Marsh1990] Marsh, M. N. (1990). Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*, 31(1):111-114.
84. [Marti et al.2005] Marti, T., Molberg, O., Li, Q., Gray, G. M., Khosla, C., and Sollid, L. M. (2005). Prolyl endopeptidase-mediated destruction of t cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 312(1):19-26.
85. [Martin2008] Martin, S. (2008). Against the grain: an overview of celiac disease. *J Am Acad Nurse Pract*, 20(5):243-250.
86. [Matysiak-Budnik et al.2008] Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., van Niel, G., Bouhnik, Y., Lamarque, D., Chaussade, S., Malamut, G., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Monteiro, R. C., and Heyman, M. (2008). Secretory iga mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*, 205(1):143-154.
87. [Méndez et al.2005] Méndez, E., Vela, C., Immer, U., and Janssen, F. W. (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the r5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 17(10):1053-1063.
88. [Meresse2008] Meresse B., Ripoché J., Heyman M. and Cerf-Bensussan N. (2008). Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunology*, 2(1): 8-23
89. [Mills et al 1989] Mills, E.N.C., Spinks, C.A. and Morgan, M.R.A. (1989) A two-site enzyme-linked immunosorbent assay for wheat gliadins. *Food and Agricultural Immunology*, 1:19-27.
90. [Muyldermans et al.1994] Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A., and Hamers, R. (1994). Sequence and structure of vh domain from naturally

- occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng*, 7(9):1129–1135.
91. [Muyldermans et al.2001] Muyldermans, S., Cambillau, C., and Wyns, L. (2001). Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*, 26(4):230–235.
 92. [Muyldermans2001] Muyldermans, S. (2001). Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol*, 74(4):277–302.
 93. [Nguyen et al.2000] Nguyen, V. K., Hamers, R., Wyns, L., and Muyldermans, S. (2000). Camel heavy-chain antibodies: diverse germline v(h)h and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J*, 19(5):921–930.
 94. [Niemeyer et al.1997] Niemeyer, C. M., Adler, M., and Blohm, D. (1997). Fluorometric polymerase chain reaction (pcr) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-pcr products in microplates. *Anal Biochem*, 246(1):140–145.
 95. [Niemeyer et al.1999] Niemeyer, C. M., Adler, M., Pignataro, B., Lenhert, S., Gao, S., Chi, L., Fuchs, H., and Blohm, D. (1999). Self-assembly of dna-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-pcr. *Nucleic Acids Res*, 27(23):4553–4561.
 96. [Niemeyer et al.2005] Niemeyer, C. M., Adler, M., and Wacker, R. (2005). Immuno-pcr: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol*, 23(4):208–216.
 97. [Niewinski2008] Niewinski, M. M. (2008). Advances in celiac disease and gluten-free diet. *J Am Diet Assoc*, 108(4):661–672.
 98. [Norris et al.2005] Norris, J. M., Barriga, K., Hoffenberg, E. J., Taki, I., Miao, D., Haas, J. E., Emery, L. M., Sokol, R. J., Erlich, H. A., Eisenbarth, G. S., and Rewers, M. (2005). Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*, 293(19):2343–2351.
 99. [Oberhuber et al.1999] Oberhuber, G., Granditsch, G., and Vogelsang, H. (1999). The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11(10):1185–1194.
 100. [Omidfar et al.2007] Omidfar, K., Rasaei, M. J., Kashanian, S., Paknejad, M., and Bathaie, Z. (2007). Studies of thermostability in camelus bactrianus (bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by pichia. *Biotechnol Appl Biochem*, 46(Pt 1):41–49.
 101. [Osborne1924] Osborne T. (1924). Vegetable proteins. *Logman Green*, London 1924.
 102. [Øyvind Molberg et al.2003] Øyvind Molberg, Flaete, N. S., Jensen, T., Lundin, K. E. A., Arentz-Hansen, H., Anderson, O. D., Uhlen, A. K., and Sollid, L. M. (2003). Intestinal t-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology*, 125(2):337–344.
 103. [Pant et al.2006] Pant, N., Hultberg, A., Zhao, Y., Svensson, L., Pan-Hammarstrom, Q., Johansen, K., Pouwels, P. H., Ruggeri, F. M., Hermans, P., Frenken, L., Boren, T., Marcotte, H., and Hammarstrom, L. (2006). Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J Infect Dis*, 194(11):1580–1588.
 104. [Paterson et al.2007] Paterson, B. M., Lammers, K. M., Arrieta, M. C., Fasano, A., and Meddings, J. B. (2007). The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of at-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther*, 26(5):757–766.
 105. [PAULLEY1954] PAULLEY, J. W. (1954). Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J*, 2(4900):1318–1321.
 106. [PHR et al.2001] PHR, G., Stavropoulos, S. N., Panagi, S. G., Goldstein, S. L., McMahon, D. J., Absan, H., and Neugut, A. I. (2001). Characteristics of adult celiac disease in the usa: results of a national survey. *Am J Gastroenterol*, 96(1):126–131.
 107. [Qiao et al.2009] Qiao, S.-W., Sollid, L. M., and Blumberg, R. S. (2009). Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*, 21(1):111–117.
 108. [Rahbarizadeh et al.2006] Rahbarizadeh, F., Rasaei, M. J., Forouzandeh, M., and Allameh, A.-A. (2006). Over expression of anti-muc1 single-domain antibody fragments in the yeast pichia pastoris. *Mol Immunol*, 43(5):426–435.
 109. [Rashid et al.2005] Rashid, M., Cranney, A., Zarkadas, M., Graham, I. D.,

- Switzer, C., Case, S., Molloy, M., Warren, R. E., Burrows, V., and Butzner, J. D. (2005). Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in canadian children. *Pediatrics*, 116(6):e754–e759.
110. [Rashtak et al.2008] Rashtak, S., Ettore, M. W., Homburger, H. A., and Murray, J. A. (2008). Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6(4):426–32; quiz 370.
 111. [Rehan and Younus2006] Rehan, M. and Younus, H. (2006). Effect of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies. *Int J Biol Macromol*, 38(3-5):289–295.
 112. [Riedel-de Haen] Riedel-de Haen AG. ELISA-systems Gliadin-Enzyme immunoassay for the quantitative determination of gliadin.
 113. [Rumbo et al.2001] Rumbo, M., Chirido, F. G., Fossati, C. A., and Añón, M. C. (2001). Analysis of the effects of heat treatment on gliadin immunochemical quantification using a panel of anti-prolamin antibodies. *J Agric Food Chem*, 49(12):5719–5726.
 114. [Saerens et al.2005] Saerens, D., Frederix, F., Reekmans, G., Conrath, K., Jans, K., Brys, L., Huang, L., Bosmans, E., Maes, G., Borghs, G., and Muyldermans, S. (2005). Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Anal Chem*, 77(23):7547–7555.
 115. [Saerens et al.2008a] Saerens, D., Ghassabeh, G. H., and Muyldermans, S. (2008a). Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 8(5):600–608.
 116. [Saerens et al.2008b] Saerens, D., Stijlemans, B., Baral, T. N., Thi, G. T. N., Wernery, U., Magez, S., Baetselier, P. D., Muyldermans, S., and Conrath, K. (2008b). Parallel selection of multiple anti-infectome nanobodies without access to purified antigens. *J Immunol Methods*, 329(1-2):138–150.
 117. [Saito et al.1999] Saito, K., Kobayashi, D., Sasaki, M., Araake, H., Kida, T., Yagihashi, A., Yajima, T., Kameshima, H., and Watanabe, N. (1999). Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-pcr assay. *Clin Chem*, 45(5):665–669.
 118. [Sano et al.1992] Sano, T., Smith, C. L., and Cantor, C. R. (1992). Immuno-pcr: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-dna conjugates. *Science*, 258(5079):120–122.
 119. [Shan et al.2002] Shan, L., Øyvind Molberg, Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., and Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297(5590):2275–2279.
 120. [Sherwood et al.2007] Sherwood, L. J., Osborn, L. E., Carrion, R., Patterson, J. L., and Hayhurst, A. (2007). Rapid assembly of sensitive antigen-capture assays for marburg virus, using in vitro selection of llama single-domain antibodies, at biosafety level 4. *J Infect Dis*, 196 Suppl 2:S213–S219.
 121. [Shewry et al.1988] Shewry, P. R., Parmar, S., and Field, J. M. (1988). Two-dimensional electrophoresis of cereal prolamins: applications to biochemical and genetic analyses. *Electrophoresis*, 9(11):727–737.
 122. [Singh and Chang2004] Singh, R. R. and Chang, J.-Y. (2004). Investigating conformational stability of bovine pancreatic phospholipase a2: a novel concept in evaluating the contribution of the 'native-framework' of disulphides to the global conformational stability of proteins. *Biochem J*, 377(Pt 3):685–692.
 123. [Skerritt 1985] Skerritt, J.H. (1985) A sensitive monoclonal-antibody-based test for gluten detection: quantitative immunoassay. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36: 987–994.
 124. [Skerritt and Hill 1990] Skerritt, J.H. and Hill, A.S. (1990) Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:1771–1778.
 125. [Skerritt and Hill 1991] Skerritt, J.H. and Hill, A.S. (1991) Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, 74: 257–264.
 126. [Sollid and Lundin2009] Sollid, L. M. and Lundin, K. E. A. (2009). Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosal Immunol*, 2(1):3–7.
 127. [Sorell et al.1998] Sorell, L., López, J. A., Valdés, I., Alfonso, P., Camafeita, E., Acevedo, B., Chirido, F., Gaviñondo, J., and Méndez, E. (1998). An innovative

- sandwich elisa system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett*, 439(1-2):46–50.
128. [Stenberg et al.2008] Stenberg, P., Roth, E. B., and Sjöberg, K. (2008). Transglutaminase and the pathogenesis of coeliac disease. *Eur J Intern Med*, 19(2):83–91.
 129. [Stewart et al.2007] Stewart, C. S., MacKenzie, C. R., and Hall, J. C. (2007). Isolation, characterization and pentamerization of alpha-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naïve phage display library: preliminary findings for antivenom development. *Toxicon*, 49(5):699–709.
 130. [Stijlemans et al.2004] Stijlemans, B., Conrath, K., Cortez-Retamozo, V., Xong, H. V., Wyns, L., Senter, P., Revets, H., Baetselier, P. D., Muyldermans, S., and Magez, S. (2004). Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. african trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem*, 279(2):1256–1261.
 131. [Szynol et al.2006] Szynol, A., de Haard, J. J. W., Veerman, E. C., de Soet, J. J., and van Nieuw Amerongen, A. V. (2006). Design of a peptibody consisting of the antimicrobial peptide dhvar5 and a llama variable heavy-chain antibody fragment. *Chem Biol Drug Des*, 67(6):425–431.
 132. [Troncone et al.1986] Troncone, R., Vitale, M., Donatiello, A., Farris, E., Rossi, G., and Auricchio, S. (1986). A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J Immunol Methods*, 92(1):21–23.
 133. [Vader et al.2002] Vader, W., Kooy, Y., Veelen, P. V., Ru, A. D., Harris, D., Benckhuijsen, W., Peña, S., Mearin, L., Drijfhout, J. W., and Koning, F. (2002). The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology*, 122(7):1729–1737.
 134. [Valdés et al.2003] Valdés, I., García, E., Llorente, M., and Méndez, E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(5):465–474.
 135. [van den Broeck et al.2009] van den Broeck H.C., van Herpen T., Schuit C., Salentijn E., Dekking L., Bosch D., Hamer R., Smulders M., Gilissen L. and van der Meer I.(2009). Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biology*, 9:41
 136. [van Eckert et al.2006]van Eckert R., Berghofer E. , Ciclitira P.J., Chirido F. , Denery-Papini S., Ellis H.J., Ferranti P., Goodwin P., Immer U., Mamone G., Méndez E., Mothes T., Novalin S.,Osman A., Rumbo M., Stern M., Thorell L., Whim A., Wieser H. (2006). Towards a new gliadin reference material–isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science*, 43:331–341.
 137. [van Heel and West2006] van Heel, D. A. and West, J. (2006). Recent advances in coeliac disease. *Gut*, 55(7):1037–1046.
 138. [van Heel et al.2007] van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M. C., Barnardo, M. C. N. M., Bethel, G., Holmes, G. K. T., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J. R. F., Sanders, D. S., Howdle, P., Swift, J., Playford, R. J., McLaren, W. M., Mearin, M. L., Mulder, C. J., McManus, R., McGinnis, R., Cardon, L. R., Deloukas, P., and Wijmenga, C. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring il2 and il21. *Nat Genet*, 39(7):827–829.
 139. [van de Wal et al.1996] van de Wal, Y., Kooy, Y. M., Drijfhout, J. W., Amons, R., and Koning, F. (1996). Peptide binding characteristics of the coeliac disease-associated dq(alpha1*0501, beta1*0201) molecule. *Immunogenetics*, 44(4):246–253.
 140. [van der Linden et al.1999] van der Linden, R. H., Frenken, L. G., de Geus, B., Harmsen, M. M., Ruuls, R. C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P., and Verrips, C. T. (1999). Comparison of physical chemical properties of llama vhh antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1431(1):37–46.
 141. [van der Linden et al.2000] van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., and Frenken, L. (2000). Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of lama glama. *J Immunol Methods*, 240(1-2):185–195.

142. [Verheesen et al.2006] Verheesen, P., de Kluijver, A., van Koningsbruggen, S., de Brij, M., de Haard, H. J., van Ommen, G.-J. B., van der Maarel, S. M., and Verrips, C. T. (2006). Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated aggregation of nuclear polyoma-binding protein with a single-domain intracellular antibody. *Hum Mol Genet*, 15(1):105–111.
143. [Vu et al.1997] Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., and Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama vh sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*, 34(16-17):1121–1131.
144. [Wang et al.1997] Wang, X. D., Luo, J., Guo, Z. Q., Zhou, J. M., and Tsou, C. L. (1997). Perturbation of the antigen-binding site and staphylococcal protein a-binding site of igg before significant changes in global conformation during denaturation: an equilibrium study. *Biochem J*, 325 (Pt 3):707–710.
145. [Wang et al.2000] Wang, G. F., Cao, Z. F., Zhou, H. M., and Zhao, Y. F. (2000). Comparison of inactivation and unfolding of methanol dehydrogenase during denaturation in guanidine hydrochloride and urea. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(8):873–878.
146. [Wesolowski et al 2009] Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M.,Cauerh A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplein F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D., Goldbaum F., Haag F and Koch-Nolte F. (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol*
147. [Wieser 1998] Wieser, H. (1998) Investigations on the extractability of gluten proteins wheat bread in comparison with flour. *Z. Lebensm Unter Forshc A*, 207:128–132
148. [Wieser and Seilmeier 2002] Wieser H.and Seilmeier W. (2002). Determination of gliadin and gluten in wheat starch by means of alcohol extraction and gel permeation chromatography. *Proceeding of the 17th Meeting of the European Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, 53-57.
149. [Wieser2007] Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*, 24(2):115–119.
150. [Yang and Tsou1995] Yang, H. J. and Tsou, C. L. (1995). Inactivation during denaturation of ribonuclease a by guanidinium chloride is accompanied by unfolding at the active site. *Biochem J*, 305 (Pt 2):379–384.
151. [Zarkadas et al.2006] Zarkadas, M., Cranney, A., Case, S., Molloy, M., Switzer, C., Graham, I. D., Butzner, J. D., Rashid, M., Warren, R. E., and Burrows, V. (2006). The impact of a gluten-free diet on adults with coeliac disease: results of a national survey. *J Hum Nutr Diet*, 19(1):41–49.
152. [Zhang et al.2004] Zhang, J., Tanha, J., HIRAMA, T., Khieu, N. H., To, R., Tong-Sevinc, H., Stone, E., Brisson, J. R., and MacKenzie, C. R. (2004). Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *J Mol Biol*, 335(1):49–56.
153. [Zhou et al.1993] Zhou, H., Fisher, R. J., and Papas, T. S. (1993). Universal immuno-pcr for ultra-sensitive target protein detection. *Nucleic Acids Res*, 21(25):6038–6039