

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

"Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis de prolaminas en alimentos y estudios de aspectos inmunológicos de la enfermedad celíaca".

Fernando Gabriel Chirido

Tesis Doctoral

Directores: Dr. Carlos Alberto Fossati
Dra. María Cristina Añón

1995

*a Claudia, por su ayuda, cariño y enorme paciencia.
a mis padres y mi familia.*

Agradecimientos

- a los doctores Carlos Alberto Fossati y María Cristina Añón, por su calidad humana, por brindarme esta oportunidad y todo su apoyo cuando lo necesité, logrando, a pesar de mí, dirigir este trabajo de Tesis.
- a Carlos Rubbi, Norberto Zwirner y Guillermo Docena, quienes me ayudaron en todo momento y me enseñaron con su experiencia.
- a Marcos Civello y Gustavo Martinez, por todos y cada uno de "esos días de aquellos".
- a los compañeros del laboratorio, en especial a Silvana Petrucelli, Patricio de Urraza y German Jovanovich, quienes siempre tuvieron excelente predisposición para ayudarme.
- a Martín Rumbo, por su compañerismo.
- a los compañeros del CIDCA que colaboraron con mi trabajo, y en especial a Aldo Campana y Cecilia Korda, por su responsabilidad y eficiencia.
- a los compañeros del IDEHU, en especial a Rita Stumpo, Pablo Baldi, Fernando Goldbaum, Andrea Llera, Lilian Plotkin, Guillermo Giambartolomei e Irina Mathov, quienes hicieron posible gran parte mi trabajo.
- a los doctores Ricardo Margni y Juliana Leoni, por haber permitido que parte de este trabajo haya sido realizado en el IDEHU.
- a la Asociación Celíaca Argentina, por confiar en mí y darme su apoyo.
- al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca con la cual este trabajo pudo ser realizado.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis, han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

- **"Fractionation of wheat, barley and rye prolamins by cation-exchange FPLC"**

F.G. Chirido, C.A. Fossati and M.C. Añón.

Journal of Agricultural and Food Chemistry (1994) **42**: 2460-2465.

- **"Metachromatic effect in wheat, barley and rye prolamins".**

F.G. Chirido, C.A. Fossati and M.C. Añón.

Journal of Food Biochemistry (1995) **18** (3): 185-197.

- **"Optimization of a competitive ELISA for quantification of prolamins in food"**

F.G. Chirido, M.C. Añón and C.A. Fossati.

Enviado para su publicación en Food and Agricultural Immunology.

Abreviaturas

AcMo	anticuerpo monoclonal
AGA	anticuerpos anti-gliadinas
A-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones ácidas (pH=3.1)
BM	buffer muestra para SDS-PAGE
BSA	albúmina sérica bovina
CD	"cluster" de diferenciación
DLG	dieta libre de gluten
DO	densidad óptica
DS	desviación estandard
EC	enfermedad celíaca
ELISA	enzimoinmunoanálisis
EMA	anticuerpos anti-endomisio
FCS	suero bovino fetal
FPLC	cromatografía líquida de alta resolución
GKN	solución salina tamponada-glucosada
HAT	suplemento de hipoxantina, aminopterina y timidina
HT	suplemento de hipoxantina y timidina
HLA	antígenos leucocitarios humanos
IEF	isoelectroenfoque
IF	inmunofluorescencia
IEL	linfocitos intraepiteliales
kDa	kiloDaltons
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mr.	masa molecular relativa

NSO	mieloma no secretor de inmunoglobulinas
PBS	solución fisiológica isotónica tamponada con fosfatos
PBS-T-L	PBS suplementado con Tween 20 0,05% y leche descremada en polvo 1%
pI	punto isoeléctrico
PSPG	suplemento de penicilina, estreptomina, piruvato sódico y glutamina.
RPMI-1640	medio de cultivo para células
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
TBS	solución salina isotónica tamponada con Tris-HCl.
TcR	receptor de linfocito T

Índice

	Página
Introducción.	1
1.- Conceptos generales.	2
2.- Enfermedad Celíaca.	3
2.1.- Aspectos clínicos.	3
2.2.- Diagnóstico.	4
2.3.- Epidemiología.	5
2.4.- Tratamiento.	6
2.5.- Cambios en el epitelio intestinal.	7
2.6.- Etiología y patogénesis.	8
2.7.- Enfermedad celíaca y HLA.	12
2.8.- Inmunología de la mucosa intestinal.	14
2.8.1.- Antígenos dietarios y tolerancia oral.	14
2.8.2.- Expresión de moléculas de HLA clase II en epitelio intestinal.	16
2.8.3.- Presentación de péptidos derivados de prolaminas.	16
2.8.4.- Poblaciones de linfocitos T en la mucosa intestinal.	18
2.9.- Serología y diagnóstico de enfermedad celíaca.	21
2.9.1.- Anticuerpos anti-gliadinas.	21
2.9.2.- Anticuerpos anti-endomisio.	22
2.9.3.- Detección de enfermedad celíaca en población asintomática.	23
3.- Proteínas nocivas a los enfermos celíacos.	25
3.1.- Clasificación, características estructurales y fisicoquímicas.	25
3.2.- Extracción y separación de prolaminas.	28
3.3.- Análisis inmunoquímico de prolaminas.	28
3.4.- Cuantificación inmunoquímica de gliadinas.	30
Objetivos.	32
Materiales y métodos.	34
1.- Preparación de fracciones proteicas de distintos vegetales.	35
1.1.- Obtención de la <i>fracción proteínas totales</i> .	35
1.2.- Obtención de la <i>fracción prolaminas</i> .	35
1.3.- Obtención de la <i>fracción enriquecida en ω-gliadinas</i> .	35
2.- Técnicas electroforéticas.	35
2.1.- Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).	35
2.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH = 3.1 (A-PAGE).	36
2.3.- Coloración con Coomassie Brilliant Blue R-250.	36
3.- Espectrofotometría.	36
3.1.- Determinación del espectro de absorción.	36
3.2.- Registro densitométrico.	36
4.- Isoelectroenfoque.	36
5.- Preparación de soluciones estándar.	37
6.- Cuantificación de prolaminas mediante métodos generales de determinación de proteínas.	37

7.- Purificación de prolaminas por FPLC de intercambio catiónico.	37
7.1.- Preparación de las muestras.	37
7.2.- FPLC de intercambio catiónico en columna analítica.	37
7.3.- Separación de gliadinas por FPLC de intercambio catiónico en columna preparativa.	38
8.- Obtención de anticuerpos policlonales.	38
9.- Producción de anticuerpos monoclonales.	38
9.1.- Plan de inmunización.	38
9.2.- Cultivo de las células de mieloma.	38
9.3.- Obtención de esplenocitos.	38
9.4.- Protocolo de fusión celular.	39
9.5.- Conservación de líneas celulares.	39
9.6.- Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.	39
9.7.- Producción de líquido ascítico.	40
10.- Purificación de anticuerpos monoclonales por FPLC de intercambio aniónico.	40
10.1.- Preparación de las muestras.	40
10.2.- FPLC analítico de intercambio aniónico.	40
10.3.- FPLC preparativo de intercambio aniónico.	40
11.- Marcación de los anticuerpos monoclonales.	40
12.- Enzimoanálisis (ELISA) con anticuerpos policlonales.	41
12.1.- ELISA indirecto.	41
12.2.- ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales.	41
12.2.1.- Sensibilización.	41
12.2.2.- Formación de complejos inmunes en fase líquida (Preincubación).	41
12.2.3.- Competición con gliadina en fase sólida.	41
12.2.4.- Incubación con el conjugado a peroxidasa y reacción de color.	41
12.2.5.- Preparación de muestras de alimentos.	42
12.3.- ELISA de desplazamiento entre extractos proteicos.	42
12.4.- Comparación con un kit comercial.	42
13.- Enzimoanálisis con anticuerpos monoclonales.	42
13.1.- ELISA competitivo secuencial con anticuerpos monoclonales.	42
13.1.1.- Sensibilización.	42
13.1.2.- Formación de complejos inmunes en fase líquida (Preincubación).	42
13.1.3.- Competición con gliadina en fase sólida.	43
13.1.4.- Incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina y reacción de color.	43
13.2.- ELISA de captura.	43
13.3.- ELISA de inhibición de la unión de anticuerpos monoclonales biotinilados.	43
14.- Suero de pacientes.	43
15.- "Immunoblotting".	44
15.1.- Análisis frente a proteínas resueltas por SDS-PAGE.	44
15.2.- Análisis frente a proteínas resueltas por A-PAGE.	44
Resultados y discusión.	45
1.- Extracción y caracterización de las prolaminas de trigo, cebada y centeno.	46
1.1.- Análisis de la extracción de prolaminas con distintos solventes.	46
1.2.- Obtención de la <i>fracción enriquecida en ω-gliadinas</i> por extracción secuencial.	47
1.3.- Determinación del espectro de absorción.	48
1.4.- Análisis de las prolaminas por A-PAGE.	49
1.5.- Discusión.	51

2.- Separación de prolaminas mediante FPLC de intercambio catiónico.	55
2.1.- Optimización de la separación de gliadinas mediante FPLC.	55
2.2.- Separación de hordeínas y secalinas.	57
2.3.- FPLC preparativo.	59
2.4.- Análisis de diferentes cultivares de trigo por FPLC.	60
2.5.- Discusión.	62
3.- Optimización de un ELISA competitivo con anticuerpos policlonales para la cuantificación de prolaminas.	64
3.1.- Preparación y evaluación de la solución estándar de gliadinas.	64
3.1.1.- Preparación de la solución estándar.	64
3.1.2.- Evaluación de métodos generales de cuantificación de proteínas aplicados a prolaminas.	64
3.2.- Optimización del ELISA competitivo.	66
3.2.1.- Obtención y caracterización del suero anti-gliadinas.	66
3.2.2.- Optimización de las etapas del ensayo.	67
3.2.3.- Análisis del ensayo cuantitativo.	69
3.2.4.- Análisis de la reactividad cruzada entre proteínas de distintos vegetales.	69
3.2.5.- Análisis del efecto del solvente de extracción sobre la inmunodetección.	71
3.2.6.- Análisis comparativo del ELISA competitivo frente a un ELISA comercial.	71
3.2.7.- Análisis de muestras de alimentos por ELISA competitivo.	72
3.3.- Discusión.	74
4.- Aplicación de anticuerpos monoclonales al estudio y la cuantificación de prolaminas.	79
4.1.- Producción y caracterización de AcMo anti-prolaminas.	79
4.2.- Estudio del perfil de reactividad.	80
4.3.- Reactividad de los AcMo contra diferentes cultivares de trigo.	82
4.4.- Purificación de los AcMo.	83
4.5.- Análisis por SDS-PAGE e isoelectroenfoque de los AcMo purificados.	85
4.6.- Reactividad de los AcMo purificados frente a gliadinas separadas por A-PAGE.	86
4.7.- Análisis de epitopes reconocidos por los AcMo.	87
4.8.- Enzimoimmunoensayos cuantitativos con AcMo anti-prolaminas.	88
4.8.1.- Desarrollo de un ELISA competitivo secuencial con AcMo.	88
4.8.2.- ELISA de captura con AcMo.	89
4.9.- Discusión.	90
5.- Estudio de la reactividad de los anticuerpos séricos de enfermos celíacos.	94
5.1.- Análisis de especificidad de los anticuerpos anti-prolaminas.	94
5.2.- Análisis por ELISA de los anticuerpos séricos anti-gliadinas.	95
5.3.- Comparación de las determinaciones de anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio.	97
5.4.- Discusión.	99
Discusión general.	103
Conclusiones.	110
Apéndice.	114
Bibliografía.	120

Introducción

1.- Conceptos generales.

La enfermedad celíaca (EC), es una intolerancia permanente a la ingesta de un grupo de proteínas de trigo, cebada, centeno y triticale, denominadas prolaminas. Estas proteínas desencadenan, en individuos genéticamente susceptibles, una enfermedad gastrointestinal, debida a la lesión de la mucosa del intestino delgado, que conduce a un estado de malabsorción.

Durante la fabricación de los alimentos, las prolaminas de la harina de trigo (gliadinas y gluteninas) sufren cambios físicoquímicos, que llevan a la formación del gluten, estructura proteica que presenta la característica única de formación de masa, razón por la cual, el trigo es el cereal mundialmente más empleado. Las gliadinas son clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética decreciente a $\text{pH} = 3$ en α -, β -, γ - y ω -gliadinas. Las prolaminas de trigo, cebada y centeno, presentan grupos con alta homología y por lo tanto, alta reactividad inmunoquímica compartida.

En general, la EC se presenta en el transcurso de los primeros tres años de vida. Si no es tratada conduce a alteraciones neurológicas o fallas de crecimiento irreversibles y a la muerte. La única forma de tratamiento es una dieta estricta libre de las proteínas nocivas, mediante la cual, los síntomas desaparecen y se recupera la morfología intestinal.

Esta enfermedad es de relevancia dada su alta incidencia, que en términos generales, se considera cercana a 1:1000. Sin embargo, la incidencia real es mayor, dado que existe una alta proporción de pacientes asintomáticos.

El proceso que conduce a la lesión de la mucosa es poco conocido, pero es ampliamente aceptado que la respuesta inmune hacia las prolaminas participa en el desarrollo de esta patología. El 90-95% de los pacientes expresan el alelo HLA-DQ2, siendo ésta una de las enfermedades más fuertemente asociadas a HLA.

El diagnóstico es realizado mediante la observación microscópica de biopsias de intestino delgado. Se observa la mucosa típicamente plana con atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas. Existe infiltración en epitelio y lámina propia, de linfocitos y células plasmáticas, respectivamente. Si bien la biopsia es el criterio diagnóstico definitivo, es una técnica cruenta y no permite un seguimiento periódico de los pacientes.

Los enfermos celíacos presentan anticuerpos anti-gliadinas, los que son empleados en pruebas serológicas para el estudio y la evaluación de la EC. También se generan autoanticuerpos (anti-endomisio), los que junto con los anteriores, son útiles en el diagnóstico de EC y en particular, en la detección de enfermos celíacos asintomáticos.

Cantidades mínimas de las prolaminas nocivas desencadenan alteraciones en la mucosa intestinal de enfermos celíacos. Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud ha establecido que para declarar a un alimento exento de gluten, el contenido de prolaminas debe ser inferior a 1 mg/100 g de producto seco. Por lo tanto, resulta imprescindible disponer de métodos de muy alta detectabilidad. Las técnicas inmunoquímicas, en especial los enzoinmunoensayos, se han empleado como métodos cuantitativos. Sin embargo, no todos los ensayos cumplen los requerimientos de nivel de detección, especificidad y capacidad de cuantificar prolaminas aún en productos térmicamente procesados.

Dado que gran parte del conocimiento actual sobre EC ha sido obtenido recientemente, se presenta una revisión bibliográfica que abarca distintos aspectos inmunológicos de la EC, considerando los posibles mecanismos moleculares de la patogénesis, métodos de diagnóstico y evaluación de enfermos celíacos, así como también una descripción de algunas propiedades, caracterización y cuantificación inmunoquímica de las prolaminas.

2.- Enfermedad celíaca.

2.1.- Aspectos clínicos.

La enfermedad celíaca (EC) es una de las enfermedades gastrointestinales crónicas más frecuentes en niños y adultos. Se presenta en individuos genéticamente susceptibles, tras la ingesta de alimentos que contienen prolaminas de trigo, cebada, centeno y triticale. Si bien avena ha sido considerada como uno de los cereales tóxicos, actualmente su participación en la patogénesis de la EC es cuestionada (Dicke y col., 1953; Ciclitira y Hall, 1990; Dinari y col., 1992).

En la EC se observa una alteración de la mucosa del intestino delgado provocada por la interacción de las prolaminas con el epitelio intestinal, anormalidad que conduce a la pérdida de funcionalidad y malabsorción. Si bien la alteración es más pronunciada en duodeno y yeyuno, puede observarse en todo el intestino, siendo finalmente, la malabsorción la causa del cuadro clínico. En niños, los síntomas generales son: retraso de crecimiento, pérdida de peso, desnutrición, irritabilidad, hipotonía, letargia, piel seca. Los síntomas gastrointestinales son: dolor y distensión abdominal, diarrea, esteatorrea, vómitos. En muchos casos, la sintomatología no es completa, en particular, cuando la aparición de la enfermedad ocurre a mayor edad, donde otras alteraciones son motivo de la consulta médica, como anemia, alteraciones ginecológicas, neurológicas, etc. (Dinari y col., 1992; Howdle, 1992).

La mayor parte de esta sintomatología, al igual que los cambios en la mucosa intestinal, son rápidamente revertidos mediante una dieta libre de gluten (DLG). Sin embargo, en ocasiones el diagnóstico se realiza tardíamente, pudiendo observarse en niños, alteraciones en el desarrollo o bien trastornos neurológicos que son irreversibles.

Es importante destacar la asociación de EC con tumores. Aproximadamente el 10% de los pacientes celíacos adultos no tratados desarrollan

una enfermedad neoplásica, siendo el linfoma T la más frecuente, seguido del adenocarcinoma de intestino delgado (Isaacson, 1992). En estos casos, es posible que la estimulación permanente de la mucosa, en pacientes celíacos que no siguen una estricta DLG, desencadene la transformación maligna. Se observó, en enfermos celíacos bajo estricta DLG, que el riesgo de desarrollar diferentes tipos de neoplasias es similar al de la población general. Esto refuerza la importancia de la dieta (Ashkenazi y Baratz, 1992).

La edad de aparición de los síntomas es variable habiéndose observado tan tempranamente como a los seis meses de edad. La mayor parte de los casos son detectados entre el primer y tercer año de vida. El tiempo de aparición puede estar relacionado al período de lactancia y al momento de introducción del gluten en la dieta (Greco y col., 1985; Maki, 1992). Sin embargo, en algunos casos existe un período de latencia, que puede llevar varios años (Marsh, 1992).

Existen varias enfermedades no intestinales que se presentan simultáneamente con la EC. La relación entre ellas es poco conocida. Se han observado alteraciones pulmonares, hepáticas, cardíacas y nefrológicas. En algunos casos se sospecha de fenómenos autoinmunes: trombocitopenia, tiroiditis o enfermedades con complejos inmunes circulantes, los que son generados debido a la mucosa dañada y se depositan en otros tejidos, como en las artritis. La EC también se encuentra asociada a fibrosis quística y síndrome de Down (Troncone y Auricchio, 1991; Branski y col., 1992).

Es frecuente encontrar en la población celíaca, deficiencia selectiva de IgA. Por otro lado, la permeabilidad incrementada de la mucosa intestinal dañada, puede explicar los fenómenos de intolerancia a otros antígenos dietarios, como leche, huevo, pescado, etc., los que pueden llevar a manifestaciones en piel, como urticaria y vasculitis cutánea, las que son más frecuentes en aquellos pacientes celíacos que presentan déficit

selectivo de IgA (Troncone y Auricchio, 1991; Branski y col., 1992).

La EC está también asociada a diabetes mellitus insulino-dependiente, tal vez por estar ambas ligadas a HLA, especialmente por DQB1*0201 (Gadd y col., 1992; Gutierrez-Lopez y col., 1992). Empleando como método de "screening" la determinación de anticuerpos IgA anti-gliadinas se encontró que el 3.5% de los niños diabéticos presentan EC (Troncone y Auricchio, 1991).

Dermatitis herpetiforme es una enfermedad crónica caracterizada por pápulas eritematosas y vesículas en piel. Aparece en adultos durante la tercera o cuarta década de vida. Está asociada a EC, ya que la mayoría de los pacientes presentan alteraciones en la mucosa intestinal, los que responden, al igual que las manifestaciones en piel, a una DLG (Ferguson y col., 1985; Klaus, 1992).

Si bien, entre 80-100% de los pacientes con dermatitis herpetiforme, presentan diferentes grados de alteración morfológica, llegando hasta la atrofia vellositaria, en general no existe sintomatología gastrointestinal ni signos de malabsorción (Klaus, 1992; Rosenberg y col., 1992).

En piel aparecen depósitos granulares de IgA, en membrana basal de la dermis, que fijan complemento y desencadenan la lesión. Ya que la mayoría de los pacientes celíacos no presentan lesiones en piel y los pacientes con dermatitis herpetiforme no tienen síntomas gastrointestinales, se suponen dos eventos distintos, uno asociado a la enteropatía por intolerancia al gluten y el otro a los depósitos de IgA en dermis (Klaus, 1992). Los estudios de Balas Perez y col. (1992), demostraron que dermatitis herpetiforme está asociada a HLA-DQ2 al igual que EC. Aunque no existe acuerdo en la relación entre EC, dermatitis herpetiforme y gluten, el beneficio de la DLG ha sido claramente establecido, al igual que la reaparición de los síntomas si se interrumpe la dieta (Ferguson y col., 1985; Klaus, 1992).

2.2.- Diagnóstico.

La típica biopsia de "mucosa plana", con atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas, no es sólo indicativa de EC, muchas otras condiciones llevan a esta alteración de la mucosa intestinal, como son: dermatitis herpetiforme, alergia a proteínas de soja, leche y gluten, deficiencia selectiva de IgA, infección por *Giardia lamblia*, algunas neoplasias intestinales, etc. Es de suma importancia lograr una discriminación entre EC y otras entidades clínicas, pues muchas de ellas aparecen en las mismas edades y con una presentación sintomatológica similar (Faber, 1992; Marsh, 1992).

Debido al solapamiento clínico entre EC y otras enfermedades, y que una sola biopsia es insuficiente para llegar a un diagnóstico definitivo, la European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN), estableció el criterio diagnóstico para EC. Este se basa en tres biopsias duodenales, la primera, en el momento de aparición de los síntomas, debe mostrar la característica "mucosa plana". Luego de instaurada la DLG, el paciente debe presentar una mejora clínica general y la segunda biopsia debe mostrar cambios histológicos tendientes a la normalización de la estructura epitelial. En una tercera biopsia, luego de un desafío mediante la ingesta de gluten por al menos tres meses, deben reaparecer las alteraciones histológicas típicas (Howdle, 1992).

Este criterio diagnóstico es definitivo en la mayoría de los casos. Sin embargo, existe discusión respecto a los tiempos en que debe realizarse la biopsia una vez establecida la DLG y en el desafío. El criterio comúnmente adoptado, es que la segunda biopsia se realice al menos un año después de comenzada la DLG, la tercer biopsia puede ser realizada entre tres meses y un año después de iniciado el desafío, dependiendo de la respuesta del paciente a la reintroducción del gluten en la dieta.

En la actualidad, si bien la ESPGAN ha establecido tres biopsias, la mayoría de los diagnósticos son basados en las dos primeras (Howdle, 1992).

El criterio diagnóstico de tres biopsias de ESPGAN ha sido siempre objetado debido a que:

- 1) se requiere mucho tiempo hasta un diagnóstico definitivo,
- 2) no tiene en cuenta la variabilidad de la expresión clínica de la enfermedad,
- 3) no se tiene en cuenta que, después de los 2 o 3 años de edad, es poco frecuente observar atrofia vellositaria en enfermedades distintas a EC,
- 4) es poco ético un desafío prolongado con gluten, ya que se sabe que se induce daño a la mucosa (Guandalini y col., 1989).

En la actualidad, las manifestaciones clínicas, incluso las presentaciones atípicas (anemia ferropénica, baja estatura, constipación, etc.), las determinaciones serológicas (anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio), la tipificación de HLA, conjuntamente con una biopsia con hiperplasia de las criptas y atrofia vellositaria subtotal, dejan muy pocas dudas sobre la presencia de EC. Bajo estas condiciones el diagnóstico correcto se establece en el 96% de los casos (Guandalini y col., 1989). En el estudio de estos autores, se encontró que la edad media al diagnóstico era de 3.5 años, la edad media al momento del desafío era de 5 años. El tiempo de desafío era variable, pero se ha demostrado que, en la mayoría de los casos, las alteraciones en la mucosa son evidentes a los 3 meses, y que tiempos prolongados de desafío no aumentan la capacidad diagnóstica y afectan al desarrollo del paciente. Por lo tanto, se recomienda el seguimiento periódico mediante la determinación de anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio, evitar la segunda biopsia y no hacer un desafío con gluten en los pacientes con fuerte sospecha de EC, o que éste se realice por un período no mayor a 3 meses y suspender el desafío ante

manifestaciones clínicas o el aumento del nivel de los anticuerpos.

Entre las enfermedades que presentan similar sintomatología y biopsia duodenal, deben diferenciarse EC y alergia al gluten. En esta última, la sintomatología es la misma y en muchos casos la "mucosa plana" está presente. Sin embargo, mientras EC es una condición permanente y la dieta debe ser seguida aún por los pacientes asintomáticos, la alergia al gluten es, en general, transitoria y en muchos casos no requiere una estricta DLG de por vida (Faber, 1992).

La diferenciación a través de la biopsia, entre EC y alergia al gluten es difícil, ya que como se dijo, la tercer biopsia que en general en una alergia al gluten es normal, puede ser normal en algunos enfermos celíacos. Es común que para diferenciarlas, se realicen test por pruebas en piel, tratando de evidenciar la respuesta a IgE en los pacientes alérgicos, mientras que en los enfermos celíacos se estudian los anticuerpos IgG e IgA anti-gliadinas, aunque en algunos casos no se obtienen resultados concluyentes (Faber, 1992).

2.3.- Epidemiología.

La incidencia real de EC es difícil de establecer pues si bien muchos casos presentan un cuadro gastrointestinal florido, en otros, la presentación clínica es atípica. Además, debe tenerse en cuenta a los pacientes asintomáticos, entre los cuales se encuentran aquellos con alteraciones en la mucosa intestinal (condición silente) y en los que no hay alteración en el epitelio, a menos que se haga una sobrecarga de gluten en la ingesta (condición latente) (Ferguson y col., 1993).

Actualmente la EC es más rápidamente detectada y es mayor el número de casos que llegan a la vida adulta. El 40-50% de los casos son diagnosticados antes de los tres años de edad.

En niños, la EC es 10% más frecuente en mujeres que hombres, sin embargo, en la edad adulta esto se invierte llegando a una relación 2:1, similar a la observada en dermatitis herpetiforme (Logan, 1992).

En niños, la incidencia por edad está cambiando y es posible que se desplace hacia edades mayores. Esto puede deberse a una alimentación con leche materna más prolongada, disminuyendo la introducción de cereales a corta edad, y al uso de alimentos libres de gluten o fórmulas con baja antigenicidad (Greco y col., 1985; Troncone y Auricchio, 1991).

En Suecia, Inglaterra, Holanda, Italia, Irlanda Dinamarca, Noruega, Australia, se encuentra mayor incidencia. Considerando todas las regiones afectadas, la cifra de prevalencia aproximada es 1:1000 (Logan, 1992). Si bien en nuestro país no existe datos epidemiológicos, por la constitución étnica, se estima que la prevalencia es cercana a ese valor.

Los casos asintomáticos han sido identificados en los programas de "screening" de la población de riesgo (parientes de primer grado de enfermos celíacos, pacientes con enfermedades asociadas a EC) o aún en la población normal. En estos estudios, se observó que el 10% de los parientes de primer grado de enfermos celíacos presentan una mucosa con alteraciones típicas, las que iniciada la DLG retornan a la morfología normal (Troncone y Auricchio, 1991).

Se realizó un estudio sobre población normal, empleando como prueba de "screening" la determinación de anticuerpos séricos IgA anti-gliadinas. Los individuos que resultaron positivos en la serología, fueron analizados por biopsia, encontrando que aproximadamente 1:200, presentaban mucosa con morfología alterada (Troncone y Auricchio, 1991).

No se ha encontrado relación entre el estado morfológico de la mucosa y la presentación sintomatológica, pero en muchos pacientes asintomáticos la enfermedad puede aparecer cuando algún otro proceso inflamatorio amplifica la condición latente (Marsh, 1992). Considerando que sólo un 30-40% de los enfermos celíacos presentan síntomas, se estima que la incidencia real de la enfermedad puede ser de 1:300 (Auricchio y col., 1990).

2.4.- Tratamiento.

Se estima que el consumo normal promedio de gluten es de aproximadamente 20 g/día (una rodaja de pan contiene 1g) (Howdle, 1992). Pero, una ingesta de 1 a 2 mg diarios durante seis semanas induce síntomas en pacientes en remisión (Troncone y Auricchio, 1991).

La respuesta a la DLG es comúnmente rápida, en especial en niños de corta edad. Existe una evolución favorable en el estado general del paciente en pocos días. Las diarreas y distensión abdominal son mejoradas en pocas semanas. La morfología de la mucosa vuelve a la normalidad en meses o luego de uno o dos años. Aunque en algunos casos aún con DLG persisten alteraciones en la mucosa (Dinari y col., 1992).

La reintroducción de gluten en la dieta conduce, en períodos variables, a la aparición de los síntomas tempranos: vómitos, diarreas y malestar abdominal. Las anormalidades en la mucosa son observadas rápidamente, en algunos casos horas después de la ingesta, en otros casos varios meses después. Debido a esta variabilidad, una evaluación de la respuesta a la reintroducción de gluten se hace en general uno o dos años después de comenzado el desafío (Dinari y col., 1992).

En niños, la ingestión de pequeñas cantidades de gliadinas (100 a 500 mg) diariamente causa alteraciones en la mucosa intestinal: disminución de la relación altura de la vellosidad/profundidad de la cripta, aumento del número de linfocitos intraepiteliales, así como también aumento de IgA sérica anti-gliadinas. Estos resultados refuerzan la importancia de la dieta (Catassi y col., 1993).

Aunque en algunos adolescentes o adultos, con baja ingesta de gluten no se observan síntomas, la biopsia de intestino delgado muestra alteraciones típicas. Por lo tanto, el tratamiento mediante DLG es necesario para evitar las complicaciones tardías de la EC: desnutrición, anemia crónica, infertilidad, exacerbación durante el embarazo y desarrollo de neoplasias (Troncone y Auricchio, 1991; Dinari y col., 1992).

Algunos enfermos celíacos no responden a una estricta DLG. Esto puede deberse a la presencia simultánea de otra intolerancia alimentaria (alergia a proteínas de la leche, huevo, soja, etc.), pacientes con úlcera duodenal, linfoma T intestinal, etc., o a la presencia de una lesión hipoplásica donde no hay regeneración del epitelio y los cambios morfológicos son irreversibles (Marsh, 1992).

2.5.- Cambios en el epitelio intestinal.

Si bien la mayoría de los enfermos celíacos sintomáticos presentan los cambios morfológicos típicos de "mucosa plana", en realidad existe un espectro de alteraciones que va desde cambios morfológicos leves (infiltrado linfocitario) hasta la lesión atrófica. Marsh (1992), ha propuesto una clasificación donde tres tipos de lesión son claramente diferenciables: infiltrativa, hiperplásica y destructiva.

Lesión infiltrativa: la estructura de la mucosa es normal, sin cambios morfológicos pero existe un marcado aumento de una población de linfocitos pequeños no mitóticos (linfocitos intraepiteliales, IEL). Este tipo de lesión está presente en el 10-20% de los parientes de primer grado de enfermos celíacos y 40% de los pacientes con dermatitis herpetiforme no tratada. La lesión infiltrativa es inducible por gluten, puesto que un digesto de tripsina-pepsina de gliadinas en bajas dosis (0,1 g a 1,5 g) es suficiente para que pacientes celíacos en remisión muestren una respuesta a péptidos de gliadinas tiempo y dosis dependiente (Leigh y col., 1985). Es de destacar, que la lesión infiltrativa aunque no específica, es un indicador sensible, que puede ser de gran utilidad como un marcador precoz de EC (Troncone y Auricchio, 1991; Ferguson y col., 1993).

Lesión hiperplásica: en esta lesión se observa un infiltrado de IEL en la vellosidad y en las criptas. La zona de las criptas se ve engrosada y las células epiteliales inmaduras están incrementadas en número y aumenta su actividad mitótica. La hiperplasia de las criptas es un intento por compensar la pérdida de enterocitos funcionales en la vellosidad. Los estudios cinéticos muestran que el ciclo de vida del enterocito maduro está disminuido y que el compartimento proliferativo está aumentado (la producción celular es de 2 a 6 veces lo normal). Esta lesión es frecuente en parientes de primer grado de enfermos celíacos, en un 20% de los pacientes con dermatitis herpetiforme no tratados y puede ser desencadenada en pacientes celíacos en remisión con una única ingesta de 3-6 g del digesto de tripsina-pepsina (Marsh, 1992).

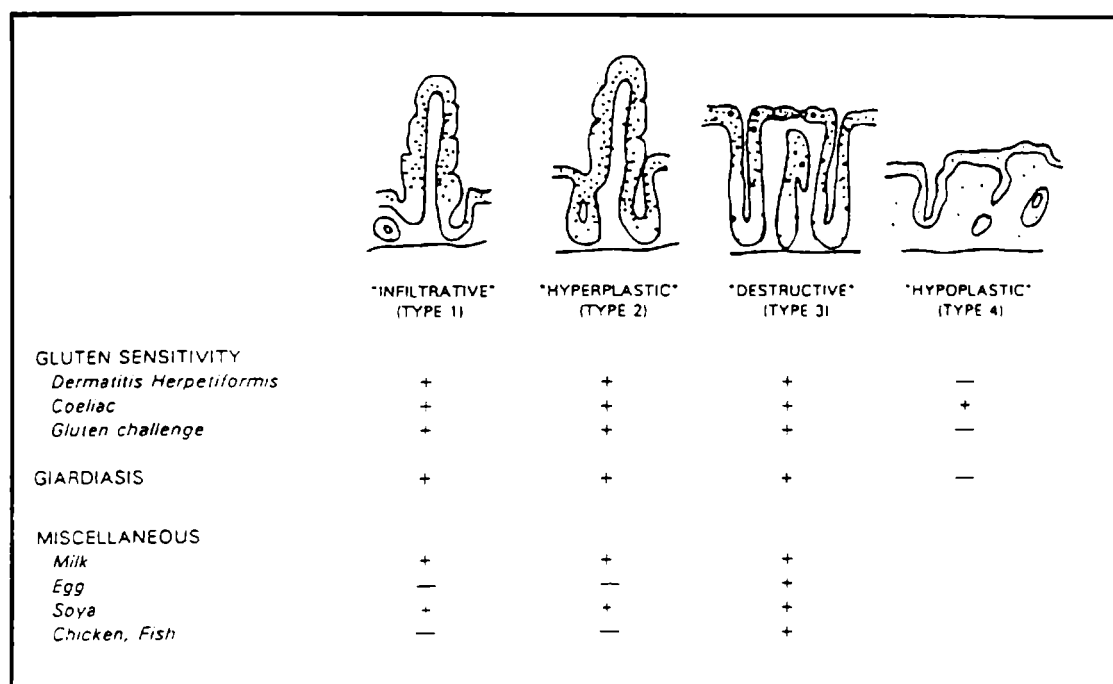


Figura 1. Cambios morfológicos en la mucosa intestinal. Esquema reproducido de Marsh, 1992.

Lesión destructiva: esta forma conduce al cuadro final de mucosa atrófica y plana. En la cual se observa que los enterocitos maduros de la vellosidad pierden su estructura columnar, transformándose en cuboides y disminuyen su número, conduciendo finalmente, a la atrofia vellositaria. Existe hipertrofia de las criptas con incremento de la tasa de división celular e infiltrado linfocitario. En la lámina propia hay edema, con aumento del número de células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos, los que contribuyen a la secreción de mediadores inflamatorios. Se puede demostrar el incremento de la expresión de moléculas de HLA clase II. Como prueba funcional, existe una permeabilidad aumentada.

Esta lesión se presenta en todos los enfermos celíacos sintomáticos, en el 40% de pacientes con dermatitis herpetiforme y en el 10% de los parientes de primer grado de enfermos celíacos. Puede ser desencadenada con una alta dosis oral de gluten en los pacientes celíacos en remisión (Marsh, 1992).

En algunos pacientes celíacos se observa un tipo especial de lesión (lesión hipoplásica), donde la lesión destructiva avanza a cambios

morfológicos irreversibles y sin regeneración del epitelio. Estos pacientes no responden a la DLG (Marsh, 1992).

2.6.- Etiología y Patogénesis.

Es aceptado el rol desencadenante de la ingesta de prolaminas y existe acuerdo en que el sistema inmune intestinal participa en el desarrollo y amplificación de las anormalidades morfológicas y fisiológicas (patogénesis), pero no hay evidencia concluyente sobre el origen de la enfermedad (etiología). Se han propuesto cuatro mecanismos (Davidson y Bridges, 1987; Hekkens, 1991):

- a- defecto enzimático
- b- interacción tipo lectinas entre glucoproteínas del epitelio intestinal y las prolaminas
- c- defecto de permeabilidad de la mucosa
- d- defecto inmunológico

a- **defecto enzimático.** Se supone el déficit de alguna peptidasa o glicosidasa, la que sería esencial para el clivaje (y la detoxificación) de las proteínas de gluten. Se encontraron anomalías en el procesamiento y la actividad enzimática en el lumen intestinal, en el ribete en cepillo y en el

citosol de los enterocitos. Sin embargo, no se ha podido identificar una actividad enzimática como defecto primario en el procesamiento de las proteínas de los cereales (Davidson y Bridges, 1987), si no que parece un efecto secundario al daño de la mucosa intestinal (Bailey y col., 1989).

b- interacción tipo lectinas. Esta hipótesis se basa en una citotoxicidad dada por un componente de las prolaminas con actividad de lectinas (Auricchio y col., 1984). Se ha observado que péptidos de gliadinas causan, *in vitro*, una inhibición irreversible del desarrollo del intestino fetal de rata, así como también aglutinan células de una línea indiferenciada. Se cree que ambos mecanismos son mediados por una actividad tipo lectina (Auricchio y Troncone, 1992). Estos resultados son el único indicio de que el efecto tóxico puede ejercerse sobre la mucosa en la primera fase de su morfogénesis y que, en el daño inicial, no participa la respuesta inmune.

Apoyando esta idea, se observó que una preparación rica en glicoproteínas del gluten (glyc-gli) se unía a glicoproteínas ricas en manosa, y que esta unión era glúcido específica, concluyendo que en el gluten había un componente con actividad de lectina (Davidson y Bridges, 1987). Sin embargo, Kolberg y Sollid (1985), encontraron que en realidad la fracción glyc-gli empleada contenía una lectina (aglutinina de germen de trigo), la cual podía ejercer el efecto citotóxico citado y no ser debido a las prolaminas.

c- defecto en la permeabilidad de la mucosa. Aquí se considera que la permeabilidad de la mucosa intestinal aumentada lleva a la liberación, en mucosa y submucosa, de péptidos de prolaminas que conducen a una cascada de eventos inmunológicos. Los estudios sobre permeabilidad han sido realizados empleando ⁵¹Cr-EDTA (Marsh, 1992). Sin embargo, como se dijo previamente, no ha sido posible discriminar si las alteraciones bioquímicas en la mucosa, eran

consecuencia de un efecto primario o secundario al desencadenamiento de la lesión en la mucosa. En este sentido, Marsh (1992), encontró que una lesión claramente infiltrativa de IEL en la mucosa intestinal, no estaba asociada con una prueba de permeabilidad anormal.

d- hipótesis inmunológica. Existe poca evidencia de que el gluten presente una toxicidad intrínseca sobre el epitelio. En la actualidad, se cree que la lesión es mediada por un mecanismo inmunológico. O'Farrelly y Gallagher (1992), Davidson y Bridges (1987), entre otros autores, consideran a EC como una enfermedad autoinmune atípica, ya que:

- a- está fuertemente asociada a HLA-DQ2,
- b- está localizada en el epitelio intestinal, el cual está intensamente infiltrado por linfocitos.
- c- se observan anormalidades en el número, actividad proliferativa y distribución de células inflamatorias: neutrófilos, mastocitos, eosinófilos, etc.
- d- existe un incremento de células secretorias de IgA e IgM anti-gliadinas y síntesis de anticuerpos anti-gliadinas, ambos eventos inducidos por gluten.
- e- existe depósito de complejos inmunes y complemento en la membrana basal yeyunal luego del desafío.
- f- se observa aparición de autoanticuerpos (anti-endomisio), los que son específicos de la EC.
- g- la administración de corticoesteroides tiene efecto benéfico.

Existen diferentes cuestionamientos a esta hipótesis como por ejemplo:

- La presencia de anticuerpos dirigidos contra gliadinas y otras proteínas dietarias puede ser debida a una incrementada permeabilidad intestinal, más que a una causa de la lesión. Esta idea se basa en que dichos anticuerpos también fueron encontrados en otras enfermedades, donde se observa daño de la mucosa intestinal, como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (Davidson y Bridges, 1987).

- La población normal presenta anticuerpos en menor nivel, pero con el mismo patrón de reactividad que el de los enfermos celíacos, el cual es, en algunos casos, comparable al obtenido con anticuerpos séricos de conejos inmunizados con gliadinas. Esto indicaría que la presencia de anticuerpos anti-gliadinas no es en si misma el origen de la lesión de la mucosa (Devery y col., 1989).
- Es autoinmune atípica puesto que no se autoperpetúa, si no que depende de la presencia del antígeno externo desencadenante (O'Farrelly y Gallagher, 1992).

El conocimiento de los mecanismos patogénicos ha sido difícil de obtener, en gran parte, debido a que no se han encontrado modelos animales que presenten el mismo cuadro de EC, ni modelos experimentales que permitan un estudio completo de las alteraciones. Recientemente, se ha trabajado con perros (Setter Irlandes) y monos, en los que se puede reproducir un cuadro similar a EC, aunque no es la misma entidad clínica (Sjolander y Magnusson, 1987; Troncone y Auricchio, 1991).

Se han empleado métodos *in vitro* para estudiar la toxicidad de las prolaminas, por ejemplo, técnicas de cultivo de especímenes de biopsia de intestino delgado. Estos estudios permitieron observar que, en biopsias de pacientes con enteropatía activa, existe un mejoramiento morfológico y bioquímico si se las cultiva en un medio libre de gliadinas (Falchuk y col., 1974).

Cuando se emplearon especímenes de biopsia yeyunal de individuos control o de enfermos celíacos en remisión, los digestos de tripsina-pepsina de gliadinas no fueron tóxicos, pero sí cuando se analizaron biopsias de enfermos con enteropatía activa. En este sentido, la lesión parece ser gliadina específica, aunque los péptidos

de gliadinas no fueron en si mismos tóxicos, si no que dependen de un mecanismo efector endógeno en una mucosa previamente "activada" (Falchuk y col., 1974). Más recientemente, estudios similares fueron realizados con péptidos derivados de una α -gliadina (de Ritis y col., 1988).

En los estudios *in vitro*, la mucosa de los pacientes celíacos en remisión mostró ser menos afectada que la de los pacientes con enteropatía activa. Además, cuando se cocultiva biopsias de mucosa de enfermos celíacos en remisión, con una de un enfermo con enteropatía activa, se observa alteración en la mucosa normal. Ambos efectos pueden deberse a la liberación de mediadores de la mucosa "activada" (Falchuk y col., 1974).

En un ensayo de cultivo de especímenes de biopsias de enfermos celíacos en remisión, se observó que había alteraciones en la mucosa, cuando se cocultiva las biopsias en presencia de gluten y linfocitos de sangre periférica autólogos (Davidson y Bridges, 1987).

En estudios similares se pudo demostrar la inducción de expresión de moléculas de HLA clase II en células de la cripta, al incubar las biopsias con péptidos de gliadinas (Bland, 1988).

En un modelo experimental en ratas inmunizadas con gliadinas se observó respuesta inmune humoral anti-gliadinas. Cuando se les administraba gliadinas oralmente se observaban alteraciones en la permeabilidad intestinal pero no había cambios morfológicos en la mucosa (Sjolander y Magnusson, 1987). Mientras que en un modelo similar, luego de la repetida administración intragástrica de gliadinas, se observó incremento de células plasmáticas productoras de IgA e IgM en lámina propia, aumento de los niveles séricos de IgG e IgA anti-gliadinas y cambios estructurales en la mucosa (Stepankova y col., 1989).

En los estudios *in vivo* con un único desafío de gluten, se ha observado reducción en la relación altura de la vellosidad/profundidad de la cripta, disminución de la altura del enterocito, incremento del número de IEL y expresión de moléculas de HLA clase II (Bland, 1988). Con un desafío de 6 g de gluten se observan cambios en la población de IEL en 12 horas. Cuando se estudia la biopsia del epitelio rectal con un desafío de 2 g de gluten, es posible observar un marcado incremento de IEL en 1 o 2 horas después de la ingesta. Esto indica que la mucosa rectal, siendo más accesible para los estudios que la duodenal, puede ser un sitio útil para el diagnóstico (Troncone y Auricchio, 1991).

Bailey y col. (1989), estudiaron los cambios producidos en la mucosa intestinal luego de un desafío con 10 g de gluten. Dos horas después de la ingesta, se observa en pacientes celíacos tratados, reducción de la vellosidad y abundante infiltración linfocitaria, acompañados de una importante disminución generalizada de la síntesis de proteínas (entre ellas, enzimas del ribete en cepillo de los enterocitos), mientras que en los controles no se observaron cambios aún con una ingesta de 150 g diarios durante dos meses. Por lo tanto, el déficit enzimático es un evento secundario a la presencia del gluten y no un mecanismo etiológico de la EC.

Estudios realizados por Ensari y col. (1993), mostraron aumento de la expresión de moléculas de adhesión, en especial VCAM-1 (asociada a la migración de neutrófilos), en la microvasculatura de la lámina propia de la mucosa rectal de pacientes celíacos después de un desafío. Este efecto fue seguido por un infiltrado inflamatorio, inicialmente neutrófilos (2 h) y luego linfocitario (8 h). La inducción de procesos inflamatorios, debidos a la migración y extravasación de neutrófilos y linfocitos, parecen ser los eventos iniciales a las alteraciones morfológicas en el epitelio.

La cinética de estos eventos está asociada, en ciertos casos, con una reacción de hipersensibilidad de tipo III de Arthus, y en otros, a reacciones tipo IV. Sin embargo, no ha sido posible identificar a la EC con un único proceso inmunológico (Davidson y Bridges, 1987).

La mayoría de los autores coinciden en que la alteración morfológica del epitelio intestinal puede ser considerada en dos instancias. La primera, en relación al daño primario sobre la vellosidad y la alta tasa de muerte del enterocito, y la segunda son los cambios producidos en las criptas y en lámina propia, como consecuencia de la alta tasa regenerativa y del proceso inflamatorio.

El mecanismo de daño primario al enterocito es aún desconocido (Davidson y Bridges, 1987). Aunque existe disrupción de lisosomas y liberación de enzimas lisosomales las que pueden contribuir a la lesión, las hipótesis de daño por citotoxicidad mediada por células T o NK, así como las mediadas por anticuerpos, no han podido ser claramente establecidas (Marsh, 1992).

Los cambios morfológicos parecen ser debidos a linfocitos de la lámina propia activados por gluten. La lesión puede ser iniciada en la lámina propia, mediante macrófagos que presentan antígeno a linfocitos T CD4⁺, los que montan una respuesta inmune que culmina en un proceso inflamatorio (Marsh, 1992). Loft y col. (1989), demostraron que la microvasculatura de las criptas y de las vellosidades son diferentes. El proceso inflamatorio en la vellosidad lleva a la extravasación de células (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, etc.) y de proteínas, conduciendo al edema. Además hay liberación de citoquinas que conducen por ejemplo a la activación plaquetaria y formación de microtrombos que producen isquemia (Marsh, 1992).

En la "mucosa plana", muchos de los enterocitos que alcanzan la vellosidad son inmaduros. En ellos, por microscopía electrónica, se pueden observar alto número de lisosomas, alteraciones morfológicas en las mitocondrias, cuerpos residuales y gotas de lípidos. El análisis ultraestructural del enterocito, demuestra daño o pérdida de la microvellosidad, incremento de su vacuolización, aumento del número de mitocondrias y lisosomas. Estos rasgos ultraestructurales son compatibles con un proceso isquémico (Iancu y Marsh, 1992). Mientras que, la ultraestructura de las células de la cripta parece normal (Davidson y Bridges, 1987).

Cuando se incrementa la cantidad de gluten ingerida la lesión de la mucosa intestinal de enfermos celíacos sigue una progresión dosis-dependiente. Sin embargo, en un grupo de niños celíacos tratados a quienes se les dio una pequeña porción diaria de pan (2 g), las lesiones en la mucosa aparecieron, aunque no todos los niños presentaron los síntomas típicos (Leigh y col., 1985; Marsh, 1992). Por lo tanto, si bien la sensibilización inmunológica de la mucosa al gluten es un rasgo siempre presente, no es el factor precipitante para la expresión de la lesión intestinal. Para desencadenar los síntomas se requieren, además del contenido de gluten de la dieta y el fenotipo HLA otros eventos, como procesos inflamatorios, digestión disminuída, aumento de permeabilidad, estado nutricional, infección bacteriana, parasitosis, permeabilidad intestinal alterada, cirugía, embarazo, transformación maligna, etc. (Marsh, 1992).

2.7.- Enfermedad celíaca y HLA.

Mediante estudios poblacionales se estableció inicialmente una relación entre EC y HLA-B8. Luego se encontró asociada a DR3 y finalmente se determinó que un heterodímero DQ específico (DQ2) era el responsable de la asociación HLA encontrada y el que presentaba el más alto riesgo

relativo para EC. En desequilibrio de ligamiento se encuentra el haplotipo: A*0101, B*0801, DRB1*0301, DQA1*0501\DQB1*0201, moléculas designadas como: A1, B8, DR3 y DQ2, respectivamente (Sollid y col., 1989).

Sollid y col. (1989), estudiaron una población pediátrica noruega, donde el 98,9% de los enfermos celíacos presentaba DQ2. Estos autores encontraron que el 95,7% de los enfermos era DR3 y 3,2% fueron DR5/DR7. Asimismo, observaron que los genes DQA1 y DQB1 podían estar codificados en cis en el haplotipo DR3DQ2 y en configuración trans en individuos DR5-DQw7/DR7-DQ2, ya que los alelos DR3 y DR5 están asociados al gen DQA1*0501, y DR3 y DR7 a DQB1 *0201. Por transasociación es posible que los individuos DR5/DR7 expresen el mismo heterodímero HLA-DQ2. En consecuencia, este heterodímero es el que determina la asociación primaria de susceptibilidad.

Lundin y col. (1990), demostraron que clones T reconocen la molécula DQ2 cuando está codificada en cis o trans y por lo tanto, el heterodímero formado por transasociación es funcional como molécula presentadora.

Herrera y col. (1989) y Palavecino y col. (1990), estudiaron la asociación de EC y HLA en la población celíaca argentina. Encontraron valores de riesgo significativamente elevados en individuos DR3/DR5, DR3/DR7 y DR5/DR7. El heterodímero DQ2 fue encontrado en 95,2% de los enfermos celíacos y presenta el valor de riesgo relativo más alto (27.49).

Howell y col. (1988), por estudios de RFLP, demostraron la asociación entre HLA-DR3, DQ2 y la subregión DP. Ampliando los estudios sobre el locus DP, Bugawan y col. (1989) y Kagnoff y col. (1989), encontraron que 80% de los pacientes eran DPB4.2 o DPB3, y que el 91% eran DQ2.

Por lo tanto, el alelo DQ2 seguía siendo el principal determinante de la susceptibilidad. Pero la presencia de ambos DPB4.2 y DPB3 aumentaba el riesgo de la EC. Rosenberg y col. (1989), contradiciendo esos resultados, no encontraron una asociación significativa con esas dos variantes alélicas de DP. En este sentido, Salazar y col. (1992), mostraron que sólo los alelos HLA-DPB1*0101 y *0401 están asociados a la EC, y se encuentran en desequilibrio de ligamiento con el haplotipo A1, B8, DR3 y DQ2.

Como existe variación en la frecuencia de diferentes alelos en distintos grupos étnicos, Tighe y col. (1992), estudiaron la frecuencia de alelos de los locus -DP, -DR y -DQ, en enfermos celíacos de poblaciones donde DR3 fuera menos frecuente que en las poblaciones del Norte de Europa. En este estudio, se demuestra que no hay asociación con el locus DP diferente a la provocada por el desequilibrio de ligamiento con -B8, -DR3. Se confirma que la asociación primaria de susceptibilidad es con DQ A1*0501 B1*0201.

Las moléculas de clase II son altamente polimórficas, en particular las regiones hipervariables de la cadena β . Estudios de secuenciación de ADN para luego inferir la cadena aminoacídica, han revelado codones alelo-específicos asociados a EC como el ácido glutámico de la posición 71 en -DR, -DQ (y 69 en -DP) (Marsh, 1992). Estos estudios pueden conducir a determinar las posiciones que determinan finalmente la susceptibilidad. Como en estudios sobre otras enfermedades asociadas a HLA (diabetes mellitus tipo 1 y artritis reumatoidea), donde se espera lograr la identificación de los residuos directamente involucrados en la susceptibilidad y de esta manera, tener mayor conocimiento sobre el proceso patogénico (Nepom, 1989; Baisch y Capra, 1992).

El estudio de HLA en distintas poblaciones determinó que existen entre 1,6 a 13,6% de enfermos celíacos DQ2⁺. Estos pacientes, en su mayoría eran DR4⁺ y presentaban DQB1*0302. Mantovani y col. (1993), analizaron pacientes con las variantes DQB1*0201 y DQB1*0302, y encontraron que siempre la posición 57 de la cadena β era ácido aspártico negativo y que existe una serina en posición 75 de la cadena α de DQA1*0501 que es conservada. En este caso la posición 75 de la cadena α , y en forma similar a lo observado en diabetes mellitus tipo 1, la posición 57 de la cadena β , parecen claves para la susceptibilidad a EC.

También fue estudiada la relación entre EC y genes involucrados en eventos de procesamiento y presentación, como los genes para transportadores de péptidos que codifican dentro del MHC. Los resultados del estudio de Powis y col. (1993), mostraron que no había un incremento del riesgo relativo por la presencia de las variantes TAP1A y TAP2A, si no que estos se encontraban en desequilibrio de ligamiento con DQ2.

Distintas enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoidea, pénfigo vulgaris, están asociadas a la molécula HLA-DQ al igual que EC. Aunque no es claro el origen de tal asociación, se considera que estas moléculas pueden actuar en eventos de supresión o bien modificando el repertorio del receptor del linfocito T (TcR) durante la educación tímica, induciendo luego, por mimetismo molecular, una respuesta autoreactiva (Altman y col., 1991).

Para EC, otra hipótesis es que HLA-DQ2 actúe como una molécula presentadora especial de ciertos péptidos de prolaminas (Tighe y col., 1992).

Esta hipótesis se sustenta en que en enfermos celíacos existe expresión incrementada de moléculas de MHC clase II en enterocitos y en células presentadoras de la lámina propia y por otro lado, se encuentran células T en la mucosa y en la periferia, que son DQ2 y péptido de gliadinas específicas (Lundin y col., 1993; Gjertsen y col., 1994b).

La EC no sigue un patrón de herencia mendeliano, ya que si bien la expresan el 90-95% de los pacientes con el haplotipo HLA-B8, -DR3, -DQ2, 25-30% de los individuos normales en la misma población también lo expresa. Por lo tanto, como no existe un claro mecanismo de herencia, se ha sugerido la participación de otros genes no-MHC en el desarrollo de la EC (Howdle y Blair, 1992). Sin embargo, Sollid y Thorsby (1993), consideran que la presencia de la molécula DQ2 es suficiente para conferir la susceptibilidad, aunque como se dijo, no para la manifestación sintomatológica.

Además del posible rol en el mecanismo patogénico, los estudios sobre la asociación HLA y EC resultan de utilidad clínica. Teniendo en cuenta el alto número de pacientes asintomáticos, la determinación de HLA-DQ2 o el desarrollo de ensayos para DQA1*0501\DQB1*0201, permitirían estudiar la población de riesgo (parientes de primer grado y pacientes con enfermedades asociadas a EC). Así por ejemplo, individuos de la población de riesgo DQ2⁺, aún con biopsia normal, serían más atentamente evaluados mediante la determinación de anticuerpos anti-prolaminas y anti-endomisio, evitando, de esta manera, evitar las complicaciones asociadas a EC en pacientes no tratados (Maki y col., 1991; Sollid y Thorsby, 1993).

2.8.- Inmunología de la mucosa intestinal.

2.8.1.- Antígenos dietarios y tolerancia oral.

La respuesta a antígenos dietarios y a patógenos intestinales son importantes en la patogénesis de enfermedades gastrointestinales, en la generación de tolerancia oral, y en la protección del huésped.

Dado que la mayor fuente de ingreso de antígenos al organismo es mediante los alimentos ingeridos, los fenómenos de tolerancia oral son de vital importancia. Se observa que pequeñas cantidades (hasta 2%) de las proteínas administradas oralmente escapan a la digestión, son absorbidas, y poco tiempo después de ingeridas, pueden encontrarse en circulación como antígenos intactos. Como consecuencia de esto, frecuentemente hay una respuesta inmune local (IgA secretoria) y en ocasiones sistémica, pero en otros casos se puede suprimir la respuesta sistémica humoral y celular, generando un estado de tolerancia inmunológica (Mowat, 1987).

Los mecanismos de tolerancia oral se basan en eventos de supresión y anergia de células T, y un efecto de bloqueo y neutralización por IgA secretoria (Kagnoff, 1993). La ruptura de la tolerancia oral lleva a diferentes casos de hipersensibilidad alimentaria y pueden, en un caso particular conducir a EC (Mowat, 1987).

Jonhson y col. (1990), empleando un modelo experimental en ratones alimentados con maíz o con trigo, demostraron que puede obtenerse una tolerización oral a gliadinas, que esta tolerización depende de la dieta previa y que la respuesta humoral era diferente para las distintas fracciones de gliadinas y de maíz. Estos resultados muestran que la dieta influye en la magnitud y especificidad de la respuesta inmune humoral a las prolaminas.

Aunque la respuesta inmune localizada en intestino está mediada fundamentalmente por IgA, la expresión constitutiva en baja densidad de moléculas HLA-DR, en la membrana basolateral de enterocitos diferenciados de la vellosidad, puede tener también una participación activa en la respuesta inmune. En EC y dermatitis herpetiforme, también ha sido observada, en enterocitos inmaduros y células de las criptas, expresión de moléculas DQ y DP, pero debe considerarse que esto puede ser un fenómeno inducido por interferon- γ , debido al proceso inflamatorio (Bland, 1988; Sanderson y Walker, 1993).

Existe una transferencia de proteínas ingeridas del lumen intestinal a la circulación. Este pasaje es mediado por receptores o bien en forma inespecífica, y participan el enterocito y las células M. En el enterocito las macromoléculas ingresan por el polo apical, por endocitosis mediada por receptor (IgG materna en la lactancia, factor de crecimiento epidérmico, etc.) o por pinocitosis y salen a la membrana basolateral.

Las células M están encargadas del transporte de macromoléculas (no mediado por receptor). Estas células, intercaladas en el epitelio, no tienen microvellosidad y presentan un activo ingreso de macromoléculas por pinocitosis. En su citoplasma, la actividad lisosómica es reducida. Finalmente, las macromoléculas salen por la membrana basal, la cual está invaginada a un espacio extracelular, en el cual se albergan linfocitos y macrófagos, que pueden interactuar con las macromoléculas prácticamente intactas.

Estos mecanismos de transporte son intracelulares y requieren la adherencia de la macromolécula a la membrana, la que luego formará una vesícula interna. Las macromoléculas se adhieren más a las membranas de los enterocitos inmaduros, donde la estructura y carga de la superficie es distinta de la del enterocito

diferenciado. Las células inmaduras se encuentran durante la lactancia, en la zona de las criptas o cuando existe una alteración que aumenta la tasa de recambio de las células. Las vesículas que se fusionan con lisosomas son transportadas a la membrana basolateral donde son descargadas al espacio extracelular. En algunos casos la actividad degradativa de los lisosomas no es completa y parte de las macromoléculas puede ser liberadas al exterior celular.

Otra vía de entrada de las macromoléculas es a través de los espacios entre los enterocitos. Allí se encuentran unas estructuras denominadas desmosomas, las que sellan puntualmente las membranas de células vecinas. Si bien el tamaño de poro efectivo es muy pequeño (5 nm), en condiciones fisiológicas se ha observado el pasaje de péptidos de menos de 5 kDa. Sin embargo, condiciones que alteran la mucosa llevan al debilitamiento de estas estructuras y aumento del ingreso de macromoléculas de mayor tamaño. Procesos inflamatorios, infección, EC y alergias alimentarias, conducen al aumento de permeabilidad a través de este mecanismo.

El ingreso de macromoléculas a través del epitelio intestinal mediante estos mecanismos permiten los fenómenos de tolerancia oral, pero pueden desencadenar procesos patológicos (Sanderson y Walker, 1993).

Friis y col. (1992), empleando la instilación en intestino delgado de un digesto de tripsina-pepsina de gliadinas, demostraron que existía una incorporación de péptidos de gliadinas en el intestino. La hidrólisis parcial de las gliadinas, exógena previa o a nivel de intestino, es necesaria para la incorporación. Se observó por inmunohistoquímica, que en enfermos celíacos, los péptidos de gliadinas se encontraban dentro del enterocito y también en el espacio intercelular 20 minutos después de la instilación. En enfermos celíacos, las uniones en la zona ocludens están

alteradas y es posible que exista una mayor entrada de péptidos en el espacio lateral intercelular, efecto que es más intenso en la zona de las criptas. Estos resultados estarían de acuerdo con la permeabilidad alterada mostrada mediante los ensayos con ^{51}Cr -EDTA (Marsh, 1992).

2.8.2- Expresión de moléculas HLA clase II en epitelio intestinal.

La fuerte asociación de EC con HLA-DQ2 y la expresión de moléculas de clase II en epitelio intestinal, sugiere que los enterocitos tienen función como células presentadoras, lo cual estaría directamente relacionado con el rol patogénico de las prolaminas. En un intento por esclarecer este punto, se ha estudiado la expresión de moléculas de clase II en epitelio intestinal.

En un epitelio de intestino normal, se observa expresión de HLA-DR en enterocitos maduros de la vellosidad, pero no en células de las criptas. Fais y col. (1992), demostraron que *in vitro*, en biopsias duodenales de pacientes celíacos tratados (donde la histología y el recuento de IEL era normal), la presencia de péptidos de gliadinas alteraba la expresión de DR, encontrándose altamente expresadas en células de la vellosidad mientras que en los controles no había modificación.

Mediante citometría de flujo, Madrigal y col. (1993) observaron expresión constitutiva de moléculas HLA-DR en alta densidad y baja densidad de moléculas DQ y DP en epitelio normal. Esta metodología puede permitir estudios celulares a partir de la misma muestra de biopsia empleada para el diagnóstico. Aunque la contaminación con diferentes poblaciones celulares origina inconvenientes en la interpretación de los datos. Por eso se requiere de un cuidadoso manejo experimental y análisis de los resultados (Ebert y Roberts, 1995).

Estudios por microscopía electrónica de Mayrhofer y Spargo (1990), confirmaron que las moléculas de clase II se encuentran en la membrana basolateral del enterocito y demostraron que pueden ser co-localizadas con una actividad de fosfatasa ácida, y por lo tanto, que las moléculas de clase II están asociadas a lisosomas, evento que ocurre durante la maduración del enterocito. La presencia de lisosomas que participan en la vía de procesamiento de antígenos y la asociación a moléculas de clase II, hacen del enterocito una potencial célula presentadora.

Holm y col. (1994), estudiaron biopsias de intestino de parientes de primer grado de enfermos celíacos. Observaron en individuos asintomáticos, pero con mucosa alterada, alta expresión de moléculas de clase II, alta tasa mitótica en las criptas, acompañado por un incremento en la población IEL (en los cuales se observa aumento de la densidad de expresión del receptor de IL-2) y presencia de células T γ/δ .

En estudios *in vitro*, Ciacci y col. (1993), demostraron la expresión y funcionalidad del receptor de IL-2, en una línea de células epiteliales de rata. Estos resultados, de confirmarse para la situación *in vivo* de los enterocitos humanos, pueden establecer una relación entre las citoquinas (en especial, IL-1, IL-6, IFN- γ y TGF- β) en el sistema inmune de mucosa intestinal.

2.8.3.- Presentación de péptidos derivados de prolaminas.

En el desarrollo de una respuesta inmune se requiere que los linfocitos T reconozcan péptidos provenientes de antígenos proteicos (evento denominado, procesamiento), en forma MHC-restringida, fenómeno llamado presentación.

Es aceptado que las prolaminas son tóxicas para los enfermos celíacos. Con el fin de lograr un conocimiento más profundo, se ha trabajado con péptidos de prolaminas para determinar los epitopes relevantes en el desarrollo de la EC.

La expresión en el enterocito de moléculas de HLA clase II sugirió su actividad como célula presentadora de antígeno (APC). Estudios *in vitro* realizados por Hoyne y col. (1993), demostraron que las células epiteliales intestinales de ratón tienen capacidad, al igual que los macrófagos, de presentar péptidos en forma MHC-restringida. Sin embargo, las células epiteliales aisladas fueron incapaces de presentar antígenos proteicos, indicando una limitada capacidad de procesamiento. La capacidad de procesamiento del enterocito es menor a la de una célula presentadora de antígeno convencional, pero *in vivo* gran parte del clivaje proteolítico ocurre debido a las enzimas presentes en el lumen intestinal y en la microvellosidad, pudiéndose generar péptidos para su posterior presentación (Bland, 1988). Estos eventos de presentación de antígeno pueden conducir a una respuesta inmune local o participar en la inducción de tolerancia oral. Si bien, las células epiteliales aisladas fueron capaces de inducir la proliferación de linfocitos T péptido-MHC específicos, *in vivo* el enterocito puede conducir a fenómenos de anergia en células T por ausencia de señales co-estimuladoras (Hoyne y col., 1993).

La respuesta inmune en EC fue estudiada por ensayos de inhibición de la migración (MIF) con linfocitos de sangre periférica o células T aisladas de enfermos celíacos (Pentilla y col. 1991). Se pudo demostrar que los péptidos de gliadinas eran los más activos en este ensayo frente a células mononucleares de sangre periférica de enfermos celíacos. Se encontró que proteínas de los grupos: HMW-gluteninas y LMW-gluteninas, eran menos activas, mientras que fracciones proteicas asociadas a los gránulos de almidón, albúminas y globulinas, presentaban igual actividad que frente a la población control. Cuando se analizó la respuesta humoral, se observó que los pacientes con mayores niveles de anticuerpos anti-gliadinas presentaban menores valores en el ensayo de MIF y viceversa. El estudio de especificidad de los anticuerpos séricos por "immunoblotting" y por

ELISA de inhibición, mostró un perfil de reactividad hacia proteínas de trigo muy variable entre los pacientes. Skerritt y col. (1991), observaron respuesta inmune humoral contra proteínas de trigo, cebada y centeno, pero la respuesta celular, medida por MIF, sólo fue observada frente a gliadinas.

Gran parte del inconveniente en la investigación de los péptidos tóxicos para los enfermos celíacos surge de la dificultad de obtener preparaciones antigénicas puras para ensayos de alta especificidad. Con este fin, se obtuvieron péptidos de gliadinas por clivaje mediante un tratamiento con pepsina, tripsina y quimotripsina, los cuales fueron luego separados por HPLC (Cornell y col., 1992). Empleando dos ensayos *in vitro* (toxicidad sobre el intestino fetal de pollo y frente a lisosomas de hígado de rata) se encontraron varios péptidos tóxicos. Los péptidos correspondían a secuencias presentes en α -gliadinas: QQQP, PSQQ y a PQQPT (el cual también se encuentra en C-Hordeínas). La mayoría de los péptidos analizados presentan segmentos con estructuras " β -turn", los que demostraron tener también actividad sobre la mucosa intestinal de enfermos celíacos. Más tarde, los mismos autores (Cornell y Mothes, 1993), observaron que las secuencias PSQQ y QQQP están presentes en los péptidos activos y están involucradas en los mecanismos tóxicos (en particular sobre los enterocitos inmaduros), pero requieren secuencias flanqueantes para tener actividad.

Kagnoff (1993) ha propuesto el rol patogénico del adenovirus 12, que se encuentra comúnmente en intestino y tiene una proteína en cuya secuencia existe un dodecapéptido de alta homología con una α -gliadina. Este autor propone que EC se desencadena, en individuos genéticamente susceptibles, por esta reacción cruzada. Mantzaris y col. (1990), observaron que existían células T en sangre periférica de enfermos celíacos capaces de responder al péptido viral y a la secuencia de α -gliadina.

2.8.4.- Poblaciones de linfocitos T en la mucosa intestinal.

La mucosa intestinal está densamente poblada por células del sistema inmune, en especial linfocitos T α/β y γ/δ . Estas células han sido extensamente estudiadas en sus características fenotípicas y funcionales y más recientemente, han sido clonadas. Estos trabajos intentan demostrar a nivel celular y molecular los mecanismos que desencadenan la EC.

Se pueden diferenciar dos poblaciones celulares en la mucosa intestinal: linfocitos de la lámina propia (LPL) y linfocitos intraepiteliales (IEL)(Verkasalo y col., 1990; Trejdosiewicz, 1992; Kagnoff, 1993):

- En lámina propia, se encuentran células plasmáticas (principalmente secretoras de IgA), macrófagos y neutrófilos. Los linfocitos T, son 60-70% $CD4^+ CD45RO$, es decir mayoritariamente constituyen una población de células T helper maduras, normalmente en reposo, pero capaces de una rápida activación.

- Las células T IEL son principalmente $CD8^+$ (80-90%), muchas de las cuales expresan marcadores de activación.

Se observó que la población T más relacionada con la ingesta de gluten era la población IEL. Comparando enfermos celíacos activos e individuos control, no se encontraron diferencias entre la población de células T en lámina propia o en sangre periférica, pero sí se observó un aumento del número de IEL ($CD8^+$) en los enfermos celíacos con enteropatía activa. Luego del tratamiento (DLG), aparece un mayor número de células T en circulación, aumento justificado por una salida del epitelio intestinal, debida a la disminución de factores quimiotácticos en la mucosa (Verkasalo y col., 1990).

En ratón, los IEL están formados por dos poblaciones de aproximadamente igual número, una emplea TcR α/β y la otra TcR γ/δ . La población de T α/β^+ es claramente dependiente de la estimulación antigénica, siendo menor en los animales jóvenes o en los mantenidos libre de gérmenes. En humanos, menos del 10% de los IEL expresan TcR γ/δ , proporción similar a la encontrada en sangre periférica (1-5%)(Viney y col., 1990).

Halstensen y col. (1993), observaron por inmunohistoquímica, que en biopsias duodenales estimuladas con un digesto de pepsina-tripsina de gliadinas, se induce la expresión de CD25 en las células T de LPL, la cual era más intensa en los pacientes que en la población normal. La mayoría de estas células son $CD4^+ CD45RO CD25^+$ y no expresan HLA-DR. Aparentemente, el desafío con péptidos de gliadinas induce aumento de la población T $CD4^+$ en LPL, cuyo fenotipo está asociado a una población helper de memoria. Cuando se analizan pacientes celíacos no tratados, la población de IEL está constituida por: $CD3^+ CD8^+ TcR \alpha/\beta^+$ y $CD3^+ TcR \gamma/\delta^+$ que expresan el marcador de proliferación Ki-67. Esto indica la presencia de dos grupos de células: a- IEL $CD3^+ CD8^+ TcR \alpha/\beta^+$ y $CD3^+ TcR \gamma/\delta^+$, proliferativos, y b- células TcR $\alpha/\beta^+ CD4^+$ en lámina propia activados. Si bien la expresión de los marcadores, Ki-67 en IEL y CD25 en LPL, están aumentados en los enfermos celíacos, no guardan correlación entre sí. Esto sugiere que ambas poblaciones responden de manera diferente al desafío con gluten (Halstensen y Brandtzaeg, 1993).

Los linfocitos T γ/δ^+ se encuentran principalmente en el epitelio y no en lámina propia (Viney y col., 1990). Existen claras diferencias entre las poblaciones de T γ/δ^+ de IEL y de periferia.

Los IEL expresan frecuentemente V δ 1 y son CD5⁺CD8⁺ (10-50%) y CD45RO (90%). Las células T γ/δ ⁺ de periferia (además de las de lámina propia y Placas de Peyer), expresan mayoritariamente V δ 2, CD5⁺ y son doble negativos (CD4⁻CD8⁻) (Trejdosiewicz, 1992; Farstad y col., 1993).

Los resultados fenotípicos obtenidos por Robijn y col. (1993), muestran que las líneas T γ/δ ⁺ establecidas de mucosa yeyunal expresan CD2, CD3, CD7 y son CD4⁻, mientras que surgen resultados contradictorios respecto a la expresión de CD8. Además, expresan CD1a, mientras que CD1d está presente en la membrana basolateral de los enterocitos y puede mediar la interacción entre los enterocitos y las células T.

Halstensen y col. (1989), demostraron que la población de IEL T γ/δ ⁺ se encontraba significativamente aumentada en enfermos celíacos tratados y activos. La mayoría de estas células (70%) expresan el gen V δ 1 y parecen resultar de expansión monoclonal. Por el contrario, en los estudios de Rust y col. (1992), si bien se observa una expansión preferencial de V δ 1⁺, los resultados obtenidos a partir de clones T de biopsias duodenales no parecen indicar que exista una expansión clonal. Los clones obtenidos demostraron capacidad citotóxica *in vitro*, lo que puede asociarse a la supuesta actividad citotóxica que ejercen las T γ/δ ⁺ en el epitelio cuando se enfrentan a células bajo stress y que expresan "heat shock proteins". Esto sería de relevancia en la mucosa dañada de enfermos celíacos.

De Libero y col. (1993), confirmaron que en enfermos celíacos, la población IEL T γ/δ ⁺, está significativamente aumentada. Encontraron expresión frecuente de V δ 1, aunque también se encuentran V δ 3, V δ 4, V δ 5 y V δ 8, que pueden asociarse con V γ 9, V γ 4 u otros genes V γ . Estos resultados indican un claro fenómeno de expansión policlonal. En contraste con esta heterogeneidad, se observó oligoclonalidad en la población T α/β ⁺. Sin embargo, el uso preferencial de ciertos genes de TcR no parece

relacionarse con la susceptibilidad a EC.

Estudios de Roschman y col. (1993), demuestran que la población IEL T γ/δ ⁺ está incrementada sólo en enfermos celíacos (pudiendo llegar al 30% de los CD3⁺) y no se ha observado en otras patologías gastrointestinales. Esta población no responde a los cambios dietarios ya que, los enfermos en DLG mantienen un alto número y tampoco disminuyen cuando la mucosa adquiere la morfología normal. Es por eso que las células T γ/δ ⁺ pueden no ser auto-agresivas y su expansión puede resultar de un fenómeno inflamatorio (De Libero y col., 1993).

En este sentido, Holm y col. (1992) observaron que existe aumento en el número de células T γ/δ ⁺ en mucosa de individuos sanos que expresan HLA-DQ2, indicando que la presencia de estas células puede ser un marcador de condición celíaca latente.

A diferencia de la población IEL T γ/δ ⁺, las células IEL T α/β ⁺CD8⁺ varía con la dieta. Permanecen elevadas en la enteropatía activa con atrofia vellositaria, pero su número disminuye cuando el paciente se encuentra en remisión. En cambio, las células T CD4⁺ IEL o de lámina propia no se modifican. Estos resultados sugieren que la población IEL T CD8⁺ es particularmente sensible a la presencia de gluten y puede estar involucrado en el mecanismo de daño a la mucosa (Kutlu y col., 1993).

Por otro lado, se considera que la mucosa intestinal puede ser un sitio para la maduración extratímica de células T, siendo EC un buen modelo para analizar estos eventos.

Resultados obtenidos en modelos experimentales en ratones "nude" y en timentomizados, en los que se ha observado que las células T IEL α/β ⁺ y γ/δ ⁺ están fuertemente disminuídas y expresan CD8 $\alpha\alpha$ y son CD8 β ⁻, han permitido elaborar dos teorías: una, que los precursores migran directamente de médula ósea

al intestino donde maduran, y la otra, que un paso previo por el timo les permite alcanzar un primitivo grado de maduración, luego se dirigen al intestino donde producen reordenamiento de genes de TcR α/β y γ/δ , ya que se observó actividad de genes RAG en epitelio intestinal. Los fenómenos de maduración y expansión local de linfocitos T γ/δ^+ pueden estar relacionados con EC (Lefrancois y Puddington, 1995).

Franco y col. (1994), lograron establecer líneas T a partir de células de sangre periférica de enfermos celíacos. Por experimentos de bloqueo con anticuerpos monoclonales específicos de alelo, se identificó que los clones obtenidos eran específicos de péptidos de gliadinas y restringidos a DR7 y no a DQ2. Empleando α -gliadina, se observó que los linfocitos B de sangre periférica tenían baja eficiencia de procesamiento y presentación, comparada con fibroblastos transfectados que expresaban DR7. Pero, cuando se emplearon péptidos, ambos sistemas de presentación resultaron adecuados.

En relación a la restricción por moléculas de HLA clase II, la estimulación *in vitro* de biopsias, con péptidos de gliadinas induce la proliferación de células T CD4⁺ de la lámina propia (Halstensen y col. 1993).

Lundin y col. (1993), establecieron líneas T a partir de biopsia duodenal. Se obtuvieron mejores resultados por el empleo de mucosa en remisión, que de la proveniente de pacientes no tratados. Esto puede deberse a que en el último caso, puede existir una intensa activación no específica debida al fenómeno inflamatorio.

Dada la restricción a moléculas clase II se supuso que el origen de las líneas T establecidas corresponde a células de la lámina propia, pues allí se encuentra la población CD4⁺ y células presentadoras que expresan DQ. Los clones T

tienen, predominantemente, restricción a HLA-DQ2, aunque con una respuesta débil cuando la molécula proviene de la configuración trans, originado tal vez por una menor densidad de expresión en superficie. Todos los clones probados reconocen péptidos de trigo de distintos cultivares incluso péptidos de la región N-terminal de α -gliadina, pero ninguno reconoce péptidos de cebada, centeno o avena (Gjertsen y col., 1994a). No se encontró un uso especial de algún gen V de los TcR estudiados, y no se puede suponer que exista una expansión oligo o monoclonal.

El mismo grupo de trabajo (Gjertsen y col., 1994b), estableció líneas T de sangre periférica. Encontraron clones T que presentaban restricción a la molécula DQ2 y en menor medida también a otras moléculas: DR3, DR4, DR7, DQ8 y DP1. Esto indica que los péptidos pueden ser preferencialmente presentados por la molécula DQ2. A su vez, entre los clones obtenidos restringidos a DQ2 es posible encontrar diferencias de especificidad. Todos fueron capaces de reconocer péptidos de trigo, aunque en forma diferencial para distintos cultivares, algunos reconocen además centeno y cebada. Esto indica que diferentes péptidos de gliadinas pueden ser reconocidos, al igual que péptidos similares de otros cereales. Por lo tanto, si bien en sangre periférica se encuentran células específicas de gliadinas pero con restricción a otras moléculas diferentes de DQ2, en la mucosa intestinal ésta parece ser la principal molécula presentadora de péptidos de gliadinas. Dado que existe respuesta proliferativa en células de sangre periférica tanto de individuos DR3DQ2 positivos como negativos, la presencia de células T reactivas en sangre periférica (respuesta celular), al igual que los anticuerpos anti-gliadinas (respuesta humoral), pueden no relacionarse a EC con enteropatía activa.

2.9.- Serología y Diagnóstico de EC.

El análisis histológico de las alteraciones de la mucosa duodenal, en muestras de biopsias, es el método diagnóstico definitivo, pero constituye un test invasivo y cruento, y que no permite una evaluación periódica de los pacientes. Las pruebas de funcionalidad del epitelio como permeabilidad a D-xilosa o ⁵¹Cr-EDTA, son poco sensibles e inespecíficas.

La necesidad de evidenciar la EC, en especial en aquellos individuos de la población de riesgo, en los que existe sintomatología atípica o aún en los casos asintomáticos, además de evaluar el cumplimiento de la DLG en los pacientes en tratamiento, ha conducido al desarrollo de diferentes pruebas serológicas. Estos ensayos consisten principalmente, en ELISA para la determinación de anticuerpos anti-gliadinas (AGA) e inmunofluorescencia (IF) para anticuerpos anti-reticulina (ARA), y más recientemente, anti-endomisio (EMA) (Maki, 1992; Ferreira y col., 1992). Todos estos anticuerpos son dependientes de la ingesta de gluten y sus niveles disminuyen en los pacientes en tratamiento bajo DLG. También dependen de la edad del paciente, aunque los niveles de IgA anti-gliadinas son más estables entre diferentes grupos etarios (Kelly y col. 1987). Los niveles de EMA presentan la mejor correlación con las alteraciones observadas en la histología de la mucosa intestinal (Ferreira y col., 1992).

2.9.1.- Anticuerpos anti-gliadinas.

Lycke y col. (1989) aislaron linfocitos de epitelio intestinal de enfermos celíacos y demostraron que la secreción de anticuerpos anti-gliadinas, mayoritariamente de isotipo IgA, está significativamente elevada respecto a la población control. Ciclitira y col. (1989), aislaron linfocitos de biopsia yeyunal, los cuales fueron cultivados durante 6 días, luego midieron en el sobrenadante anticuerpos anti-gliadinas y anti-caseína. Estos

autores encontraron que, respecto a los controles, los linfocitos aislados de enfermos celíacos no tratados, presentan alta secreción de IgA, IgG e IgM anti-gliadinas e IgM anti-caseína.

En enfermos celíacos bajo DLG, la población de anticuerpos IgG séricos estudiados por RIA, empleando gliadinas aisladas, presentan reactividad contra uno o más de los grupos de gliadinas (Levenson y col. 1985). Se observó que existía mayor respuesta para α -, β - y γ - que para ω -gliadinas. En la población control, había alto número de positivos con una distribución de especificidad similar a la observada en los pacientes, existiendo un amplio solapamiento entre ambas poblaciones.

Por "immunoblotting", Friis y col. (1986 y 1988) estudiaron la especificidad de los anticuerpos IgG de enfermos celíacos no tratados y de población control. Los autores encontraron reactividad contra α - y β - y preferencialmente hacia γ -gliadinas, fracción que resultó más específica de EC. Cuando analizaron la reactividad IgG frente a prolaminas de cebada, no encontraron un patrón de reactividad diferencial entre EC y otras patologías intestinales, y observaron que la mayor parte de la población de anticuerpos presentan reactividad cruzada entre gliadinas y hordeínas.

Sjostrom y col. (1992), analizaron la especificidad de los anticuerpos séricos de enfermos celíacos y de pacientes con otras patologías gastrointestinales. Encontraron que la reactividad, en los pacientes celíacos, era específicamente dirigida hacia γ -gliadinas. La identificación de estos péptidos se logró por análisis de secuencia de fragmentos purificados por HPLC.

El análisis de los resultados de los estudios descriptos indica que la respuesta es variable y está dirigida a varios de los grupos de gliadinas. Esta variabilidad no se debe a diferencias de inmunogenicidad pues todas las gliadinas desencadenan alta respuesta cuando son inoculadas en animales de laboratorio.

La reactividad cruzada en los anticuerpos séricos de pacientes celíacos proviene de la homología de las prolaminas, lo que fue demostrado estudiando la reactividad de anticuerpos policlonales en conejo (Festenstein y col., 1987) y de AcMo (Skerritt y Underwood, 1986). Sin embargo, dada la homología de secuencia no puede descartarse que la población de anticuerpos se encuentre restringida a sólo unos pocos epitopes, los cuales están expresados en varias prolaminas.

Por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-gliadinas en la población humana normal, con un patrón de reactividad también variable, y el hecho que los anticuerpos séricos de algunos enfermos celíacos presenten un perfil similar al obtenido con suero de conejos inmunizados con gliadinas, indican que no existe una respuesta preferencial hacia algún componente de prolaminas (Devery y col., 1989).

En población control normal es posible encontrar anticuerpos séricos, principalmente IgG₄, contra proteínas dietarias: caseína, β -lactoalbúmina, gliadinas y ovalbúmina, estos no tienen rol patogénico y constituyen parte de la respuesta inmune normal (Barnes y col., 1988a,b). En pacientes celíacos, la respuesta contra gliadinas es principalmente IgG₁ y en menor medida IgG₄, mientras que la reactividad contra α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina y caseína es principalmente IgG₄ (Hvatum y col., 1992a).

Los pacientes celíacos con enteropatía activa (no tratados y en desafío) presentan IgA anti-gliadinas sérica y en fluido intestinal. Ambas poblaciones (sérica e intestinal), se comportan en forma independiente y resultan útiles en la evaluación de los enfermos celíacos y en el estudio de la adherencia a la DLG (Volta y col., 1990). También se encontró IgG (principalmente IgG₁) e IgM anti-gliadinas en suero y en fluido intestinal. La determinación de estos anticuerpos es de utilidad en aquellos pacientes celíacos con deficiencia selectiva de IgA (Engstrom y col., 1992).

En pacientes con dermatitis herpetiforme se encuentran también anticuerpos IgA en suero y en fluido intestinal, anti-gliadinas y anti- β -lactoglobulina (Hall y McKenzie, 1992).

Los test serológicos emplean diferentes mezclas antigénicas (extractos de gliadinas de distinta composición, gliadina total comercial o gliadinas pertenecientes a un sólo grupo (por ejemplo, α -gliadinas), lo cual conduce a gran variabilidad en los resultados y dificultad para comparar diferentes ensayos. Empleando como antígeno en ELISA α -gliadinas, Kelly y col. (1987), encontraron que la determinación de IgG anti-gliadinas tiene mayor capacidad de detección, pero presenta mayor número de falsos positivos. En cambio, IgA es menos sensible pero más específica. Empleando el mismo antígeno (α -gliadinas), Peticari y col. (1992), describen un método cuantitativo para la determinación de IgA e IgG anti- α -gliadinas.

En el estudio de Guandalini y col. (1989), la determinación conjunta de anticuerpos anti-gliadinas IgG e IgA en un trabajo multicéntrico, combinando la sensibilidad de la primera y la especificidad de la segunda, permitió el diagnóstico en casi el 100% de los casos, con reducido nivel de falsos positivos.

2.9.2.- Anticuerpos anti-endomisio.

En los test serológicos por inmunofluorescencia (IF), se emplearon inicialmente, cortes de tejido de rata (riñón, hígado, estómago) detectando los anticuerpos anti-reticulina. Estos reconocen una estructura fibrilar tipo colágeno en las capas de músculo liso presente en el epitelio y en la membrana basal de las criptas. Los pacientes con EC y con dermatitis herpetiforme presentan anticuerpos IgA anti-reticulina. Empleando esófago de mono se detectan anticuerpos relacionados a los anteriores denominados anti-endomisio (EMA), los que están dirigidos a la membrana basal del músculo liso.

La determinación de IgA EMA en cortes de esófago de mono, ha mostrado ser altamente selectiva para EC y dermatitis herpetiforme y no se obtienen resultados falsos positivos en la población normal ni en otras enfermedades gastrointestinales (Ferreira y col., 1992).

Empleando cortes de tejido humano y de animales (mono, ratón, conejo) se reconocen además de anticuerpos anti-endomisio otros que resultan positivos en tejido yeyunal. Estos anticuerpos y los anti-endomisio que son específicos de EC, constituyen en realidad la misma población de anticuerpos y reconocen, en el esófago de mono, componentes amorfos asociados a la *muscularis mucosae* y un material no fibrilar asociado a las fibras de colágeno y a las fibras que conectan las células de músculo liso y tejido elástico, presentes en los endomisios. En intestino, reconocen el material amorfo asociado a las fibras de colágeno y reticulina, entre las células del músculo liso y el tejido elástico en las paredes de los vasos sanguíneos (Karpari y col., 1992).

La determinación de IgA anti-endomisio, como técnica de IF, es difícil de implementar masivamente, no es automatizable y requiere el análisis por personal capacitado. Pero las dificultades de su aplicación surgen, principalmente, por su elevado costo y por la limitación de disponer de cortes de tejido, debido a cuestiones éticas que limitan el sacrificio de animales para tales fines.

2.9.3.- Detección de EC en población asintomática.

Los altos valores de prevalencia de EC, que oscilar de 1:300 a 1:1000, conducen a la necesidad de desarrollar programas masivos de "screening". En especial si se tiene en cuenta que aproximadamente el 50-60% de los enfermos celíacos adultos no presentan ningún síntoma gastrointestinal.

Considerando entonces, a la población asintomática, la manera más adecuada de llegar al diagnóstico es mediante programas de "screening" con técnicas no invasivas, específicas y sensibles (Arranz y Ferguson, 1993).

Lerner y col. (1994), compararon la aptitud de los test serológicos: IgG e IgA anti-gliadinas por ELISA y anti-reticulina (ARA) y EMA por IF. Los resultados mostrados en la **Tabla I**, indican que el mejor test por su especificidad y sensibilidad es la determinación de IgA anti-endomisio, aunque, teniendo en cuenta que el 3% de los enfermos celíacos presentan deficiencia selectiva de IgA, se destaca la utilidad de la determinación de IgG anti-gliadinas.

Los anticuerpos IgA anti-gliadinas han sido extensamente empleados aunque la performance de estos ensayos es muy variable. (Kelly y col. 1987; Ferreira y col. 1992).

Tabla I. Comparación de los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en los estudios serológicos de EC.

	Sensibilidad				Especificidad				VPP			VPN		
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	a	b	c
IgG AGA	88	76			92	88			88	46		92	97	
IgA AGA	52	91	86	91	94	85	87	89	87	45	45	74	99	98
IgA ARA	65	91			100	99			100	91		77	99	
IgA EMA	97	100		98	98	99		100	97	91		98	100	

Parámetros de los test serológicos para anticuerpos: anti-gliadinas (AGA), anti-reticulina (ARA) y anti-endomisio (EMA), según los resultados obtenidos por: a- Lerner y col. (1994), b- Ferreira y col. (1992), c- Arranz y Ferguson (1993) y d- Corrao y col. (1994).

Arnason y col. (1992), encontraron que, en una población sana, el 2,3% de los individuos eran positivos en la determinación de IgG e IgA anti-gliadinas. El análisis de la biopsia indicó que el 0,37% tenía alteraciones en la mucosa compatibles con EC, ninguno tenía rasgos clínicos que sugirieran EC, pero al comenzar la DLG, la mayoría de ellos presentaron remisión en la mucosa duodenal.

La determinación de anticuerpos anti-gliadinas constituye un método adecuado para la evaluación de la población normal y en especial, de la población de riesgo. Corraza y col. (1992), analizaron los parientes de primer grado de enfermos celíacos, mediante la determinación de anticuerpos anti-gliadinas. Se estudiaron 328 individuos de los cuales 21 presentaron anticuerpos anti-gliadinas positivos. Estos fueron analizados por biopsia y se encontró que 13 tenían alteraciones en la mucosa compatibles con EC. A pesar de no haber pacientes sintomáticos en este estudio, la aceptación de participar en el estudio o de someterse a las biopsias es, en general, sumamente subjetiva y oculta una sospecha de la enfermedad. Por lo tanto, si bien es inapropiado obtener datos de prevalencia en estos estudios, los resultados ponen de manifiesto, una vez más, el alto número de pacientes con EC latente.

Se encontró que era más frecuente la positividad en AGA en el grupo de parientes de primer grado de enfermos celíacos, que en la población control. Es por eso, que probablemente los pacientes AGA positivos sin alteraciones en la mucosa no representen falsos positivos del método, si no que muestran una particular respuesta inmune hacia las gliadinas y puede estar asociado con una forma latente de EC, siendo un marcador precoz, antes de las manifestaciones morfológicas (Corraza y col., 1992).

Arranz y Ferguson (1993), encontraron que una combinación de los parámetros: IgM anti-gliadinas en fluido intestinal, IgA anti-gliadinas e IgM anti-ovalbúmina o IgM anti- β -lactoglobulina séricas, eran altamente sensibles y específicas de EC. Este patrón de anticuerpos positivo junto a un alto recuento de IEL en pacientes asintomáticos es indicativo de EC latente. Estos autores proponen la determinación de estos anticuerpos para la detección de EC asintomática. Sin embargo, Marsh (1993), considera que la determinación de este patrón de anticuerpos no es mejor que un simple test de IgA anti-gliadinas, además, muy pocos laboratorios están preparados para tales determinaciones. A su vez, no se sabe cual es la variación que los anticuerpos de fluido intestinal puedan sufrir con situaciones ajenas a EC. Este

autor propone proseguir con los programas de "screening" basados en IgA anti-gliadinas, IgA anti-endomisio e incluir como parámetro a determinar el recuento de IEL CD3⁺ en lamina propia de mucosa rectal, posteriormente al desafío con gluten.

La determinación de IgA anti-gliadinas resulta un test con bajo valor de predictibilidad en poblaciones donde la prevalencia de la enfermedad es baja. Es sabido que los valores de predictibilidad dependen de la prevalencia en la población del factor a determinar y de los valores de corte elegidos en el ensayo (Tijssen, 1985).

En este sentido, Corrao y col. (1994), han evaluado la eficacia de la determinación de IgG e IgA anti-gliadinas e IgA EMA, comparando con el diagnóstico por biopsia duodenal. Para lo cual, analizaron tres poblaciones con distintos grados de prevalencia de EC: 47% (pacientes con sospecha clínica de EC), 5% (parientes de enfermos celíacos) y 0,2% (población general). Los mejores resultados se obtienen con IgA EMA.

Aunque las técnicas de IF son simples, dependen del entrenamiento y la subjetividad del analista, de la confiabilidad de los reactivos y la calidad de los cortes histológicos. Su costo es más alto que la detección de anticuerpos anti-gliadinas por ELISA, y es más difícil de aplicar en programas con alto número de muestras. Por estas razones, Corrao y col. (1994) proponen un programa de "screening" en dos pasos, donde primero se analiza la población mediante IgA anti-gliadinas y los que resultan positivos son luego analizados por IF para IgA anti-endomisio.

Dependiendo de las prevalencias (47%, 5%, 0.2%) y de los valores de corte establecidos en cada caso, Corrao y col. (1994) observaron que se pueden evitar biopsias negativas en 29%, 63% y 87%, de los casos, obteniendo falsos negativos en el 3%, 6% y 11% de los casos, respectivamente. Este esquema de trabajo presenta un alto nivel de confiabilidad, permite reducir el número de pacientes a quienes se les realizaron biopsias innecesarias y presenta escasos falsos negativos.

3.- Proteínas nocivas a los enfermos celíacos.

3.1.- Clasificación, características estructurales y fisicoquímicas.

Los cereales son una de las más importantes fuentes de proteínas para la nutrición humana. En especial, las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de trigo, con su capacidad de retención de gas y formación de masa, han hecho que este cereal sea masivamente empleado. Sin embargo, las proteínas de estos vegetales, deben ser excluidas de la alimentación en los enfermos celíacos bajo DLG.

Trigo (*Triticum aestivum* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y centeno (*Secale cereale* L.), son miembros evolutivamente relacionados. Estos pertenecen a la tribu Triticeae y presentan grupos de proteínas con alta homología y por lo tanto, ciertas propiedades fisicoquímicas en común, al igual que triticale, que es un híbrido entre trigo y centeno. Avena en cambio, si bien está relacionada evolutivamente presenta algunas características diferentes (Kreis y col., 1985; Shewry y Tatham, 1990).

Las proteínas del endosperma del grano de trigo constituyen una mezcla compleja. Han sido inicialmente clasificadas de acuerdo a su solubilidad en tres fracciones: solubles en soluciones salinas, *albúminas-globulinas*; solubles en solventes alcohólicos (etanol 70%, por ejemplo): *gliadinas* y sólo solubles en condiciones más enérgicas (ácidos, bases, agentes reductores y detergentes, urea, etc.): *gluteninas*.

Gliadinas y gluteninas, así como sus homólogos en cebada y centeno, se denominan prolaminas. Esta designación surge por su alto contenido de los aminoácidos prolina y glutamina, los cuales junto a fenilalanina, pueden alcanzar el 60 al 80% de la composición aminoacídica (Shewry y col., 1986).

Las prolaminas son sintetizadas y depositadas en el endosperma del grano, donde constituyen la fuente primaria de nitrógeno para la posterior síntesis de proteínas durante la germinación. Gliadinas y gluteninas, como proteínas de almacenamiento, constituyen casi la mitad del contenido proteico en el grano de trigo maduro y se encuentran en partes aproximadamente iguales (Shewry y Tatham, 1990).

Las gliadinas han sido clasificadas por su movilidad electroforética decreciente a pH = 3 (A-PAGE) en α -, β -, γ - y ω -gliadinas (Bushuk y Zillman, 1978). De manera similar, ocurre para los grupos homólogos en cebada y centeno.

Se han adoptado diferentes criterios para clasificar las prolaminas, pero si se tiene en cuenta su composición y secuencia aminoacídica, se pueden agrupar de la manera indicada en la **Tabla II**, según datos obtenidos de: Kreis y col., 1985; Shewry y col., 1986; Festenstein y col. 1987; Shewry y Tatham, 1990.

No se conoce que las prolaminas tengan una función diferente a la de almacenamiento. Presentan como característica distintiva, extensas regiones de secuencias repetitivas, que se han formado por eventos de inserción y duplicación, determinando un gran polimorfismo (Shewry y

Tatham, 1990). Las regiones repetitivas están formadas por unidades que presentan diferencias en longitud (4 a 9 aminoácidos) y en secuencia, pero incluyen siempre una o más prolina y glutaminas.

Los datos de secuencia de una α -gliadina han permitido conocer la estructura global, indicando que existen dominios propios a cada grupo que son conservados, secuencias típicas en el extremo N-terminal y regiones repetitivas (Kasarda y col., 1984). Estas características se encuentran en los componentes homólogos de los tres cereales (Shewry y col., 1986).

En ω -gliadinas, a excepción de los extremos N- y C-terminal, se encuentran secuencias repetitivas que abarcan casi toda la molécula (80%). Principalmente se encuentran secuencias consenso de dos tipos: PQQPY y PQQFPQQ. En el caso de HMW-gluteninas y las prolaminas ricas en azufre se encuentran secuencias consenso con ligeras variantes (Shewry y col., 1986).

En términos generales, la estructura secundaria de las prolaminas presenta regiones α -hélice en los extremos N- y C-terminal y en algunas secuencias intercalares. En las regiones repetitivas adoptan una estructura denominada " β -turn".

Tabla II. Clasificación de las prolaminas de trigo, cebada y centeno.

	Prolaminas				
	gliadinas (monómeros)			gluteninas (agregados)	
trigo	ω -gliadinas	α,β -gliadinas	γ -gliadinas	LMW-glu	HMW-glu
	pobres en S	ricas en S			
cebada	C- hordeínas	-	γ -hordeínas	B-hordeínas	D-hordeínas
centeno	ω -secalinas	-	γ -secalinas	LMW-secal.	HMW-secal.

La estructura " β -turn" fue también analizada trabajando con péptidos sintéticos con las secuencias presentes en las regiones repetitivas. La unidad de una estructura " β -turn" se compone de cuatro residuos, los enlaces por puente de hidrógeno ocurren entre el primer grupo carbonilo y el grupo amido del cuarto residuo (a diferencia, en la α -hélice, la unidad es de cinco residuos). Esta estructura se encuentra con cierta frecuencia en proteínas globulares, siendo la principal conformación adoptada por las secuencias repetitivas en las prolaminas (Tatham y col., 1985).

La regularidad de las secuencias repetitivas y de la estructura " β -turn" determinan la formación de una estructura cilíndrica con 13 residuos por vuelta denominada " β -spiral". La estructura " β -turn" es predominante en ω -gliadinas excepto en una pequeña región N- y C-terminal. También se encuentra en HMW-gluteninas y en menor medida en γ -gliadinas. En estos casos, la estructura " β -turn" está regularmente distribuida. En cambio, en α - y β -gliadinas, la estructura " β -turn" está restringida a pocos dominios cercanos al extremo N-terminal, los que son más irregulares y pueden presentar secuencias intercalares con formación de α -hélice, lo que dificulta la formación de " β -spiral" (Tatham y col., 1985).

Los primeros datos de secuencia completos de una α -gliadina obtenidos por Kasarda y col. (1984), permitieron observar su estructura en dominios, de secuencias únicas o de secuencias repetitivas. Comparando datos de secuencias de las regiones N-terminal de ω -gliadinas y ω -secalinas, se encontró alta homología entre ambas y que las secuencias repetitivas son predominantes en sus estructuras (Kasarda y col., 1983). De igual modo, analizando las secuencias N-terminal se demostró la relación entre HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas (Shewry y col., 1988). Cuando se obtuvieron datos de secuencias de aveninas, se observó que si bien existen

secuencias consenso de unidades repetitivas, estas difieren de las de prolaminas de trigo, cebada y centeno (Wieser y Belitz, 1989; Egorov, 1988).

Las gliadinas comprenden estructuras monoméricas cuyas Mr. varían entre 30 y 70 kDa, mientras que las gluteninas son complejos de mayor tamaño estabilizados por puentes disulfuro, sus unidades reducidas tienen una Mr. de 70-110 kDa. Las prolaminas pobres en azufre (ω -gliadinas y sus homólogas en cebada y centeno), presentan un Mr. por SDS-PAGE que oscila entre 50 y 70 kDa (Shewry y col., 1986).

A las prolaminas ricas en azufre, se las divide en tres grupos de acuerdo a sus tipos de secuencia N-terminal: $\alpha\beta$ -gliadinas, γ -gliadinas y LMW-gluteninas. Las $\alpha\beta$ - y γ -gliadinas, contienen cisteína formando puentes disulfuro intracatenarios. Sus Mr. oscilan entre 30-45 kDa. Es de destacar que no se encuentran proteínas homólogas a $\alpha\beta$ -gliadinas en cebada y centeno (Shewry y Tatham, 1990). Las LMW-gluteninas presentan alta homología con B-hordeínas (Colot y col., 1989).

Las prolaminas presentan estructuras compactas. En conjunto, exhiben alta estabilidad ante el tratamiento térmico, siendo más resistentes las ω -gliadinas. A temperaturas superiores a los 75 °C, las reacciones de intercambio de grupos sulfhidrilos y puentes disulfuro son las que más afectan la estructura nativa (Schofield y col., 1983).

Existen importantes diferencias entre las Mr. de las prolaminas determinadas por electroforesis (SDS-PAGE) y los datos de secuencia. Esto se debe a la anormalmente baja movilidad que presentan estas proteínas debido a la rígida estructura secundaria. La estructura " β -turn" se mantiene aún en condiciones desnaturalizantes suaves (Andrews y Skerritt, 1994). En presencia de urea 4 M, la Mr. estimada por SDS-PAGE se aproxima al peso molecular determinado por otros métodos (Goldsbrough y col., 1989).

3.2.- Extracción y separación de prolaminas.

Los procesos extractivos de las prolaminas conducen en general, a la obtención de mezclas complejas. No son selectivos y por lo tanto, otras proteínas acompañan a las de interés. Sumado a esto, diferentes autores han empleado distintas condiciones de extracción, por ejemplo, fueron usadas diferentes mezclas extractantes: etanol 70%, etanol 40%, 2-propanol 55%, ácido acético 0,01 M, urea 1 M (Skerritt y Hill, 1990a). Esto conduce a una gran variabilidad en la composición de los extractos obtenidos y en algunos casos, a la dificultad en la comparación de los resultados.

Las gliadinas constituyen un grupo de proteínas con alta homología y por lo tanto, propiedades fisicoquímicas y bioquímicas muy semejantes, lo que, asociado a su tendencia a formar agregados, dificulta los procesos de separación y purificación. Se han empleado métodos cromatográficos convencionales como, filtración en gel seguida de intercambio iónico en resinas de sulfoetilcelulosa (Huebner y Rothfus, 1968), carboximetilcelulosa (Patey y Evans, 1973) o sulfopropil-Sephadex (Charbonnier y Mosse, 1980).

Sin embargo, el método analítico por excelencia es la cromatografía en fase reversa por HPLC (RP-HPLC) (Bietz, 1985), aunque sólo pueden purificarse bajas cantidades de proteínas. Más recientemente se han empleado equipos de cromatografía líquida (FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography), los que si bien emplean presiones menores a las de HPLC, permiten obtener mayor capacidad de trabajo, con alta resolución y en tiempos más cortos que la cromatografía convencional. En estos sistemas se han empleado intercambiadores aniónicos (Mono-Q) (Batey, 1984) o catiónicos (Mono-S) (Larré y col., 1991). En estos casos se obtienen fracciones mezclas enriquecidas en algún componente, pero rara vez puede disponerse de componentes puros con un sólo paso separativo.

3.3.- Análisis inmunoquímico de prolaminas.

Estudios inmunoquímicos empleando anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales (AcMo) han permitido obtener información adicional sobre las prolaminas. Sin embargo, este tipo de análisis presenta inconvenientes debido a su baja solubilidad en soluciones acuosas, la dificultad de disponer de componentes altamente purificados, y su alta homología, la que determina una intensa reactividad compartida, aún de estructuras que no teniendo secuencia exactamente iguales, presentan semejanza conformacional, como sucede en las regiones repetitivas.

Estudios iniciales de especificidad de antiseros anti-prolaminas fueron realizados por inmunoprecipitación en geles de agar, aunque escasa información puede ser obtenida por esta metodología, en un sistema proteico como el de las prolaminas (Skerritt, 1988).

Ciclitira y col. (1985), prepararon antiseros por inmunización de conejos con fracciones purificadas de α -, β -, γ - y ω -gliadinas. Por ensayos inmunoradiométricos, se observó alta reactividad cruzada entre α -, β - y γ -gliadinas y proteínas de cebada y centeno. Menor reactividad compartida presentaron las ω -gliadinas y no detectaron reconocimiento de proteínas de avena y maíz.

El análisis con antiseros obtenidos por inmunización con α -, β - y γ -gliadinas, B-hordeínas y C-hordeínas, permitió observar que las secuencias repetitivas son inmunogénicas y en particular, que las regiones constituidas por estructuras " β -turn" forman epítopes conformacionales, que determinan gran parte de la reactividad cruzada (Festenstein y col., 1987).

Skerritt y col. (1984), produjeron AcMo anti-prolaminas y analizaron su especificidad por "immunoblotting" de extractos de proteínas separadas por SDS-PAGE. Observaron reactividad

cruzada entre las prolaminas de trigo, cebada y centeno, que se correspondía con los datos estructurales. Posteriormente, Skerritt y Underwood (1986), obtuvieron AcMo anti-prolaminas, principalmente de isotipos IgM e IgG₁. Cada uno de estos AcMo presentaba, aunque variable, un perfil amplio de reconocimiento. Sin embargo, en algunos casos se observó, un claro efecto de la concentración del AcMo ya que, haciendo diluciones, la reactividad se concentraba sólo en unos pocos componentes. Este efecto se debe a que altas concentraciones del AcMo permiten detectar uniones de baja afinidad con otros componentes.

También se obtuvieron AcMo empleando como inmunógeno un digesto de pepsina-tripsina de gliadinas (Ellis y col., 1989). Estos AcMo reconocen las prolaminas tóxicas y no presentan reactividad con proteínas de maíz y arroz.

Combinando los resultados obtenidos por "immunoblotting" y ELISA, Skerritt y Lew (1990), caracterizaron un grupo de AcMo anti-prolaminas. Algunos AcMo reconocían γ - y ω -gliadinas, o HMW-gluteninas y sus correspondientes homólogos en cebada y centeno. Otros en cambio, reconocían α - y β -gliadinas. Si bien en general, escasa reactividad fue encontrada con proteínas no relacionadas como proteínas de avena, maíz y arroz, se observó que algunos AcMo eran capaces de reconocer con alta afinidad α -/ β -gliadinas y proteínas de maíz. Estos resultados deben ser tenidos en cuenta pues las proteínas de maíz no tienen relación con la patogénesis de EC. Al igual que los resultados de Festenstein y col. (1987), quienes trabajaron con antisueros, también se observaron anticuerpos heteroclíticos, anticuerpos que se caracterizan por presentar mayor reactividad frente a un componente diferente al empleado como inmunógeno.

Brett y col. (1990), obtuvieron AcMo capaces de reconocer ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas. Los estudios de especificidad por

ELISA empleando fracciones purificadas y péptidos de síntesis, determinaron que los AcMo reconocían con alta afinidad el péptido PQQPFPQQ, presente en las unidades repetitivas de C-hordeínas. En el análisis por "immunoblotting" de proteínas separadas por SDS-PAGE, se obtuvo débil reactividad hacia ω -gliadinas, sugiriendo la pérdida de los epitopes conformacionales detectados por el AcMo.

Parte de los resultados descriptos previamente destacan la influencia del formato del ensayo en el estudio de la reactividad de los AcMo anti-prolaminas. Se encontraron importantes diferencias entre "dot-blot" y ELISA indirecto (en ambos casos prolaminas inmovilizadas en fase sólida por adsorción) y ELISA competitivo o de captura (prolaminas en fase líquida). Estas variaciones deben tenerse en cuenta al determinar la especificidad de los AcMo (Skerritt y Hill, 1990a).

La baja solubilidad de las prolaminas dificulta enormemente el desarrollo de inmunoensayos. Se han empleado diferentes solventes en el ensayo pero sólo condiciones energéticas (detergentes, urea, alcoholes) pueden asegurar una solubilización completa. Sin embargo, estas condiciones interfieren con la interacción antígeno-anticuerpo. En general, las técnicas de "dot-blot" o "immunoblotting" a partir de geles no desnaturizantes, resultan menos afectadas que los ensayos por ELISA competitivo donde se requiere que las prolaminas se encuentren en fase líquida (Skerritt y Martinuzzi, 1986).

La extensa homología entre gliadinas y gluteninas, conduce a una fuerte reactividad cruzada, observada con anticuerpos policlonales y monoclonales. Denery y col. (1994) obtuvieron antisueros en conejos inmunizados con péptidos conjugados de las regiones N- y C-terminal de α -/ β -gliadinas y γ -gliadinas y N-terminal de ω -

gliadinas y LMW-gluteninas. El análisis por "immunoblotting" y por ELISA indirecto, mostró que los antisueros obtenidos contra los péptidos N-terminal, siempre resultaron altamente específicos y no presentaron reacción cruzada con otras proteínas diferentes al inmunógeno. Este método de obtención de anticuerpos altamente específico puede resultar de utilidad en el estudio de las prolaminas.

Si bien, en la mayoría de los casos el perfil de reconocimiento en un "immunoblotting" muestra una interacción con un gran número de componentes, en ocasiones es posible encontrar AcMo de reconocimiento restringido. Dawood y col. (1989), obtuvieron un AcMo que reconoce únicamente una banda de γ -gliadinas. Un panel de AcMo, incluyendo aquellos de reconocimiento amplio y restringido, puede ser de utilidad en la diferenciación de cultivares de trigo. Por otro lado, se han empleado técnicas inmunoquímicas en inmunolocalización de proteínas en tejidos (cortes de granos) (Krishnan y col. 1990), en biología molecular, para la detección de cADN de prolaminas clonado y expresado en *E. coli* (Donovan y col. 1989) y en la detección de prolaminas durante procesos separativos por HPLC (Freedman y col. 1988).

Andrews y Skerritt, (1994), analizaron la reactividad de un panel de AcMo contra dos péptidos de síntesis (un hexámero y un nonámero) que pertenecen a la región repetitiva de HMW-gluteninas y que forman una estructura " β -turn". El empleo de un gran número de péptidos solapados o con ligeros cambios permitió identificar epitopes lineales y los residuos claves en el reconocimiento. Una vez determinado el epitope pueden conocerse, por los datos de secuencia, las posiciones que estos ocupan en la molécula. En las moléculas de HMW-gluteninas, los AcMo reconocen, en una estructura regularmente espaciada, residuos que están orientados hacia la misma superficie del " β -spiral"

(epitopes conformacionales). Con este estudio, por métodos inmunoquímicos, se pudo relacionar la capacidad de formación de masa debida a HMW-gluteninas, con la presencia de ciertos epitopes presentes en la estructura " β -turn".

3.4.- Cuantificación inmunoquímica de gliadinas.

Los enfermos celíacos requieren una estricta dieta libre de gluten, la cual sólo es posible, si los alimentos de origen comercial son correctamente evaluados en cuanto al contenido de prolaminas. Dado que la ingesta de muy bajas cantidades de prolaminas desencadena los síntomas (Froncone y Auricchio, 1991), la Organización Mundial de la Salud ha establecido que, para declarar a un alimento apto para el consumo por enfermos celíacos, el contenido en prolaminas debe ser inferior a 1 mg/100 g de producto seco (Codex Alimentarius). Esto exige que las técnicas cuantitativas a emplear posean alta detectabilidad.

Las técnicas inmunoquímicas han sido ampliamente usadas en el desarrollo de métodos de cuantificación de prolaminas en alimentos destinados a consumo por enfermos celíacos.

Inicialmente se empleó la inmunoprecipitación en gel de agar. Esta técnica presenta baja sensibilidad (límite de detección aproximado: 50 μ g/ml) y es poco útil en un sistema proteico tan complejo como el de las prolaminas. Además, la baja solubilidad en esas condiciones genera artefactos en el análisis de los resultados que conducen a errores de interpretación (Skerritt, 1988). Por lo tanto, estas características hacen que esta técnica sea inadecuada en ensayos cuantitativos. Lamentablemente, en nuestro país es, en la actualidad, la técnica de cuantificación oficial de los organismos sanitarios nacionales y provinciales.

Entre las técnicas de mayor detectabilidad, se emplearon los inmunoradiométodos (RIA)(Ciclitira y col. 1983, 1985). Esta metodología fue rápidamente reemplazada por los enzimoimmunoensayos (Howdle y Losowsky, 1990). Sin embargo, cualquiera sea el formato de ensayo deben contemplarse una serie de factores que afectan la exactitud y confiabilidad del resultado:

a- el ensayo debe ser específico. Los anticuerpos empleados poli- o monoclonales deben reconocer las prolaminas tóxicas a los enfermos celíacos y no debe presentar reacción cruzada con otras proteínas vegetales que pueden formar parte de los alimentos.

b- el ensayo debe ser capaz de reconocer las prolaminas en alimentos que durante su fabricación son sometidos a tratamientos térmicos.

c- el método debe presentar un alto nivel de detección.

Ademas, distintos autores han empleado diferentes condiciones de extracción, conduciendo a extractos de composición variable y por lo tanto, diferencias en los resultados cuantitativos, en especial cuando se emplean AcMo. Por otro lado, distintas preparaciones de antígeno han sido usadas para la construcción de las curvas de calibración. En este sentido, la preparación de la solución estándar es un factor importante de error, ya que por su escasa solubilidad es difícil certificar la concentración real de la solución patrón de gliadinas.

Se han optimizado varios protocolos empleando técnicas inmunoenzimáticas. Skerritt y col. (1985a,b), inmovilizaron gliadinas provenientes de los extractos muestra, al igual que el antígeno estándar, en discos de nitrocelulosa. Luego emplearon un AcMo y revelaron con una reacción enzimática que da un producto soluble. Si bien este ensayo no presentó un buen nivel de detección permitió evaluar la pérdida de reactividad por el tratamiento térmico.

Troncone y col. (1986), desarrollaron un ELISA de captura con anticuerpos policlonales. Este ensayo tiene un alto nivel de detección pero presenta reactividad cruzada con proteínas de arroz y maíz. En cambio, Freedman y col. (1987), emplearon un ELISA de captura con IgG policlonal anti-gliadina y como segundo anticuerpo, un AcMo anti-gliadina. Este ELISA tiene un nivel de detección de 15 ng/ml, detecta las prolaminas tóxicas, y no presenta reactividad con otras proteínas.

Friis (1988), desarrolló un ELISA competitivo con anticuerpos policlonales el cual presenta un rango de trabajo de 10 a 250 ng gliadina/ml, sin embargo, no resulta útil en alimentos procesados. Empleando un protocolo similar, Molina y col. (1991), optimizaron un ensayo que, si bien es específico de las prolaminas tóxicas posee muy baja capacidad de detección (50% de inhibición = 8.5 µg/ml).

Skerritt y Hill (1990b), optimizaron un ELISA sandwich empleando un AcMo anti- ω -gliadinas, el cual permite evaluar productos procesados, pero tiene un límite de detección de 160 ng/ml (16 mg/100 g de alimento). Este ensayo ha sido adoptado por la Association Official Analytical Chemist (AOAC) como método oficial de cuantificación de gliadinas en alimentos (Skerritt y Hill, 1991). El mismo AcMo fue empleado en un ELISA competitivo obteniendo menor capacidad de detección (Hill y Skerritt, 1990). Más recientemente, Ellis y col. (1994) desarrollaron un ELISA sandwich empleando un AcMo anti- α -gliadinas, el que presenta un límite de detección 15 ng gliadina/ml.

De la descripción de los resultados obtenidos, con distintos métodos publicados, es evidente que resulta difícil lograr un método que cumpla con los requerimientos mencionados, en cuanto a especificidad, exactitud y detectabilidad.

Objetivos

En nuestro medio, la carencia de métodos adecuados para la determinación de prolaminas en alimentos constituye uno de los graves inconvenientes asociados a la enfermedad celíaca.

El método oficial actualmente empleado, para la determinación de gliadinas en alimentos, es la inmunoprecipitación en gel. Esta es una técnica de baja sensibilidad, característica que sumada a la escasa solubilidad de las prolaminas, impide la correcta evaluación del contenido de gliadinas en la muestra.

En nuestro país no existe reglamentación oficial que exija la determinación del contenido de prolaminas en los alimentos, ni el rotulado de los mismos. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud sugiere que un alimento exento de gluten debe contener menos de 1 mg de dichas proteínas por cada 100 g de producto seco. Por lo tanto, si bien algunos productos comerciales nacionales, llevan en su etiqueta la denominación "Sin TACC", en realidad, este hecho es sólo una declaración de buena fe del fabricante y no una certificación del contenido real de prolaminas del producto.

Otro problema de relevancia lo constituye el diagnóstico de la enfermedad. El mismo requiere del estudio de biopsias duodenales, procedimiento invasivo y traumático, en especial para los niños.

Debe tenerse presente que la enfermedad celíaca es de alta incidencia poblacional, con un valor estimado de 1:1000 en los casos con sintomatología. Sin embargo, la incidencia real puede alcanzar valores cercanos a 1:300 al incluir los pacientes asintomáticos.

La alta proporción de estos pacientes demanda la implementación de pruebas de "screening" masivas. Para tal fin, la determinación de anticuerpos anti-gliadinas podría ser de utilidad. Sin embargo, la dificultad de estandarización de los inmunoensayos conduce a resultados discordantes respecto a las características de estos test.

En relación a lo expuesto, los objetivos generales de este trabajo consisten en la optimización de inmunoensayos de alto nivel de detección y especificidad, para la determinación de prolaminas en alimentos y el desarrollo de un ensayo serológico de utilidad para la evaluación de enfermos celíacos.

Para el logro de los objetivos indicados, se propone:

- 1.- Estudiar las propiedades fisicoquímicas de las prolaminas de trigo, cebada y centeno, en relación a su extracción, separación y análisis cuantitativo.
- 2.- Desarrollar métodos cromatográficos de purificación de prolaminas.
- 3.- Desarrollar un inmunoensayo cuantitativo con anticuerpos policlonales anti-gliadinas para la determinación de proteínas nocivas en alimentos destinados al consumo por enfermos celíacos.
- 4.- Producir y caracterizar anticuerpos monoclonales anti-prolaminas.
- 5.- Optimizar inmunoensayos cuantitativos con anticuerpos monoclonales.
- 6.- Aplicar las prolaminas purificadas al análisis de la reactividad de los anticuerpos séricos de enfermos celíacos.
- 7.- Desarrollar un inmunoensayo como prueba serológica para la evaluación de pacientes celíacos.

Materiales y Métodos

1.- Preparación de fracciones proteicas de distintos vegetales.

Las muestras de trigo, cebada, centeno y avena, fueron cedidas por la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía de la UNLP. Se analizaron las variedades:

Trigo, *Triticum aestivum* L., fueron estudiados los cultivares: INTA La Paz, Staparka, Buck Bagual, Buck Pucara, INTA Marcos Juarez, Buck Fogón, Buck Catriel, ProINTA Pigue, ProINTA Oasis, Valverde, Buck ñandú, Buck Patacón.

Cebada, *Hordeum vulgare* L.: Línea 371.

Centeno, *Secale cereale* L.: Insave FH.

Avena, *Avena sativa* L.: cv. Buck. 152.

Además se trabajó con muestras de triticale, soja, maíz y arroz.

Se obtuvo harina de cada una de las muestras mencionadas, por molienda en un equipo Cyclone Sample Mill (Udy Analyzer Co).

1.1.- Obtención de la fracción proteínas totales.

Proteínas correspondientes a las fracciones albúminas, globulinas y de almacenamiento, fueron extraídas de las harinas de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz, con buffer muestra de electroforesis desnaturizante (BM)(Tris-HCl 0,125 M pH=6,8, conteniendo SDS 1% (p/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v)), en relación extractante/ harina 10:1 (v/p). La extracción fue realizada durante 2 h a temperatura ambiente con agitación periódica. La fracción *proteínas totales* fue obtenida como el sobrenadante de la centrifugación a 10.000 x g a 8 °C durante 15 min.

1.2.- Obtención de la fracción prolaminas.

De la harina de cada uno de los vegetales mencionados en 1.1, se eliminó la *fracción albúminas-globulinas* con solución de NaCl 0,15 M (en relación 10 ml/g), en cuatro pasos de extracción: tres de 1 h a temperatura ambiente y

uno 16 h a 4°C. Después de cada incubación se centrifugó a 10.000 x g a 8 °C durante 15 min. El residuo final fue extraído con etanol 70% (10 ml/g) durante 2 h a temperatura ambiente. La *fracción prolaminas* consistió en el sobrenadante de la centrifugación a 10.000 x g a 8 °C durante 15 min.

Además, empleando el mismo protocolo, se obtuvieron gliadinas de harina de trigo (cv. La Paz INTA), por extracción con distintos solventes: etanol 40%, 1-propanol 50%, 2-propanol 70%, 2-propanol 50%, urea 1 M y ácido acético 0,01 M.

1.3.- Obtención de la fracción enriquecida en ω -gliadinas.

De la harina de trigo (cv. La Paz INTA) se eliminó la *fracción albúminas-globulinas* por extracción con NaCl 0,15 M como en el paso anterior. Después de la centrifugación, el residuo fue extraído con 2-propanol 70% (10 ml/g), en cuatro pasos al igual que para eliminar la *fracción albúminas-globulinas* (1.2). El residuo de la centrifugación fue extraído con urea 1 M durante 2 h con agitación periódica. La *fracción enriquecida en ω -gliadinas* se obtuvo como el sobrenadante de la centrifugación a 10.000 x g a 8 °C durante 15 min.

2.- Técnicas electroforéticas.

2.1.- Electroforesis en geles de poli(acrilamida) en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Se empleó la técnica de separación en sistema discontinuo descrita por Laemmli (1970). Se prepararon geles de separación en gradiente de concentración de acrilamida (10-15% T, 2,6% C), donde T es la cantidad total en peso de acrilamida y bis-acrilamida por 100 ml de solución y C es el porcentaje de bis-acrilamida relativo a la concentración total. En otros casos se prepararon geles homogéneos de 10% o 12,5% de acrilamida. En todos los casos se empleó un gel

de stacking de 3% de acrilamida. Para las electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras, las muestras fueron disueltas en BM calentadas en baño de agua a 100 °C durante 3 min.

Para el análisis de AcMo, las muestras fueron analizadas en condiciones reductoras y no reductoras empleando como buffer muestra, BM con o sin 2-mercaptoetanol, respectivamente.

Las electroforesis fueron realizadas en placa empleando un equipo Hoeffer, con geles de 140x160x0,75 mm durante aproximadamente 5 h a 20-25 mA/placa, o bien en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) con geles de 60x90x0,75 mm, a 120 V durante el stacking y 200 V durante la separación.

2.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH=3.1 (A-PAGE).

Las corridas electroforéticas en condiciones ácidas fueron realizadas de acuerdo a la técnica de Bushuk y Zillman (1978) modificada por Lafandra y Kasarda (1985), empleando geles de 7% T, 4,1% C, o bien geles en gradiente de 4% a 7% de acrilamida, en presencia de urea 0,2 M y sin gel de stacking. Las muestras consistieron en la fracción prolaminas obtenidas según el protocolo 1.2, como extracto etanólico o bien liofilizada y redisuelta en el momento de usar en ácido acético 0,01 M. En ambos casos se diluyeron 1:1 en buffer muestra de A-PAGE (ácido láctico-lactato de aluminio, pH=3). Se empleó un equipo Hoeffer, donde los geles de 140x160x0,75 mm fueron corridos durante 3 h a 20 mA/placa (aproximadamente 400 V). Se empleó violeta de metilo como indicador del frente de corrida. Este colorante es marcador de la migración de gliadinas.

La asignación de las regiones de movilidad se realizó con gliadinas de trigo, variedad Marquis. Esto permite, de acuerdo a perfiles de

electroforesis convencionalmente establecidos, determinar las regiones de movilidad correspondientes a α -, β -, γ - y ω -gliadinas.

2.3.- Coloración con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Los geles de SDS-PAGE y A-PAGE fueron coloreados con Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) (Mallinckrodt Chemical) 0,1%, en ácido acético, metanol, agua (10: 25: 65), y decolorados primero con el mismo solvente y luego con ácido acético, metanol, agua (7,5: 5: 87,5).

3.- Espectrofotometría.

3.1.- Determinación del espectro de absorción.

El espectro de absorción de proteínas separadas por SDS-PAGE y A-PAGE, fue determinado sobre bandas proteicas en los geles coloreados con CBB R-250, empleando un equipo Shimadzu Dual Wavelength TLC Scanner CS-930. El espectro fue registrado en forma continua entre 370-700 nm, con una porción libre de proteínas del mismo gel como blanco. La absorbancia de la banda proteica fue leída directamente como la diferencia entre la muestra y el blanco. Finalmente, el espectro fue normalizado a una escala porcentual.

3.2.- Registro densitométrico.

Las corridas electroforéticas fueron analizadas mediante densitometría en un equipo Shimadzu Dual Wavelength TLC Scanner CS-910. Los geles coloreados con CBB R-250, fueron leídos en dos condiciones: lectura normal, 580 nm con haz de referencia 470 nm y lectura diferencial a 525 nm con haz de referencia a 625 nm.

4.- Isoelectroenfoque (IEF).

El análisis por IEF fue realizado en un

equipo Bio-Rad (modelo 111-Mini IEF). Para lo cual, las muestras fueron primeramente dializadas frente a agua o una solución de glicina 0.1 M. Luego de la corrida se coloreó el gel con CBB R-250 y finalmente el gel fue desecado para su conservación.

5.- Preparación de soluciones estandar.

Se preparó una solución de aproximadamente 2 mg/ml de gliadina (Sigma) en etanol 70%. Con el objeto de obtener una solución límpida, se filtró sucesivamente por papel de filtro y por membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm y 0,22 μm .

Se empleó el método de Kjeldahl, como método de cuantificación absoluto. Para esto, se trabajó con volúmenes de soluciones muestra que contenían aproximadamente 20 mg de proteína. Para evitar la formación de espuma durante la etapa de digestión, el etanol de la muestra fue previamente evaporado por calentamiento suave. Se empleó como factor de nitrógeno proteico para gliadinas, $f = 5,7$.

De igual manera, se preparó una solución estandar de gliadinas en ácido acético 0,01 M.

6.- Cuantificación de prolaminas mediante métodos generales de determinación de proteínas.

La concentración proteica de las soluciones estandar de gliadinas y de seroalbúmina bovina (BSA) preparadas según se describió en el protocolo 5., así como de varias soluciones obtenidas por dilución de éstas en etanol 70% y agua, respectivamente, fue determinada por triplicado por el método de Kjeldahl, empleando como factores $BSA = N \times 6,25$ y $Gliadinas = N \times 5,7$. Las soluciones de BSA y gliadinas de concentración conocida, fueron evaluadas por diferentes métodos: absorbancia a 280 nm, Bradford (1976), Lowry y col., (1951) y Peterson (1977).

7.- Purificación de prolaminas por FPLC de intercambio catiónico.

7.1.- Preparación de las muestras.

La *fracción prolaminas* de nueve cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.: INTA La Paz, Staparka, Buck Bagual, Buck Pucará, INTA Marcos Juarez, Buck Fogón, Buck Catriel, ProINTA Pigue y ProINTA Oasis) y de cebada (*Hordeum vulgare* L.: Línea 371) y centeno (*Secale cereale* L.: Insave FH), y la *fracción enriquecida en ω -gliadinas*, fueron obtenidas según los protocolos 1.2 y 1.3, respectivamente. Los extractos de prolaminas fueron liofilizados, luego disueltos y dializados con buffer A de FPLC de intercambio catiónico, y filtrados por membranas de 0,22 μm (Millipore). La concentración de cada muestra fue determinada mediante el método de Lowry empleando la solución de gliadina estandar como referencia.

7.2- FPLC de intercambio catiónico en columna analítica.

Las prolaminas fueron separadas utilizando un equipo de FPLC LKB-Pharmacia. Con el objeto de optimizar las condiciones de elución de las prolaminas de trigo, cebada y centeno, se efectuaron corridas cromatográficas en una columna analítica pre-empacada, Mono-S HR 5/5. Se trabajó a un flujo de 1 ml/min, a una presión de 1,5-2 MPa, con un volumen de fracción de 1ml. La columna fue equilibrada en buffer A (urea 2 M, ácido cítrico 0,05 M, ajustado a pH 3 con NaOH 0,1 M).

Todas las eluciones fueron realizadas a temperatura ambiente con gradientes lineales de concentración de NaCl con buffer B (NaCl 0,8 M, urea 2 M, ácido cítrico 0,05 M, ajustado a pH 3 con NaOH 0,1 M). La elución proteica fue seguida por medida de absorbancia a 280 nm. Las columnas fueron lavadas cada dos o tres corridas con buffer B y NaOH 2 M hasta que no se detectó material que absorbiera a 280 nm (sensibilidad,

0.1 AUFS). Luego las columnas fueron equilibradas en buffer A.

Las fracciones colectadas fueron liofilizadas, luego disueltas y dializadas contra ácido acético 0,01 M para su análisis.

7.3.- Separación de gliadinas por FPLC de intercambio catiónico en columna preparativa.

Una vez establecidas las condiciones que permiten una mejor resolución de las gliadinas, se trabajó en una columna preparativa Pharmacia XK 16/40 rellena con aproximadamente 60 ml de gel de S-Sepharosa, con un flujo de 4 ml/min, a una presión de 0,5 MPa y 4 ml de volumen de fracción. En cada corrida, se inyectó aproximadamente 30 mg de gliadinas o 5 mg de la fracción enriquecida en ω -gliadinas, y se siguió un procedimiento similar a la separación analítica, protocolo 7.2.

8.- Obtención de anticuerpos policlonales.

Conejos New Zealand White fueron inmunizados intradérmicamente en varios puntos del lomo con 1ml de una suspensión (aproximadamente 1 mg/ml) de gliadina comercial (Sigma), emulsificada con volúmenes iguales de solución de buffer fosfato salino (PBS)(NaCl 150 mM, KCl 2,7 mM, PO_4HNa_2 8,1 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,5 mM, pH=7,4) y de adjuvante de Freund completo, para la primera inoculación e incompleto para el resto del plan de inmunización. Las inoculaciones se repitieron aproximadamente cada tres semanas.

La inmunización fue seguida mediante análisis por ELISA de la actividad del suero obtenido en sucesivas sangrías parciales.

9.- Producción de anticuerpos monoclonales.

9.1.- Plan de inmunización.

Ratones BALB/c fueron inmunizados por vía intraperitoneal, con una suspensión de gliadina comercial preparada de la misma manera que en el protocolo 8. Cada ratón fue inoculado, cada tres semanas durante cuatro meses, con aproximadamente 50 μg de proteína. La primera inculación se hizo con adjuvante de Freund completo y el resto del plan de inmunización con adjuvante incompleto. Mediante sangrías parciales se analizó el título de anticuerpos anti-gliadinas por ELISA indirecto. Para la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) se empleó el bazo del ratón que presentó mayor título.

9.2.- Cultivo de las células de mieloma.

Se emplearon células del mieloma no secretor de inmunoglobulinas denominado NSO (Kohler y Milstein, 1975), el cual es singeneico con los ratones BALB/c. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS) y penicilina-estreptomicina-piruvato sódico-glutamina (PSPG), en estufa a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO_2 . Se cosecharon en fase logarítmica y se lavaron con solución buffer glucosada con cloruros de sodio y potasio (GKN), centrifugando a 300 x g durante 10 min. La viabilidad se determinó por exclusión del colorante Azul Tripán y recuento de células viables en cámara de Neubauer.

9.3.- Obtención de esplenocitos.

Los ratones inmunizados, se sangraron a blanco por el plexo retroorbital y se sacrificaron por dislocación cervical. En condiciones asépticas se obtuvo el bazo, el cual se homogeneizó en un homogeneizador de tejidos ("potter") en presencia de 5 ml de GKN.

La suspensión celular se filtró por un tamiz de acero inoxidable de 60-80 mallas/pulgada con el objeto de eliminar los agregados celulares y restos de tejido. Las células se lavaron con GKN, y se centrifugaron a 300 x g 10 min. El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer por dilución de los esplenocitos en solución de Turk (ácido acético 3% en agua destilada).

9.4.- Protocolo de fusión celular.

Se empleó la técnica desarrollada por Kohler y Milstein (1975) con algunas modificaciones.

Se mezclaron 10×10^7 células de bazo con 5×10^7 células del mieloma no secretor NSO. Se centrifugaron a 300 x g durante 5 min y el sedimento fue tratado a temperatura ambiente con una solución de polietilenglicol 3350 al 50% (p/v) durante un período de 1 min con agitación suave. Se agregaron 2 ml de GKN en 2 min con agitación y luego 20 ml, gota a gota, en unos 5 min, y se completó el volumen del tubo a 50 ml. Las células fusionadas se centrifugaron y lavaron con GKN y se resuspendieron suavemente en RPMI-1640 conteniendo hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) y 20% de FCS, suplementado con PSPG. Las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 fosas, a razón de 1 ml de suspensión celular por fosa. Se incubaron en estufa a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂.

Luego de 15 a 20 días, donde el crecimiento celular fue suficiente, se analizó la presencia de anticuerpos específicos en los cultivos. Para esto se recogió el sobrenadante de cada fosa y se analizó por ELISA indirecto frente a *gliadina comercial* y a la *fracción enriquecida en ω -gliadinas*.

Las células de las fosas que dieron resultados positivos frente a una o ambas de las mezclas antigénicas ensayadas, fueron expandidas y cultivadas en RPMI-1640 con 20% de FCS, PSPG y hipoxantina-timidina (HT). Luego de alcanzar un crecimiento adecuado, una parte del cultivo fue

utilizada para congelar células y la otra para la clonación. La clonación se realizó por dilución límite en placas de cultivo de fondo plano de 96 fosas. La placa fue sembrada según el siguiente esquema: las primeras tres filas se sembraron a un promedio de 5 células por fosa, las siguientes tres a un promedio de 1 célula por fosa, y las dos últimas a un promedio de 0,5 células por fosa.

Luego de aproximadamente 14 días de cultivo se recogieron los sobrenadantes con color amarillento y se analizaron, para detectar la presencia de anticuerpos específicos siguiendo la técnica descrita 12.1. Por observación microscópica se verificó el crecimiento de una sola colonia, como forma de asegurar la monoclonalidad del cultivo.

Los cultivos que resultaron positivos fueron clonados nuevamente. Luego de un nuevo "screening", los hibridomas positivos fueron expandidos a placas de 24 fosas y posteriormente, a botellas de 25 cm² y 75 cm² de superficie.

9.5.- Conservación de líneas celulares.

Se cosecharon $2-4 \times 10^6$ células, se centrifugaron y lavaron con GKN. Se resuspendieron en 1 ml de una mezcla de FCS y dimetilsulfóxido (en relación 9:1), y se dispensaron en criotubos, los que se colocaron en recipientes de telgopor de paredes de al menos 1 cm de espesor. Se congelaron a -70°C durante 48 h y luego los tubos fueron transferidos a nitrógeno líquido.

9.6.- Determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales.

Para la determinación del isotipo, se empleó la técnica de difusión bidimensional (Ouchterlony)(Weir, 1978) frente a sueros anti-isotípicos (Sigma). Para el análisis, los AcMo provenientes de los sobrenadantes de cultivo, fueron liofilizados y resuspendidos, en agua destilada, a 1/10 del volumen original.

9.7.- Producción de líquido ascítico.

Se inocularon cinco ratones BALB/c por cada hibridoma, con 0,5 ml de 2,6,10,14-tetra metilpentadecano (Pristane, Sigma). Luego de 7 a 10 días fueron inyectados por vía intraperitoneal con $1-2 \times 10^6$ células de los hibridomas respectivos. A las dos semanas y luego, cada 48, se punzó el abdomen de los animales para colectar el líquido ascítico. Se dejó coagular 1 h a 37°C y se centrifugó 20 min a $3.000 \times g$ a 4°C . Los líquidos ascíticos fueron luego congelados en alícuotas a -20°C hasta su uso.

10.- Purificación de anticuerpos monoclonales por FPLC de intercambio aniónico.

10.1.- Preparación de las muestras.

Los AcMo fueron precipitados del líquido ascítico por tratamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ al 50% de saturación. Para esto, se agregó sobre el ascitis, gota a gota, un volumen igual de solución saturada de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ con agitación constante, en baño de agua-hielo. Luego de 2 h de incubación, se centrifugó a $5.000 \times g$ durante 15 min a 4°C . El precipitado se disolvió en buffer A de FPLC intercambio aniónico: Tris-HCl 0,020 M pH=8.5 (aproximadamente 1/10 del volumen original de ascitis) y se dializó frente al mismo buffer. Finalmente, se filtró por membrana de nitrocelulosa de $0,22 \mu\text{m}$ y se cuantificó por medida de absorbancia a 280 nm, empleando un factor de 0,7 mg/ml por unidad de DO 280 nm.

10.2.- FPLC analítico de intercambio aniónico.

Los AcMo: 13B4, 11C4 y 12A1, fueron purificados empleando un equipo de FPLC LKB-Pharmacia. Se utilizó una columna analítica pre-empacada Mono-Q HR 5/5 con un flujo de 1 ml/min, a una presión de 1,5-2 MPa, con un volumen de fracción de 1 ml. Se empleó buffer A: Tris-HCl 0,020 M pH=8.5 y buffer B: Tris-HCl 0,020 M, NaCl 1 M, pH=8,5. Todas las

eluciones fueron realizadas a temperatura ambiente con gradientes lineales de concentración de NaCl con buffer B. La elución proteica fue seguida por medida de absorbancia a 280 nm. Las fracciones colectadas fueron liofilizadas y luego analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras, para determinar su composición. También se analizó la actividad anticuerpo específica de las fracciones por ELISA indirecto (protocolo 12.1).

10.3.- FPLC preparativo de intercambio aniónico.

Luego de optimizadas las condiciones de elución en la columna Mono-Q, se empleó una columna preparativa Pharmacia XK 16/40 rellena con aproximadamente 60 ml de Q-Sepharosa, con un flujo de 4 ml/min, a una presión de 0,5 MPa y 4 ml de volumen de fracción.

Las fracciones fueron colectadas y las correspondientes a los AcMo fueron juntadas y liofilizadas.

11.- Marcación de los anticuerpos monoclonales.

Los AcMo fueron conjugados con biotina según (Lane, 1988). Para esto, los AcMo purificados por FPLC de intercambio aniónico, fueron liofilizados, luego disueltos y dializados con buffer borato 0,1 M pH=8.8. Luego, 2 a 4 ml de la solución del AcMo de aproximadamente 1 mg/ml, fueron incubados durante 4 h con agitación suave a temperatura ambiente con n-hidroxisuccinimido-biotinamidocaproato ester (Sigma) 100 μg de ester/ mg de anticuerpo, la reacción se detuvo con NH_4Cl 1 M ($20 \mu\text{l}/250 \mu\text{g}$ de ester).

Para eliminar la biotina libre se empleó una columna P-10 (Pharmacia) o bien diálisis exhaustiva frente a PBS. Finalmente, el producto biotinilado fue liofilizado y almacenado a -20°C .

12.- Enzimoinmunoanálisis (ELISA) con anticuerpos policlonales.

12.1.- ELISA indirecto.

Este formato de ensayo fue empleado, en diferentes ocasiones, siguiendo un esquema de trabajo similar.

Se sensibilizaron placas Maxisorp Nunc, con la solución antigénica, 100 μ l/fosa durante 16 h a 4°C. Como antígenos se emplearon:

a) *gliadina comercial*. Para su preparación se empleó la solución de gliadina estandar obtenida por el protocolo 5., disuelta en PBS a la concentración requerida en el momento de usar.

b) *fracción enriquecida en ω -gliadinas*, obtenida según el protocolo 1.3. y luego liofilizada. Antes de su uso se disolvió y dializó frente a ácido acético 0,01 M y finalmente, se cuantificó por el método de Lowry empleando gliadina estandar como referencia.

c) *gliadinas purificadas por FPLC de intercambio catiónico*. Estas fracciones se obtuvieron según el protocolo 7. y luego liofilizadas. Antes de su uso se disolvieron y dializaron frente a ácido acético 0,01 M y finalmente se cuantificó por el método de Lowry.

Luego de la sensibilización de las placas con cada solución a la concentración adecuada, se lavaron las fosas tres veces con PBS-T (PBS-Tween 20. 0,05%). Se bloquearon los sitios de unión no específica por incubación con 200 μ l/fosa de PBS-leche descremada al 3% (solución de bloqueo), durante 1 h a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-T. Se incubó con los anticuerpos a analizar diluïdos en PBS-T-leche descremada al 1% (PBS-T-L), 1 h a 37°C. Este formato de ensayo fue empleado para:

- Titulación de AcMo y sueros de conejos y ratones.
- "Screening" de anticuerpos monoclonales
- Análisis de la cromatografía de intercambio aniónico
- Análisis de sueros humanos

Una vez realizada la incubación con los anticuerpos a analizar, se incubó durante 1 h a 37 °C, con el anticuerpo especie-específico conjugado a peroxidasa en PBS-T-L (100 μ l/fosa). Luego de tres lavados con PBS-T, la reacción de color fue desarrollada con 100 μ l de una solución buffer de ácido cítrico 0,1 M-fosfato de sodio 0,1 M, pH=5,0, conteniendo como sustrato, o-fenilendiamina (1 mg/ml, Merck) y H₂O₂ 30% (1 μ l/ml). La reacción enzimática fue detenida luego de 15-20 min, con 40 μ l/fosa de SO₄H₂ 4 N. La densidad óptica fue determinada por lectura a 490 nm.

12.2.- ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales.

12.2.1.- Sensibilización. Se sensibilizaron placas de poliestireno Maxisorp Nunc con 100 μ l/fosa de soluciones de gliadina estandar en PBS (1 μ g/ml), durante 16 h a 4°C. Luego se lavaron las fosas tres veces con PBS-T. Se bloquearon los sitios de unión no específica por incubación con 200 μ l/fosa de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Luego se lavó tres veces con PBS-T.

12.2.2.- Formación de complejos inmunes en fase fluida (Preincubación). Se incubaron durante 2 h a 37 °C, volúmenes iguales de soluciones estandar de gliadina en el rango 256 pg/ml hasta 20 μ g/ml y el suero de conejo anti-gliadinas en la dilución apropiada, ambos disueltos en PBS-T-L.

12.2.3.- Competición con gliadina en fase sólida. Sobre la placa previamente sensibilizada se incubaron, 30 min a 37 °C, 100 μ l/fosa de cada una de las muestra provenientes de la preincubación. Luego se lavó tres veces con PBS-T.

12.2.4.- Incubación con el conjugado a peroxidasa y reacción de color. Se incubó con 100 μ l/fosa de suero de cabra anti-gamaglobulina de conejo conjugado a peroxidasa (Bio-Rad),

diluido 1:1500 PBS-T-L, durante 1 h a 37 °C. Luego de tres lavados con PBS-T, la reacción de color fue desarrollada según se indicó en el protocolo de ELISA indirecto (12.1).

Los valores de absorbancia (DO_{490nm}) fueron transformados por la función logit (Tijssen, 1985),

$$\text{logit } p = \ln \frac{p}{(1-p)} \quad \text{donde } p = \frac{(A - A_0)}{(A_M - A_0)}$$

Los valores de absorbancia corresponden a: A: fosas muestras y standards, A_M : fosas sin antígeno competidor y A_0 : fosas sin suero anti-gliadinas.

Finalmente los resultados fueron graficados como coordenadas logit p vs logaritmo de la concentración de gliadinas.

12.2.5.- Preparación de muestras de alimentos.

Las muestras de alimentos fueron extraídas con etanol 70% en relación 10 ml/g, en baño de agua-hielo, empleando un homogenizador Omnimixer (Sorvall) durante 4 min a mitad de velocidad máxima. La muestra a analizar consistió en el sobrenadante de la centrifugación de los extractos etanólicos a 14.000 x g 2 min.

12.3.- ELISA de desplazamiento entre extractos proteicos.

Con el objeto de preparar los extractos proteicos para análisis de desplazamiento, se procedió según el protocolo 1.2. Los extractos etanólicos fueron liofilizados, en el momento de usar fueron disueltos y dializados frente a ácido acético 0,01 M y filtrados por membranas de 0,22 μm . La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry, empleando la solución de gliadina standard como referencia.

Por dilución adecuada en PBS-T-L, de cada uno de los extractos se obtuvieron soluciones abarcando un amplio rango de concentración. Estas soluciones fueron preincubadas con el suero

de conejo anti-gliadinas y luego se competitieron con gliadina en fase sólida, según el protocolo de ELISA competitivo secuencial 12.2. Los resultados fueron transformados por la función logit o bien, expresados como % respecto al extracto de trigo empleado como referencia.

12.4.- Comparación con un kit comercial.

Se comparó el ELISA desarrollado con el reactivo comercial "Gluten assay kit" (Cortecs Diagnostic, Deeside, UK), el cual fue empleado siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo es un ELISA sandwich, que emplea como captura un AcMo anti- ω -gliadinas y el mismo AcMo conjugado a peroxidasa como revelador. El kit está basado en el método desarrollado por Skerritt y Hill (1991) y ha sido adoptado por la Association Official Analytical Chemist (AOAC) como método oficial.

13.- Enzimoinmunoanálisis con anticuerpos monoclonales.

13.1.- ELISA competitivo secuencial con anticuerpos monoclonales.

Se llevó a cabo según un protocolo similar al ELISA competitivo secuencial con suero de conejo anti-gliadinas 12.2.

13.1.1.- Sensibilización. Se sensibilizaron placas Maxisorp Nunc con 50 μl /fosa de soluciones de gliadina standard en PBS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 16 h a 4°C. Luego se lavaron las fosas tres veces con PBS-T. Se bloquearon los sitios de unión no específica por incubación con 150 μl /fosa de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Luego se lavó tres veces con PBS-T.

13.1.2.- Formación de complejos inmunes en fase fluida (Preincubación). Se incubaron durante 2 h a 37 °C, volúmenes iguales de soluciones standard de gliadina 125 ng/ml hasta 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y del AcMo biotinilado en la dilución apropiada, ambos disueltos en PBS-T-L.

13.1.3.- Competición con gliadina en fase sólida. Sobre la placa previamente sensibilizada se incubaron, 30 min a 37 °C, 50 μ l/fosa de cada una de las muestra provenientes de la preincubación. Luego se lavó tres veces con PBS-T.

13.1.4.- Incubación con estreptavidina-fosfatasa alcalina y reacción de color. Se incubó con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma), diluída 1:3000 en PBS-T-L (50 μ l/fosa) durante 1h a 37 °C. Luego de tres lavados con PBS-T y uno con buffer PNPP: dietanolamina 10%, MgCl 0,01%, azida sodica 0,02% pH= 9.8. La reacción de color fue desarrollada con 50 μ l/fosa de p-nitrofenilfosfato (PNPP) en buffer PNPP (1 mg/ml), durante 30 min.

La reacción se detuvo por el agregado de 50 μ l/fosa de EDTA 0,1 M. La absorbancia fue leída a 405nm. Luego los valores de absorbancia (DO_{405nm}) fueron transformados por la función logit.

13.2.- ELISA de captura.

Se sensibilizaron placas Maxisorp Nunc con 50 μ l/fosa de las soluciones de AcMo (20 μ g/ml), durante 16 h a 4°C. Se lavó y bloqueó como fuera descripto en 12.1. Se incubó con las soluciones standard de gliadina, en el rango de concentración de 0,5 ng/ml hasta 9 μ g/ml, durante 1 h 37 °C. Se lavó con PBS-T y se incubó con el mismo AcMo que el empleado para la captura pero biotinilado, durante 1 h a 37 °C. Se lavó tres veces con PBS-T. Luego se incubó con estreptavidina-fosfatasa alcalina, y se efectuó el desarrollo de color al igual que en 13.1.4..

Los resultados fueron graficados como DO_{405nm} vs logaritmo de la concentración de gliadina standard.

13.3.- ELISA de inhibición de la unión de anticuerpos monoclonales biotinilados.

Se sensibilizaron "strips" Maxisorp Nunc con 50 μ l/fosa de soluciones de gliadina standard en PBS (10 μ g/ml), durante 16 h a 4°C. Luego se lavaron las fosas tres veces con PBS-T. Se bloquearon los sitios de unión no específica por incubación con 150 μ l/fosa de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C. Luego se lavó tres veces con PBS-T. Se incubaron durante 1 h a 37 °C, 50 μ l/fosa de diluciones seriadas de diferentes AcMo anti-gliadinas en presencia de un AcMo biotinilado a dilución constante (la cual fue determinada previamente por un ensayo de titulación). Luego de tres lavados con PBS-T, se prosiguió el mismo protocolo de 13.1.4. Los resultados se graficaron como DO_{405nm} vs log de la concentración de los AcMo en estudio.

14.- Suero de pacientes.

Los sueros en estudio provienen de:

- 1- Suero de pacientes celíacos tipificados en HLA, fueron cedidos por el Dr. Leonardo Satz, "Hospital de Clínicas José de San Martín" Bs.As.. Todos los sueros emleados pertenecen a pacientes que expresaban HLA-DQ2.
- 2- Suero de pacientes clasificados por biopsia duodenal, fueron cedidos por las Dras. Marta Zelazko, Patricia Carabajal y Norma Castagnino, "Hospital de Niños R. Gutierrez" Bs.As. Estos sueros fueron clasificados en tres grupos de enfermos celíacos y un grupo control,
 - a- enfermos celíacos con enteropatía activa (Act)
 - b- enfermos celíacos en tratamiento bajo dieta libre de gluten (DLG)
 - c- enfermos celíacos en desafío o con ingesta voluntaria de gluten (Des)
 - d- pacientes con enfermedad gastrointestinal no celíaca (GNC)
- 3- Sueros de un grupo control negativo, pertenecientes a 22 voluntarios sanos sin sospecha clínica de enfermedad celíaca.

15.- "Immunoblotting".**15.1.- Análisis frente a proteínas resueltas por SDS-PAGE.**

Las fracciones proteicas en estudio fueron separadas por SDS-PAGE según 2.1. Las proteínas fueron transferidas a papel de nitrocelulosa de acuerdo a la técnica descrita por Towbin (1979), aplicando una corriente transversal al plano del gel de 300 mA durante 1 h, empleando un buffer transferencia: Tris 0,02 M, Glicina 0,193 M, metanol p.a. 20%, pH=8,35. El papel de nitrocelulosa fue bloqueado con una solución de leche descremada en polvo 1% en TBS (Tris-HCl 0,050 M, NaCl 0,150 M pH=7,4) durante 1 h 37°C. Se lavó tres veces con TBS y se incubó durante 1 h a 37°C con la dilución adecuada, en TBS-leche descremada al 0,5%, del anticuerpo en estudio (suero de conejo anti-gliadinas, AcMo anti-prolaminas o sueros humanos). Luego de tres lavados, se incubó con el conjugado, diluído en TBS-leche descremada 0,5%, correspondiente: anti-inmunoglobulinas de conejo (Bio-Rad), anti-inmunoglobulinas de ratón (Sigma), y anti-inmunoglobulinas humanas totales,

anti-IgG humana o anti-IgA humana (Sigma), todos marcados con peroxidasa. Luego de tres lavados con TBS se adicionó el sustrato para la enzima (3 mg de 4-cloro-1-naftol disueltos en 1 ml de metanol p.a., 5 ml de TBS y 4 μ l de H₂O₂). La reacción de color se detuvo por lavado con agua destilada.

Los marcadores de peso molecular relativo se revelaron por coloración con Rojo Ponceau-S 0,1% en ácido acético 1% y se decoloraron con agua destilada.

15.2.- Análisis frente a proteínas resueltas por A-PAGE.

El extracto de gliadinas totales obtenido según el protocolo 1.2, fue resuelto por A-PAGE (protocolo 2.2). Luego siguiendo un procedimiento similar al 15.1, se transfirieron las proteínas en un buffer ácido láctico 0,1 M, durante 1 h a 250 mA.

Las etapas posteriores de revelado fueron realizadas según el protocolo 15.1.

Resultados y Discusión

1.- Extracción y caracterización de las prolaminas de trigo, cebada y centeno.

1.1.- Análisis de la extracción de prolaminas con distintos solventes.

La fracción prolaminas es una mezcla compleja de proteínas con características de solubilidad ligeramente diferentes, lo cual conduce a que modificaciones en las condiciones de extracción, principalmente en el solvente empleado, generen extractos de composición y cantidad total de proteínas recuperada altamente variable.

Con el objeto de elegir el solvente que permita una recuperación de prolaminas más efectiva y selectiva, se analizaron cuali y cuantitativamente las prolaminas extraídas de harina de trigo (INTA La Paz). Previa eliminación de la *fracción albúminas-globulinas*, las gliadinas fueron extraídas con cinco solventes acuosos diferentes: etanol 70%, 2-propanol 70%, 2-propanol 50%, 1-propanol 50% o urea 1 M. La eficiencia de extracción fue evaluada por la concentración proteica del extracto obtenido, la que fue determinada mediante el método de Lowry y col. (1951), empleando la solución de gliadina estándar como referencia (protocolo 5).

En la **Tabla 1.1**, se indican los valores de concentración proteica correspondientes al extracto obtenido con cada solvente. Estos fueron expresados como valores promedio de duplicados \pm desviación estándar (DS).

Se observa que la eficiencia de extracción de los solventes analizados, medida como proteína total extraída, es variable, siendo 1-propanol 50% y etanol 70% los que presentan mayor recuperación de proteínas.

Tabla 1.1. Influencia del solvente de extracción sobre la cantidad de proteína recuperada.

Extractante	mg/ml \pm DS
etanol 70%	2.5 \pm 0.1
2-propanol 70%	1.97 \pm 0.03
2-propanol 50%	1.69 \pm 0.04
1-propanol 50%	3.11 \pm 0.06
urea 1 M	1.93 \pm 0.08

La composición proteica de los extractos fue analizada por técnicas electroforéticas, donde la mayor resolución se logra en geles en gradiente de concentración de acrilamida en: SDS-PAGE (10-15%) y A-PAGE (4-7%).

Cabe destacar que las prolaminas obtenidas forman agregados con facilidad, aún cuando se encuentren en un medio alcohólico. Las muestras agregadas no son adecuadas para el análisis electroforético. Por esta razón, los extractos deben ser analizados inmediatamente de obtenidos o bien liofilizados. Los liofilizados deben ser disueltos en BM para SDS-PAGE o para electroforesis a pH 3, en ácido acético 0.01 M o en buffer de corrida de A-PAGE.

En el análisis por SDS-PAGE y A-PAGE (**figura 1.1 A y B**, respectivamente), se observan diferencias entre los distintos extractos. Etanol 70% (a), 1-propanol 50% (d) y urea 1 M (e) extraen gliadinas de todos los grupos y en menor proporción HMW-gluteninas, mientras que 2-propanol 70% (b) y 2-propanol 50% (c), prácticamente no extraen ω -gliadinas ni HMW gluteninas.

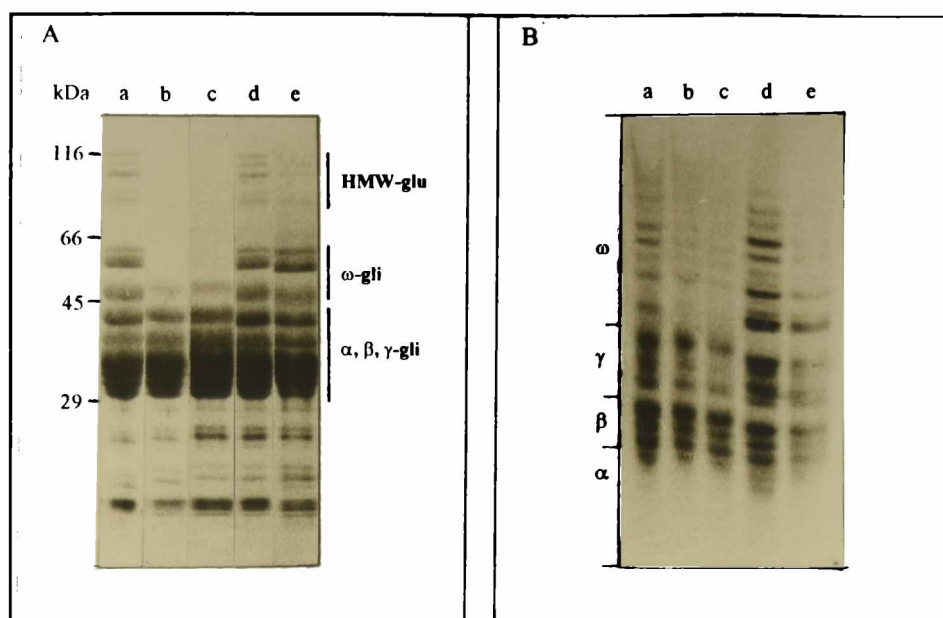


Figura 1.1. Análisis electroforético de los extractos obtenidos con distintos solventes. Gliadinas extraídas de harina de trigo (INTA La Paz) por: etanol 70%(a), 2-propanol 70% (b), 2-propanol 50% (c), 1-propanol 50% (d) y urea 1 M (e). **A-** SDS-PAGE (10-15%) y **B-** A-PAGE (4-7%). Los grupos de prolaminas fueron asignadas de acuerdo la clasificación de movilidad relativa convencional.

Los resultados del análisis cuali y cuantitativo indican que etanol 70% y 1-propanol 50% son los solventes de elección, pues presentan la más alta recuperación de prolaminas de todos los grupos.

1.2.- Obtención de la fracción enriquecida en ω -gliadinas por extracción secuencial.

El análisis por SDS-PAGE y A-PAGE de la **figura 1.1**, muestra que 2-propanol 70% extrae α -, β - y γ -gliadinas, pero no ω -gliadinas. Por esta razón, se eligió este solvente para eliminar selectivamente α -, β - y γ -gliadinas y dejar un residuo rico en ω -gliadinas. Luego, este residuo fue extraído con urea 1 M, el cual, a juzgar por el análisis electroforético (**figura 1.1 A y B**), extrae comparativamente menos α -, β - y γ -gliadinas que etanol 70% y 1-propanol 50%. En la **figura 1.2** (calle d), se observa que la extracción secuencial permite una buena recuperación de ω -gliadinas. De esta manera, por pasos simples de extracción se obtiene una preparación con alto contenido de ω -gliadinas.

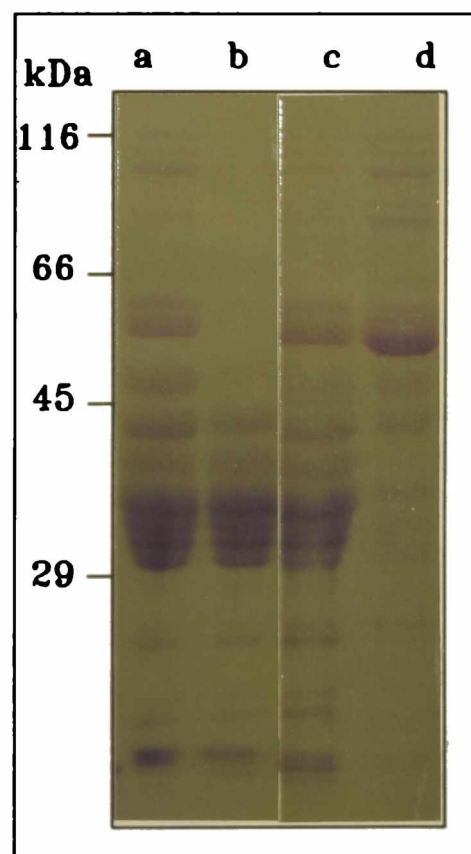


Figura 1.2. Análisis por SDS-PAGE (10-15%) de gliadinas obtenidas por extracción con etanol 70% (a), 2-propanol 70% (b), urea 1 M (c) y por extracción secuencial (d).

En la **figura 1.2**, se observa además, que los geles de SDS-PAGE coloreados con CBB R-250, presentan bandas de proteínas con tinción rojiza. Esto es evidente en los extractos obtenidos con etanol 70% (a), urea 1 M (c) y en particular en la *fracción enriquecida en ω -gliadinas* (d). Se observa que el extracto obtenido con 2-propanol 70% no presenta ω -gliadinas, ni componentes metacromáticos. Estos resultados fueron confirmados por análisis por A-PAGE.

Con el objeto de identificar los componentes que presentan metacromasia, se analizaron extractos de proteínas totales de tres cultivares de trigo, y de cebada, centeno y avena, separados por SDS-PAGE y coloreados con CBB R-250.

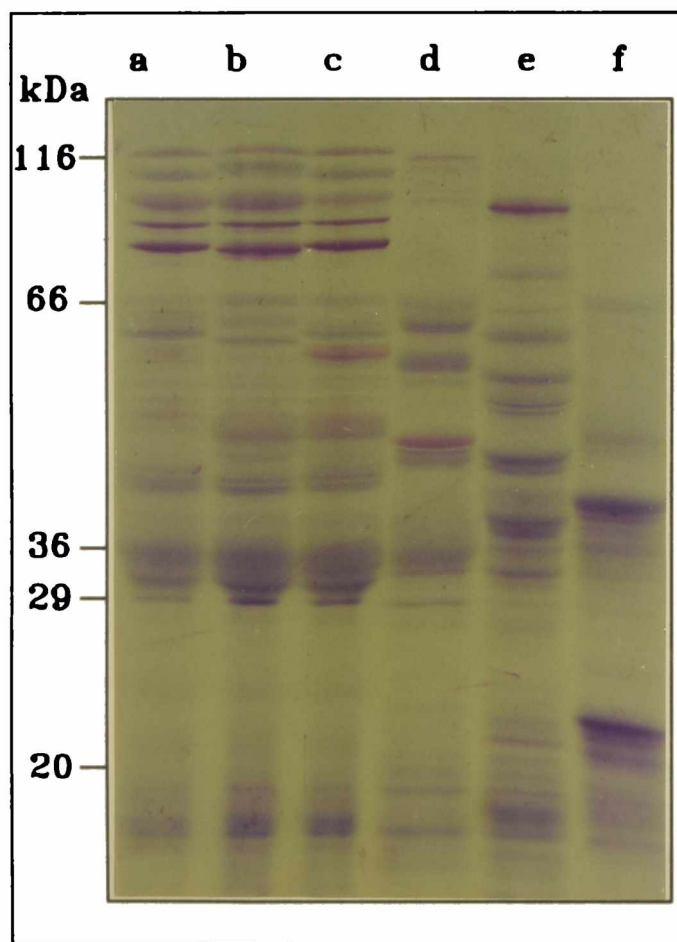


Figura 1.3. Análisis por SDS-PAGE (10-15%) de extractos de proteínas totales de tres cultivares de trigo (INTA La Paz (a), Buck Patacón (b), Buck ñandú (c), centeno (d), cebada (e) y avena (f).

En la **figura 1.3**, los cultivares de trigo analizados exhiben numerosas bandas rojas en las regiones correspondientes a ω -gliadinas y HMW-gluteninas (calles a, b y c). Cebada (calle e) presenta componentes metacromáticos en las regiones de D- y C-hordeínas, mientras centeno (calle d) muestra una banda en ω -secalinas y algunas en la región HMW-secalinas. No se observó metacromasia en el extracto de proteínas totales de avena (calle f).

1.3.- Determinación del espectro de absorción.

Se analizó el espectro de absorción del complejo CBB R-250/proteína. Para ello, se estudiaron bandas de proteínas coloreadas de azul o rojo de trigo, y la banda azul de seroalbúmina bovina (BSA) empleada como referencia. Estas bandas corresponden a proteínas resueltas en el mismo gel y por lo tanto, coloreadas y decoloradas simultáneamente.

En la **figura 1.4A**, se observa que el espectro de absorción correspondiente a las bandas azules de trigo y de BSA presenta un máximo a 575 nm. El espectro de las bandas rojas de trigo presenta un máximo de absorbancia a aproximadamente 545 nm y un hombro a 570 nm. Se observa que el espectro de componentes que tienen coloración rojiza, presenta un ligero desplazamiento hacia menores longitudes de onda.

Espectros similares fueron obtenidos al analizar las bandas rojas y azules de cebada y centeno (resultado no mostrado).

Estos resultados están de acuerdo a los publicados para colágeno (Micko y Schlaepfer, 1978; McCormick y col. 1979), y en histonas (Duhamel y col., 1980).

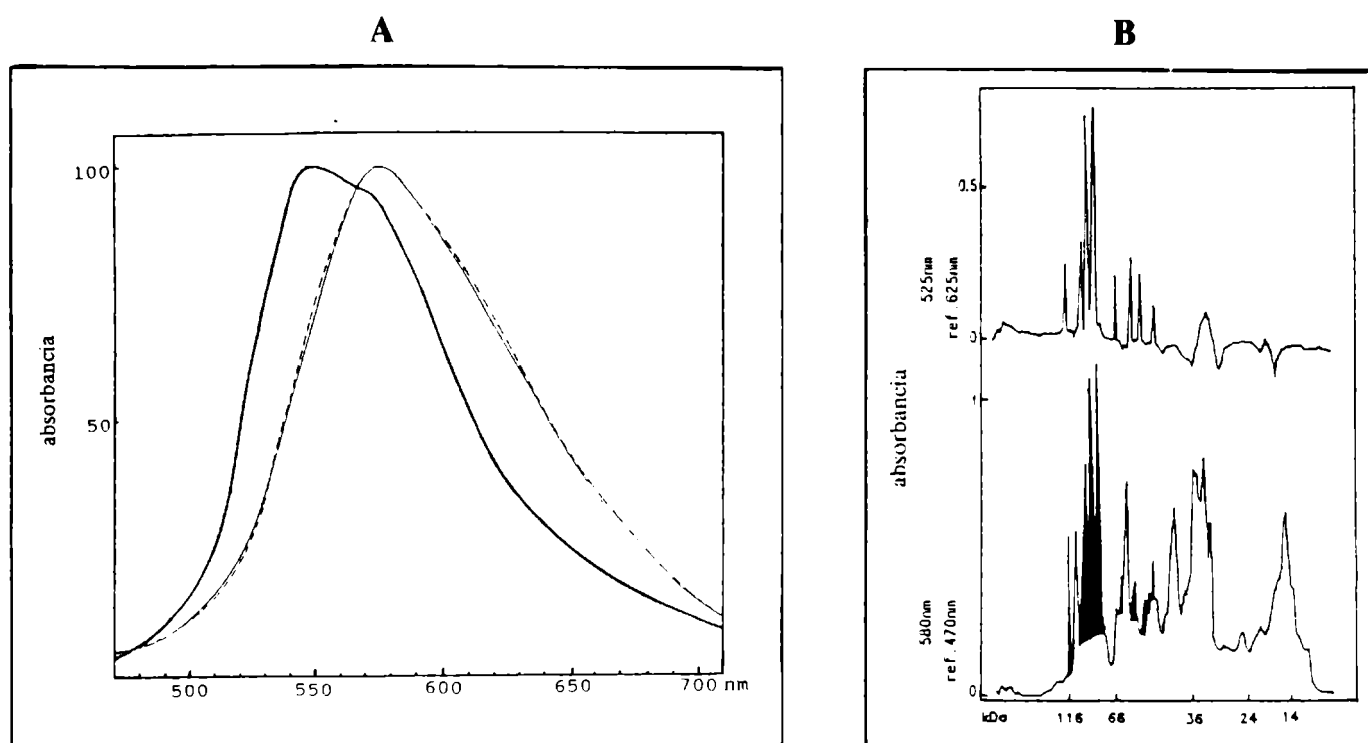


Figura 1.4. A- Espectro de absorción de proteínas separadas por SDS-PAGE (10-15%) y coloreadas con CBB R-250: (—) banda roja de trigo; (- -) banda azul de trigo; (· ·) BSA. B- Registro densitométrico correspondiente a SDS-PAGE de la figura 1.3, calle a. Registro inferior: lectura normal a 580 nm, referencia 470 nm, y registro superior: lectura diferencial a 525 nm, referencia 625 nm. Los picos sombreados corresponden a bandas rojas en la inspección visual.

Como puede observarse, a 525 nm, las bandas rojas presentan mayor absorbancia relativa que las azules, y por el contrario, a 625 nm, las bandas azules presentan mayor absorbancia que las rojas. Por lo tanto, en base a los espectros obtenidos y con el fin de lograr un registro densitométrico (lectura diferencial) que permita una clara diferenciación entre bandas rojas y azules, se eligió 525 nm como longitud de onda del haz de lectura y 625 nm para el haz de referencia. Mientras que para el registro normal se empleó 570 nm y 470 nm, respectivamente.

En la **figura 1.4B** (inferior), se muestra el registro densitométrico, en las condiciones normales, de las proteínas del extracto total de trigo resuelto por SDS-PAGE (**figura 1.3**, calle a), donde los picos sombreados corresponden a las bandas rojas en la inspección visual. El registro superior de la **figura 1.4B**, muestra la densitometría a 525 nm, empleando 625 nm como haz de referencia.

La absorción a 525 nm se debe fundamentalmente a las bandas rojas, mientras que las azules dan picos menores, en algunos casos desaparecen o bien dan registros negativos.

Por otro lado, no se observaron componentes con efecto metacromático en la *fracción albúminas-globulinas* de trigo (no mostrado).

1.4.- Análisis de las prolaminas por A-PAGE.

El análisis de las prolaminas de trigo, cebada y centeno por A-PAGE, muestra que existen componentes con intenso efecto metacromático en la región de baja movilidad electroforética (**figura 1.5**). Los componentes metacromáticos se encuentran siempre en la región de ω -gliadinas, aunque en dos cultivares se observa una banda rojiza en la región de γ -gliadinas (a y d). En centeno (e) y cebada (f), los componentes metacromáticos se encuentran en ω -secalinas y C-hordeínas, respectivamente.

La **figura 1.6** muestra el registro densitométrico correspondiente a prolaminas de tres cultivares de trigo, cebada y centeno, resueltas por A-PAGE. Los registros inferiores corresponden a la lectura normal a 580 nm. En los registros superiores se muestra la lectura diferencial a 525 nm con referencia a 625 nm. Se observa, la desaparición de las bandas azules, mientras que los picos que corresponden a bandas rojas permanecen. Estos se encuentran en la región de baja movilidad electroforética correspondiendo a ω -gliadinas (a, b, c), C-hordeínas (d) y ω -secalinas (e). El análisis por A-PAGE de la *fracción enriquecida en ω -gliadinas* indica que la extracción secuencial produce una buena recuperación de ω -gliadinas y que esta fracción muestra una intensa metacromasia (f).

Con el objeto de estudiar si la presencia de urea durante la electroforesis afecta la metacromasia, los extractos de prolaminas fueron analizados por SDS-PAGE en presencia de urea 6 M en el gel. Los resultados obtenidos muestran cambios en la movilidad electroforética en varias de las proteínas, pero la metacromasia es igualmente evidente. Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizó el estudio por A-PAGE con urea 2 M (resultados no mostrados).

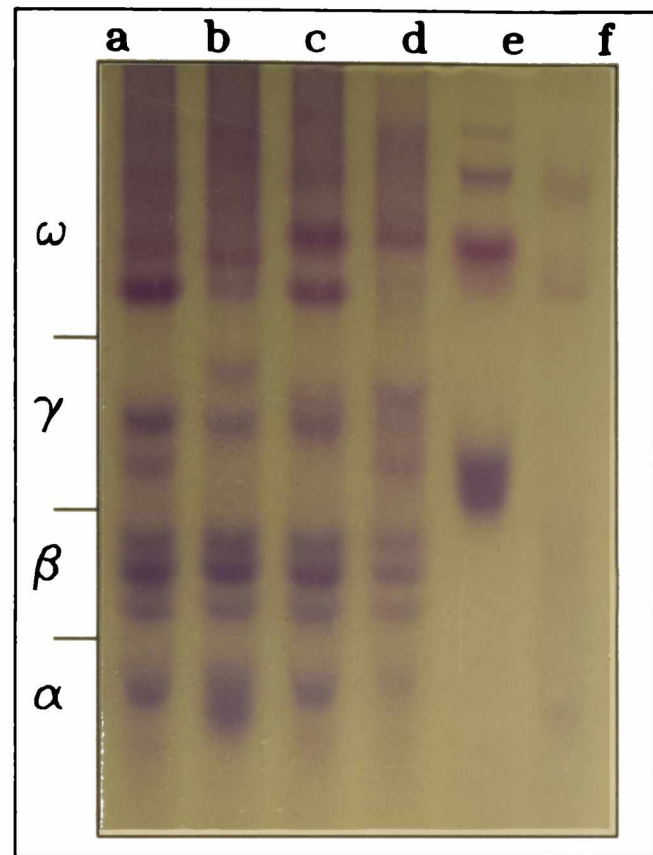


Figura 1.5. Análisis de las prolaminas por A-PAGE. Cultivares de trigo: INTA La Paz (a), B. Patacón (b), B. ñandú (c), Marquis (d), centeno (e), cebada (f).



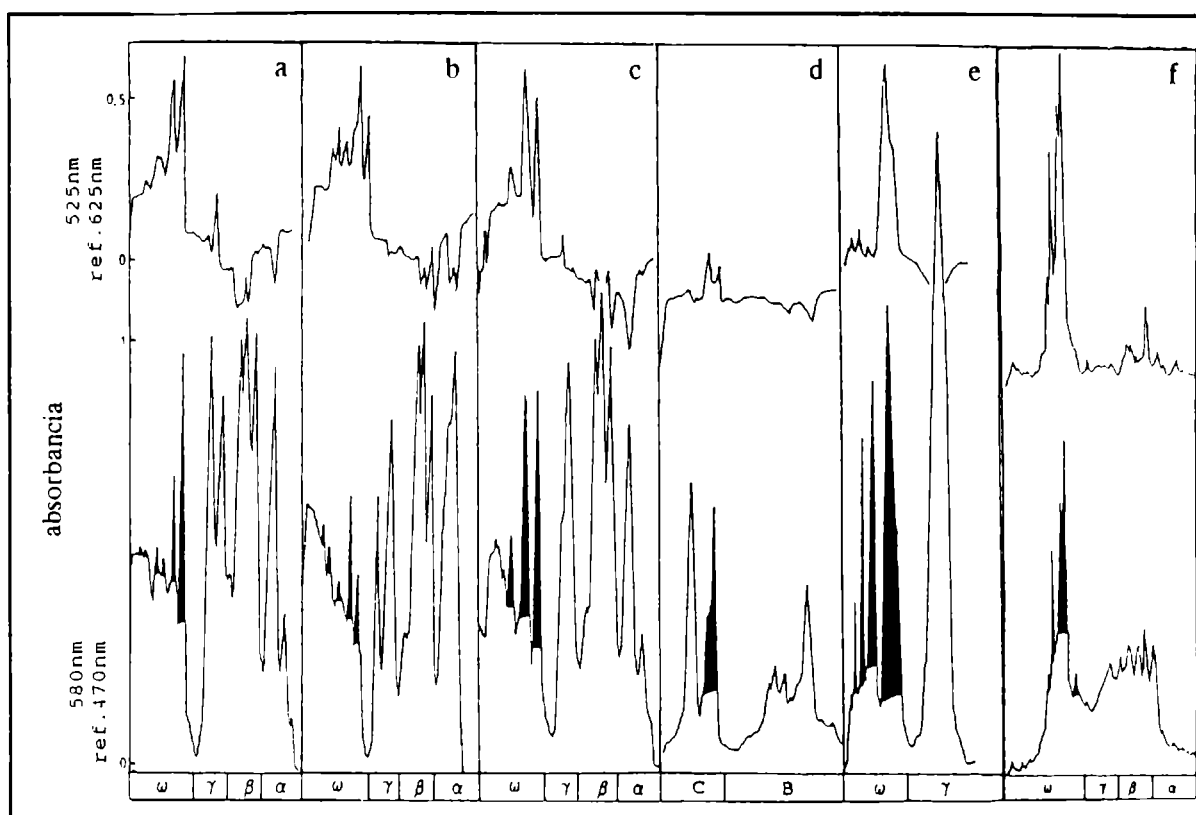


Figura 1.6. Registros densitométricos de prolaminas resueltas por A-PAGE. Cultivares de trigo: INTA La Paz (a), Buck Patacón (b), Buck ñandú (c), cebada (d), centeno (e) y *fracción enriquecida en ω -gliadinas* (f). Las letras griegas, B y C, se refieren a la designación de los grupos de prolaminas de acuerdo a la movilidad electroforética. Los picos sombreados corresponden a bandas rojas en la inspección visual.

1.5.- Discusión.

La elección del solvente de extracción determina la composición y la cantidad de prolaminas recuperadas de la muestra en estudio, lo cual a su vez, incide en gran medida sobre el ensayo cuantitativo. Esto es de especial relevancia en el desarrollo de métodos inmunoquímicos, donde debe obtenerse la mayor recuperación de las proteínas reconocidas por los anticuerpos empleados.

Dado que los solventes acuosos extraen además de gliadinas, proteínas de la *fracción albúminas-globulinas* (Wieser y col., 1994), en todo análisis del proceso de extracción se requiere eliminar, por lavado con solución de NaCl 0,15 M, proteínas de dicha fracción. En este sentido, el análisis cuali y cuantitativo de los extractos obtenidos con distintos solventes mostró

variabilidad no sólo en cuanto a la cantidad de proteína total extraída, sino que también, en la composición de gliadinas.

La composición de los extractos obtenidos con distintos solventes mostró diferencias importantes (en especial, en la región de ω -gliadinas), resultando los extractantes más aptos: etanol 70%, 1-propanol 50% y urea 1 M (**figura 1.1**).

La cuantificación proteica de los extractos mostró que etanol 70% y 1-propanol 50%, son los solventes más eficientes (**Tabla 1.1**).

De acuerdo a estos resultados, etanol 70% y 1-propanol 50% son los solventes de elección, pues permiten la mayor recuperación de prolaminas de todos los grupos. Etanol 40%, en cambio, presentó una menor eficiencia de extracción. La concentración proteica de los extractos obtenidos con este solvente fue menor de 2 mg/ml (resultado no mostrado).

Hill y Skerritt (1990), emplearon como solventes de extracción: etanol 40% y 70%, 2-propanol 55%, urea 1 M, HCl 0,001 M y ácido acético 0,01 M. Si bien, encontraron algunas diferencias cualitativas en los extractos obtenidos, éstas eran menos marcadas para las ω -gliadinas, que las aquí descritas. En dicho estudio, también se analizaron 2-cloroetanol 25%, acetonitrilo 50% y mezcla cloroformo-metanol 1:1, pero estos solventes resultan de menor utilidad pues extraen en mayor proporción HMW-gluteninas. Estos autores consideran que etanol 40% es el solvente de elección. Este es el solvente empleado en el método de cuantificación de gliadinas adoptado por la Association Official Analytical Chemist (AOAC) (Skerritt y Hill, 1991).

Wieser y col. (1994), analizaron mediante RP-HPLC, la extracción de gliadinas posteriormente a la eliminación de la *fracción albúminas-globulinas*. En todos los casos, los extractos se componen de gliadinas y en menor proporción de albúminas y globulinas. Encontraron que el mejor rendimiento de extracción de gliadinas es obtenido con etanol 60% y 1-propanol 50%. Las diferencias con respecto a etanol 70% no son significativas, mientras que es menor la cantidad de gliadinas extraídas cuando se emplea etanol 40%.

El Coomassie Brilliant Blue R-250 es el colorante más empleado para la tinción de proteínas separadas por PAGE. La interacción de las proteínas con este colorante origina bandas de color azul, sin embargo, se encontraron proteínas cuya tinción es rojiza. Este cambio en la coloración, llamado efecto metacromático, fue primero descrito visual y espectrofotométricamente en colágeno y procolágeno (Micko y Schlaepfer, 1978; McCormick y col., 1979), luego se detectó en algunas histonas (Duhamel y col., 1980) y también, fue observado en triticale (Lupano y Añón, 1985). Todos estos estudios fueron

realizados en proteínas resueltas por SDS-PAGE. En este trabajo, el efecto metacromático fue observado cuando las prolaminas de trigo, cebada y centeno, fueron separadas por SDS-PAGE y A-PAGE.

El efecto metacromático observado en colágeno, fue atribuido a la interacción entre las moléculas del colorante y sitios específicos en la proteína, formados por estructuras repetitivas conteniendo prolina cada tres aminoácidos (Micko y Schlaepfer, 1978; McCormick y col., 1979). En el caso de las histonas, se postuló que el efecto ocurría como consecuencia de la interacción entre complejos de moléculas de colorante y estructuras con prolina regularmente espaciadas (Duhamel y col., 1980). Histonas, colágeno y las prolaminas de trigo, cebada y centeno, presentan un alto contenido de prolina, la que a su vez forma parte de secuencias repetitivas.

Con el fin de obtener un registro densitométrico que evidencie la presencia de componentes metacromáticos, se eligió un registro por doble haz, con haz de lectura a 525 nm y haz de referencia a 625 nm, longitudes de onda seleccionadas de acuerdo al espectro de absorción mostrado en la **figura 1.4A**. Esto permitió una rápida localización y fácil evaluación de los picos correspondientes a las bandas rojas en PAGE.

Debe mencionarse que en ocasiones, cuando por inspección visual se observa que el color de la banda es violáceo y claramente diferente del azul, este efecto no puede ser detectado espectrofotométricamente como una banda roja. Si bien no existe una explicación a este efecto, debe tenerse en cuenta que en una banda de proteína en un gel es posible encontrar componentes metacromáticos y ortocromáticos, originando que el color observado no sea rojo ni azul, sino magenta. En este sentido, otros autores indicaron que en ocasiones no pudieron obtener un registro fotográfico coincidente con lo observado por inspección visual (Duhamel y col., 1980).

El análisis por SDS-PAGE de extractos de proteínas totales de trigo, cebada y centeno, muestra bandas que presentan efecto metacromático en grupos homólogos de proteínas: HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas y en ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas (figuras 1.3, 1.5 y 1.6). En cambio, bajo las mismas condiciones experimentales, no se observó efecto metacromático cuando se analizó el extracto de proteínas totales de avena (figura 1.3).

El análisis por A-PAGE mostró que los componentes metacromáticos se encuentran en la región de baja movilidad electroforética, correspondiente a: ω -gliadinas, C-hordeínas, ω -secalinas (Figuras 1.5 y 1.6). Este efecto es más intenso cuando se analiza el registro densitométrico de la fracción enriquecida en ω -gliadinas (figura 1.6).

Trigo, cebada y centeno, son especies evolutivamente relacionadas, que presentan grupos de proteínas con alto grado de homología (Shewry y col., 1986; Shewry y Tatham, 1990; Kreis y col., 1985). Esta homología es observada en el extremo N-terminal de ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas (Kasarda y col., 1983), y en HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas (Shewry y col., 1988), así como también en algunas de las prolaminas ricas en azufre: γ -gliadinas, γ -hordeínas y γ -secalinas (Shewry et al. 1985). Cerca del extremo N-terminal, las prolaminas de trigo, cebada y centeno, presentan, una extensa región repetitiva formada por unidades de secuencia que incluyen principalmente prolina y glutamina (Kasarda y col., 1984; Shewry y col., 1986). En avena, donde no se detectaron bandas rojas, el contenido de prolina es menor y las secuencias repetitivas encontradas difieren marcadamente de las presentes en las prolaminas de trigo, cebada y centeno (Wieser y Belitz, 1989). La hipótesis planteada para histonas (Duhamel y col., 1980) es compatible con los resultados aquí presentados.

Las unidades repetitivas son conservadas aunque presentan algunas variaciones en secuencia y longitud (5 a 9 residuos). Estas secuencias forman una estructura denominada " β -reverse turns" y la repetición lleva a la conformación denominada " β -spiral". HMW-gluteninas y ω -gliadinas, y las proteínas homólogas en cebada y centeno presentan estructuras ricas en " β -reverse turns" (Tatham y col., 1985a; Tatham y col., 1985b; Halford y col., 1992). En γ -gliadinas pueden formarse regiones con estructura " β -spiral" de manera similar que en ω -gliadinas, aunque en menor extensión. Esto puede relacionarse con el hecho de que sólo dos de los cultivares analizados presentan una única banda metacromática en γ -gliadinas (figura 1.5).

Cabe destacar que en cambio, no se observó metacromasia en α - o β -gliadinas, prolaminas donde las secuencias repetitivas están irregularmente distribuidas y separadas por regiones α -hélice, las que interfieren con la formación de regiones con conformación " β -spiral" (Tatham y col., 1985c; Tatham y col., 1987; Tatham y Shewry, 1991).

Las prolaminas separadas por SDS-PAGE tienen una movilidad electroforética menor a la esperada de acuerdo a su masa molecular (Shewry y col., 1986). Se ha sugerido que tal comportamiento es el resultado de regiones repetitivas con alto contenido de prolina, las que interfieren la unión del SDS. Se encontró que agentes desnaturizantes fuertes, como urea, permiten obtener las movilidades esperadas (Goldsbrough y col., 1989).

Se observó que las prolaminas presentan metacromasia aún cuando el análisis por SDS-PAGE se realiza en presencia de urea 6 M o A-PAGE con urea 2 M, sin embargo, a pesar del efecto de la urea, no puede asegurarse una desnaturización completa (Dill y Shortle, 1991).

Por lo tanto, no ha sido posible determinar si el efecto metacromático surge de la interacción del colorante y una conformación especial determinada por estos tipos de secuencias o si, simplemente, la estructura primaria repetitiva es suficiente.

Aunque el efecto metacromático ha sido empleado para identificar proteínas tipo colágeno (McCormick y col., 1979), impurezas presentes en las preparaciones comerciales pueden ser responsables de tal fenómeno (Wilson, 1992). Uno de estos contaminantes es responsable de la coloración rojiza obtenida en una proteína rica en prolina, denominada rubrofilina (Rosenthal y col., 1988). A pesar de que no es posible descartar esta hipótesis, debe tenerse presente que además de

este estudio, autores ya mencionados observaron comportamiento metacromático y determinaron un corrimiento en el espectro del complejo CBB R-250/proteína, empleando diferentes muestras proteicas y partidas comerciales de CBB R-250.

Independientemente del origen del cambio de color, éste ha sido observado de manera reproducible, y ha permitido la identificación de las prolaminas con comportamiento metacromático.

Este efecto fue observado en componentes homólogos de trigo, cebada y centeno, pertenecientes a prolaminas "S-pobres": ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas, y a HMW-prolaminas: HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas, respectivamente.

2.- Separación de prolaminas mediante FPLC de intercambio catiónico.

2.1.- Optimización de la separación de gliadinas mediante FPLC.

Con el objeto de disponer de prolaminas, y en particular de gliadinas, con alto grado de pureza y en cantidades suficientes para el desarrollo de métodos inmunoquímicos, se desarrolló un método de separación por FPLC de intercambio catiónico. Cabe destacarse que esta metodología no había sido aplicada a la separación de prolaminas al momento de comenzar este

estudio, razón por la cual, fue necesario optimizar las condiciones de elución para lograr una alta resolución.

La separación de gliadinas por FPLC de intercambio catiónico fue realizada en una columna analítica (Mono-S) empleando un buffer ácido cítrico-citrato de sodio, pH=3 (protocolo 7.1). En la **figura 2.1** se observa el perfil de elución de gliadinas de trigo del cultivar INTA La Paz.

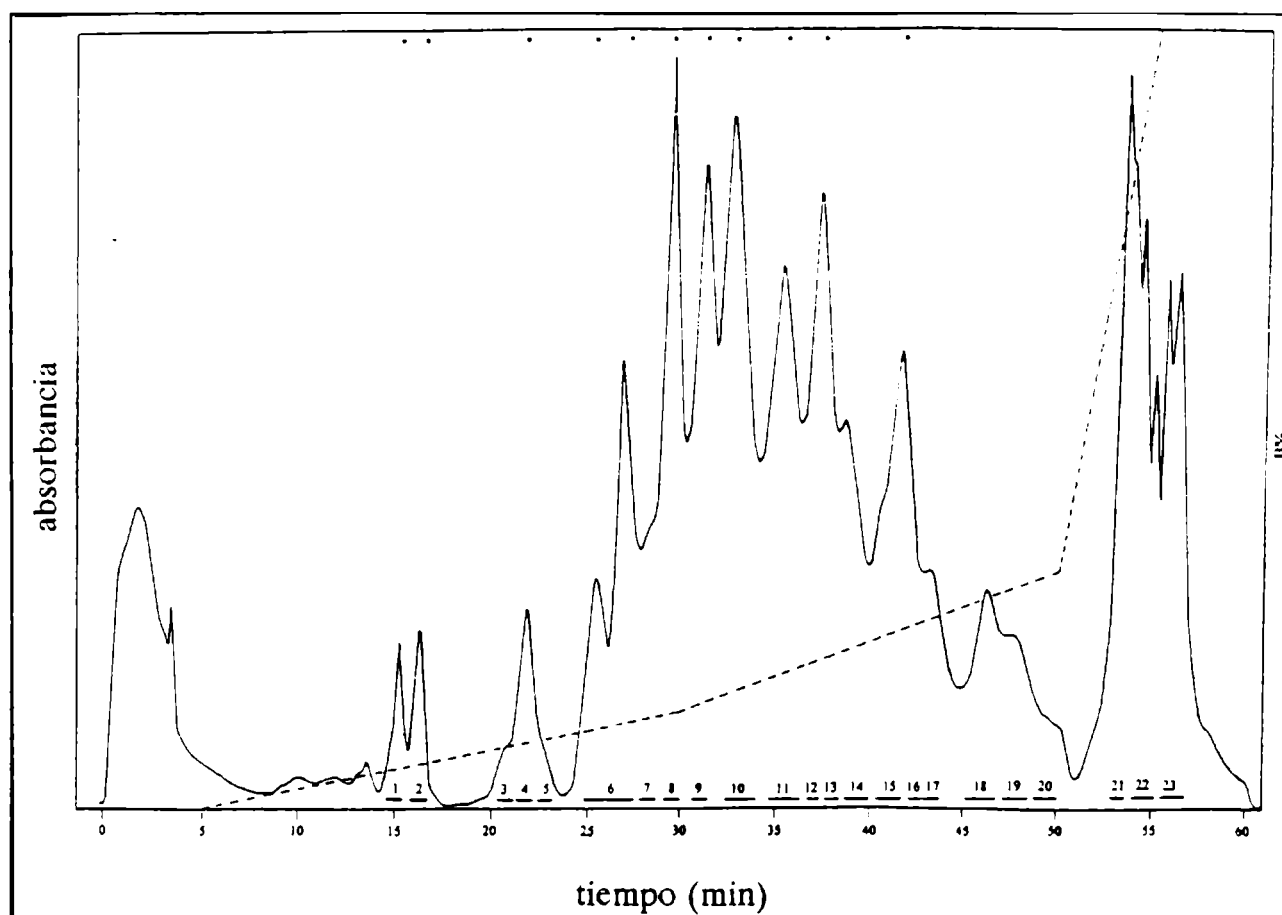


Figura 2.1. Perfil de elución de gliadinas del cultivar INTA La Paz resuelto por FPLC de intercambio catiónico. Se inyectaron 4 mg de extracto de gliadinas en una columna Mono-S, con un flujo de 1 ml/min y un volumen de fracción de 1 ml. Las líneas de trazos indican el gradiente de concentración salina como porcentaje de buffer B (NaCl 0,8 M): 0%, 0-5 min ; 0-12% 5-30 min; 12-30%, 30-50 min; 30-100%, 50-55 min y 100% 55-60 min. La elución fue monitoreada por lectura de absorbancia a 280 nm con una sensibilidad de 0.2 AUFS (ordenadas). El símbolo (•) indica los picos usados para calcular el coeficiente de variación de los tiempos de retención.

Aunque la capacidad máxima de la columna Mono-S es de 25 mg de proteína, debido a la baja solubilidad de las gliadinas y su tendencia a la formación de agregados, fenómenos que conducen a una disminución de la resolución, no resulta conveniente la inyección de cantidades de proteínas superiores a los 5 mg. Por ello, la cantidad de proteína recuperada en cada una de las fracciones, a partir de una siembra de aproximadamente 4 mg, fue demasiado baja para estudios de composición por electroforesis. Por lo tanto, para poder optimizar la elución, fue necesario realizar varias corridas sucesivas de la misma muestra, verificar que el perfil de elución fuera el mismo, y luego juntar las fracciones correspondientes. Cada fracción, proveniente de varias corridas, fue liofilizada, luego disuelta en ácido acético 0,01 M y analizada simultáneamente por SDS-PAGE y A-PAGE.

Las condiciones de elución optimizadas permitieron obtener una alta resolución de todos los grupos de gliadinas, produciendo aproximadamente 25 picos (**figura 2.1**). La elución mostró ser altamente reproducible, con sólo mínimas diferencias de intensidad en algunos picos. El coeficiente de variación promedio de los tiempos de retención de siete corridas sucesivas de los once picos indicados en la **figura 2.1**, fue 0,52%, lo que verifica la alta reproducibilidad de esta separación.

Todas las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE y A-PAGE. Las fracciones contiguas que mostraron tener la misma composición, por análisis en ambos tipos de electroforesis, fueron juntadas. Se obtuvieron así, 23 fracciones de composición diferente. En la **figura 2.2**, se muestra el análisis por SDS-PAGE y A-PAGE de estas fracciones, las que corresponden a las fracciones numeradas en la **figura 2.1**.

El orden de elución está, en términos generales, de acuerdo a las movilidades observadas en A-PAGE. Las primeras fracciones eluidas (componentes débilmente retenidos en la columna), contienen componentes que no son gliadinas. Las ω -gliadinas eluyeron antes de los 23 min, resultado que es concordante con el obtenido, en cromatografía convencional, por Popineau y col. (1986), quienes observaron que un pequeño incremento de fuerza iónica (0,07 M) es suficiente para eluir las ω -gliadinas. El análisis por SDS-PAGE y A-PAGE (**figura 2.2**) mostró que las fracciones 1 a 5, que son diferentes de una a otra, están compuestas principalmente de ω -gliadinas con mínimas cantidades de contaminantes.

Como fuera descrito por otros autores (Larré y col., 1991), cuando se incrementa la fuerza iónica, la separación no resulta tan eficiente y en una misma fracción, pueden detectarse componentes de más de un grupo de gliadinas (por ej.,: la fracción 8 contiene α -, β - y ω -gliadinas y la fracción 10 contiene α -, β - y γ -gliadinas). Aún así, la elución optimizada ha permitido disponer de al menos una fracción compuesta de gliadinas de un solo grupo, con mínimas cantidades de contaminantes, como se observa en la **figura 2.2**, en: γ -gliadinas, calle 6; β -gliadinas, calle 7 y α -gliadinas, calle 17.

Las fracciones 18 a 20 contienen componentes de todos los grupos de gliadinas. Se observa, por análisis por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, que las fracciones 21 a 23 (material fuertemente unido a la columna), contienen una mezcla de gliadinas y gluteninas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Popineau y col., 1986; Larré y col., 1991).

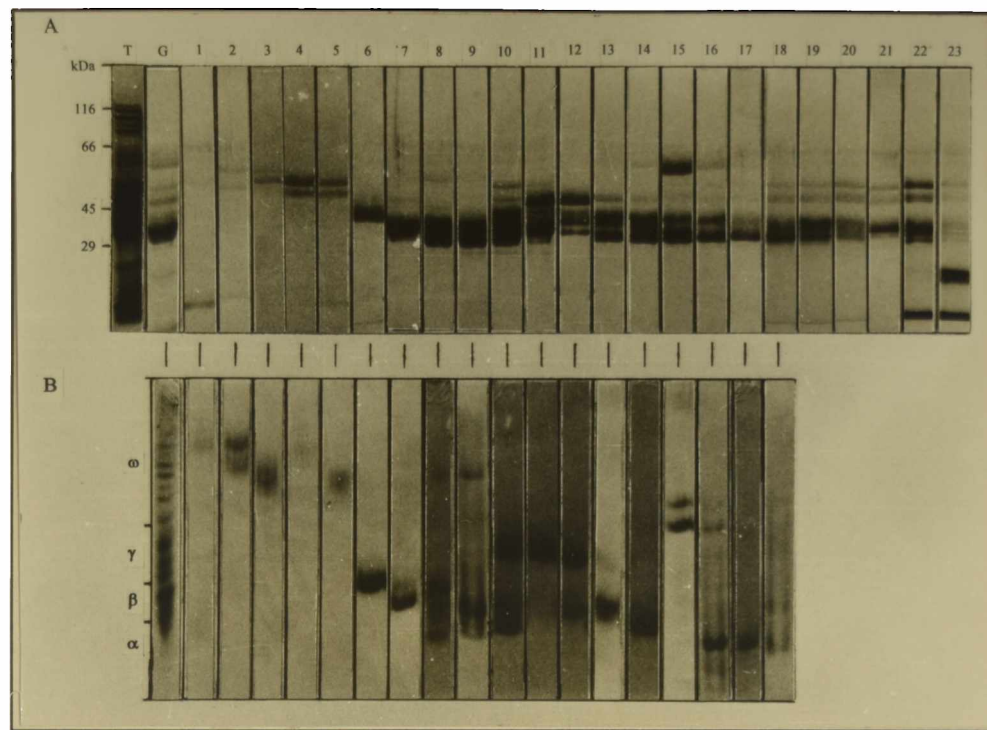


Figura 2.2. Análisis por electroforesis de las fracciones de gliadinas separadas por FPLC de intercambio catiónico. A- SDS-PAGE y B- A-PAGE. T: fracción proteínas totales de trigo. G: muestra sembrada en la columna. Los números de las fracciones corresponden a los de la figura 2.1.

Se analizó, en las condiciones de elución descritas, gliadina comercial (Sigma). El perfil de elución obtenido fue similar al mostrado en la **figura 2.1**, sin embargo, existe una marcada pérdida de resolución en la porción central de la elución, existiendo proporcionalmente mayor cantidad de material no retenido y de material fuertemente retenido en la columna. Este resultado podría ser compatible con el obtenido con una muestra proteica alterada o modificada respecto a sus características nativas (agregación parcial, desnaturalización, etc.), fenómenos que pueden ocurrir durante su producción (resultado no mostrado).

2-2.- Separación de hordeínas y secalinas.

Los mejores resultados en la separación de prolaminas de cebada y centeno, por FPLC de intercambio catiónico, fueron obtenidos empleando un procedimiento similar al optimizado para la elución de gliadinas. En la **figura 2.3**, se observa que la separación de hordeínas y secalinas

se logra en un tiempo de 25 min. Tiempos de corrida mayores (hasta 60 min) no mejoraron la resolución. Cebada y centeno, comparando con trigo, presentan un menor número de componentes proteicos, con un perfil de elución más simple.

En la **figura 2.4**, se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas a partir de las prolaminas de cebada y centeno. En ambos casos, el primer pico no contiene hordeínas ni secalinas. En la **figura 2.4A**, las fracciones 1 a 6 contienen, como componentes principales, diferentes B- y C-hordeínas. Las fracciones 7 a 9 (componentes eluidos a alta fuerza iónica) son una mezcla de B-, C- y D-hordeínas.

En la separación de secalinas (**figura 2.4B**), se obtuvo un menor número de fracciones diferentes. De acuerdo a sus M_r , las fracciones 1 y 2 están principalmente formadas por ω - y γ -secalinas. Las fracciones 3 y 4 están compuestas de una mezcla de varias secalinas.

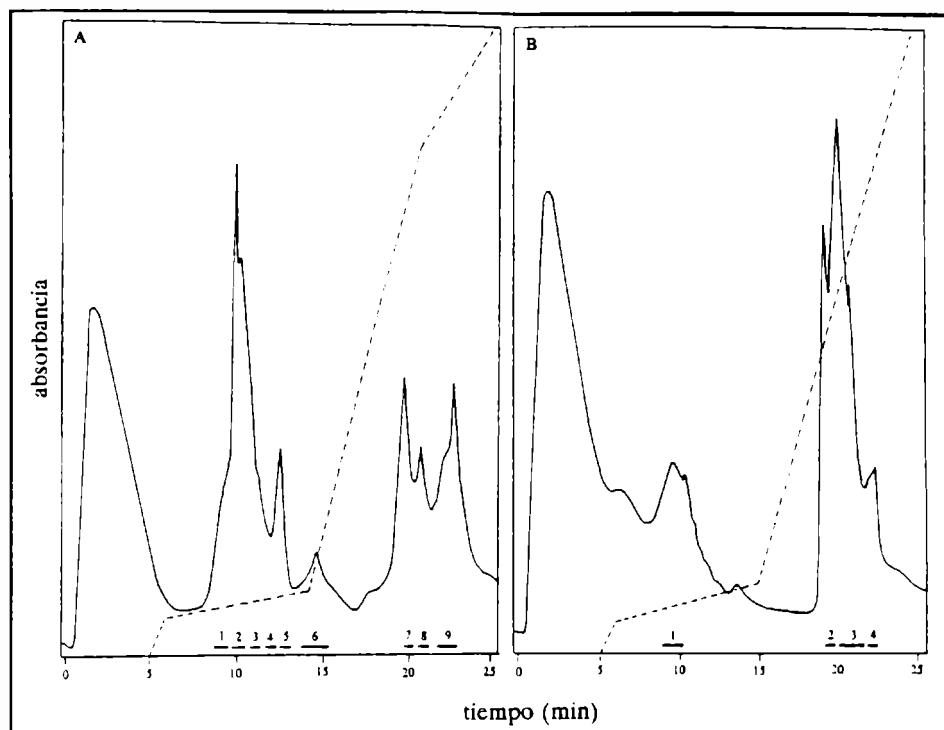


Figura 2.3. Separación por FPLC de prolaminas de cebada y centeno. Perfil de elución de **A-** hordeínas y **B-** secalinas, resueltos por FPLC de intercambio catiónico en columna Mono-S, con un flujo de 1 ml/min y un volumen de fracción de 1 ml. Las líneas de trazos indican el gradiente de concentración salina como porcentaje de buffer B (NaCl 0,8 M). La elución fue monitoreada por lectura de absorbancia a 280 nm con una sensibilidad de 0.2 AUFS (ordenadas). **A-** Proteína sembrada, 0,8 mg. Gradiente: 0%, 0-5 min; 0-6%, 5-6 min; 6-10%, 6-15 min; 10-80%, 15-22 min; 80-100%, 22-25 min; 100% 25-30 min. **B-** Proteína sembrada, 1,6 mg. Gradiente: 0%, 0-5 min; 0-6%, 5-6 min; 6-11%, 6-15 min; 11-100%, 15-25 min; 100%, 25-30 min.

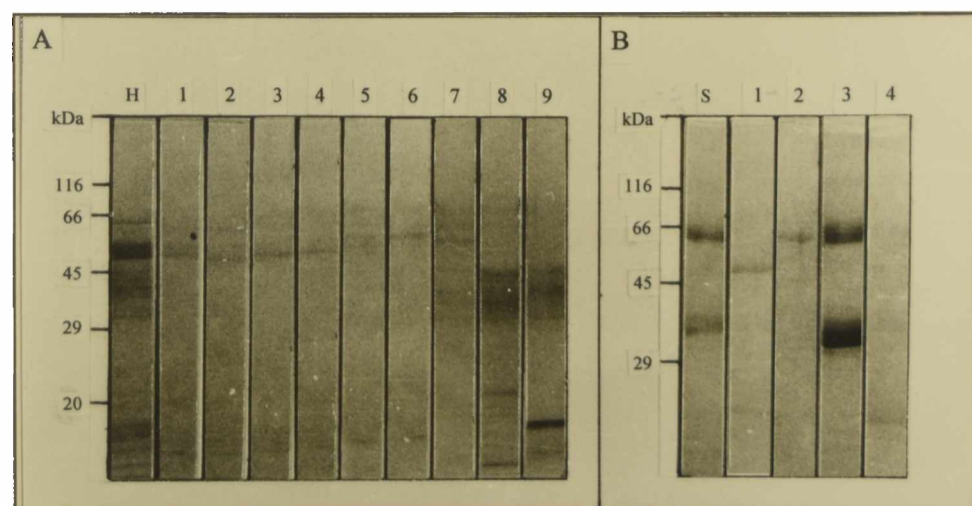


Figura 2.4. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de prolaminas de cebada y centeno separadas por FPLC de intercambio catiónico en Mono-S. **A-** hordeínas y **B-** secalinas. H y S: muestras de hordeínas y secalinas sembradas en la columna, respectivamente. Los números de las fracciones corresponden a los de la figura 3.

2.3.- FPLC preparativo.

Con el objeto de disponer de mayor cantidad de gliadinas purificadas se utilizó una columna XK-16/40 rellena con gel de S-Sepharosa.

Se emplearon las mismas condiciones de elución que en la columna analítica, inyectando aproximadamente 35 mg de proteína.

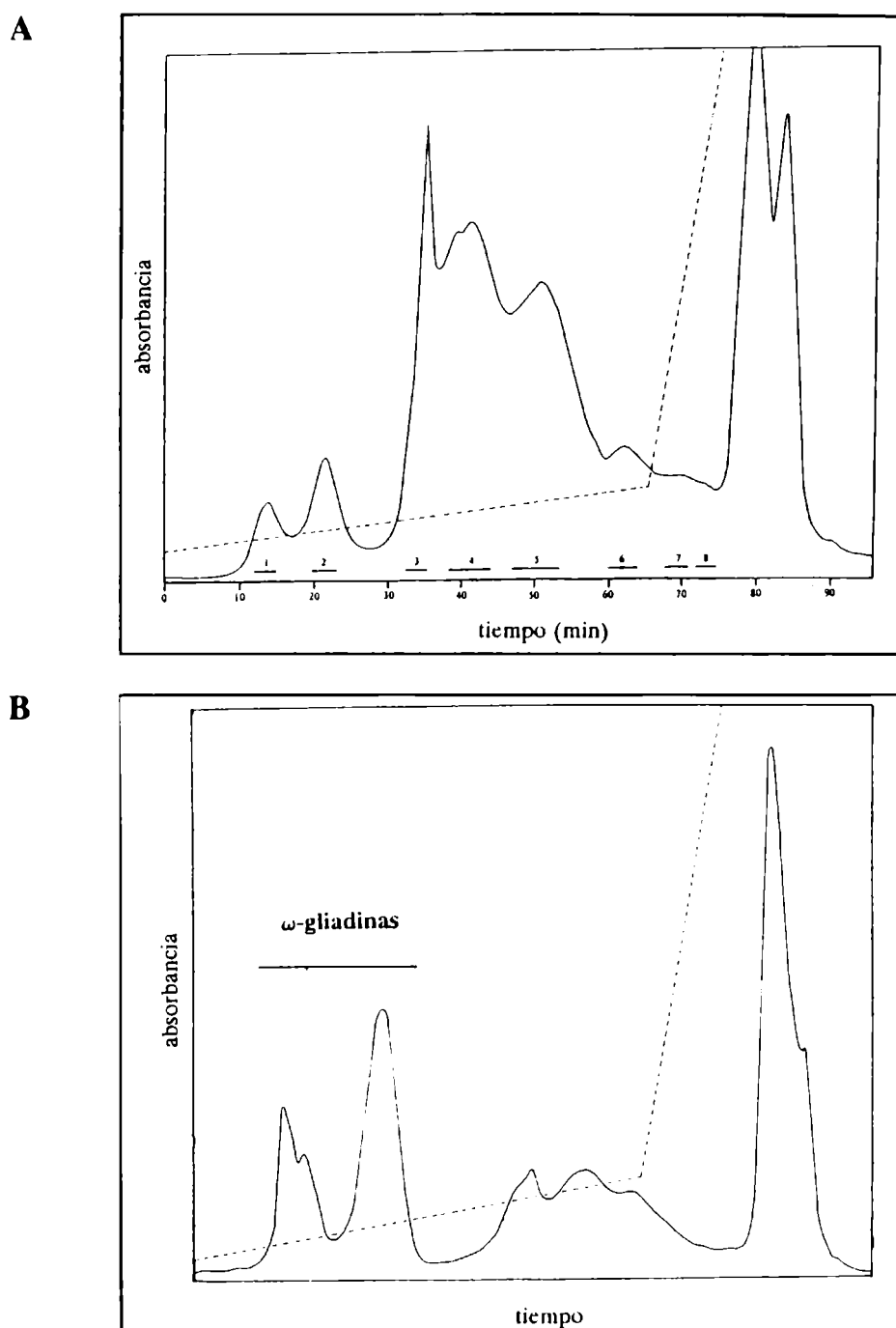


Figura 2.5. FPLC de intercambio catiónico preparativo. Separación en una columna rellena con S-Sepharosa (60 ml). **A-** Extracto de gliadinas, proteína sembrada: 35 mg. **B-** Fracción enriquecida en ω -gliadinas, proteína sembrada: 5 mg. Flujo: 4 ml/min, volumen de fracción: 4 ml. Las líneas de trazos indican el gradiente de concentración salina como porcentaje de buffer B (NaCl 0,8 M): 6-17%, 0-65 min; 17-100%, 65-75 min; 100%, 75-90 min. La elución fue monitoreada por lectura de absorbancia a 280 nm (sensibilidad 0.2 AUFS).

Como se observa en la **figura 2.5A**, la elución se realizó en un tiempo mucho menor a los empleados en cromatografía convencional, aunque la resolución alcanzada es menor que la obtenida en la columna Mono-S.

En el análisis por SDS-PAGE, se observó que los dos primeros picos contienen ω -gliadinas, mientras que las demás fracciones contienen diferentes mezclas de α -, β - y γ -gliadinas (resultado no mostrado).

Dado que por extracción secuencial se dispone de la *fracción enriquecida en ω -gliadinas*, se empleó esta muestra como material de partida para una purificación de ω -gliadinas en columna preparativa. El perfil de elución obtenido en la **figura 2.5B**, muestra una buena recuperación de ω -gliadinas.

2-4.- Análisis de diferentes cultivares de trigo por FPLC.

Las condiciones optimizadas para la separación de gliadinas por FPLC en una columna Mono-S, fueron empleadas para el análisis de ocho cultivares de trigo: Staparka, Buck Bagual, Buck Pucará, INTA Marcos Juarez, Buck Fogón, Buck Catriel, ProINTA Pigue y ProINTA Oasis

En la **figura 2.6**, se muestran los perfiles de elución obtenidos. Si se comparan, por ejemplo, los perfiles de elución de los cultivares a, c y g, se observan claras diferencias entre ellos. A su vez, cuando se los compara en conjunto, estos presentan un mayor contenido de componentes proteicos que eluyen en la primer mitad del cromatograma, que los otros cinco cultivares. De igual manera, diferencias cuali y cuantitativas significativas, entre los ocho cultivares analizados, pueden ser fácilmente detectadas.

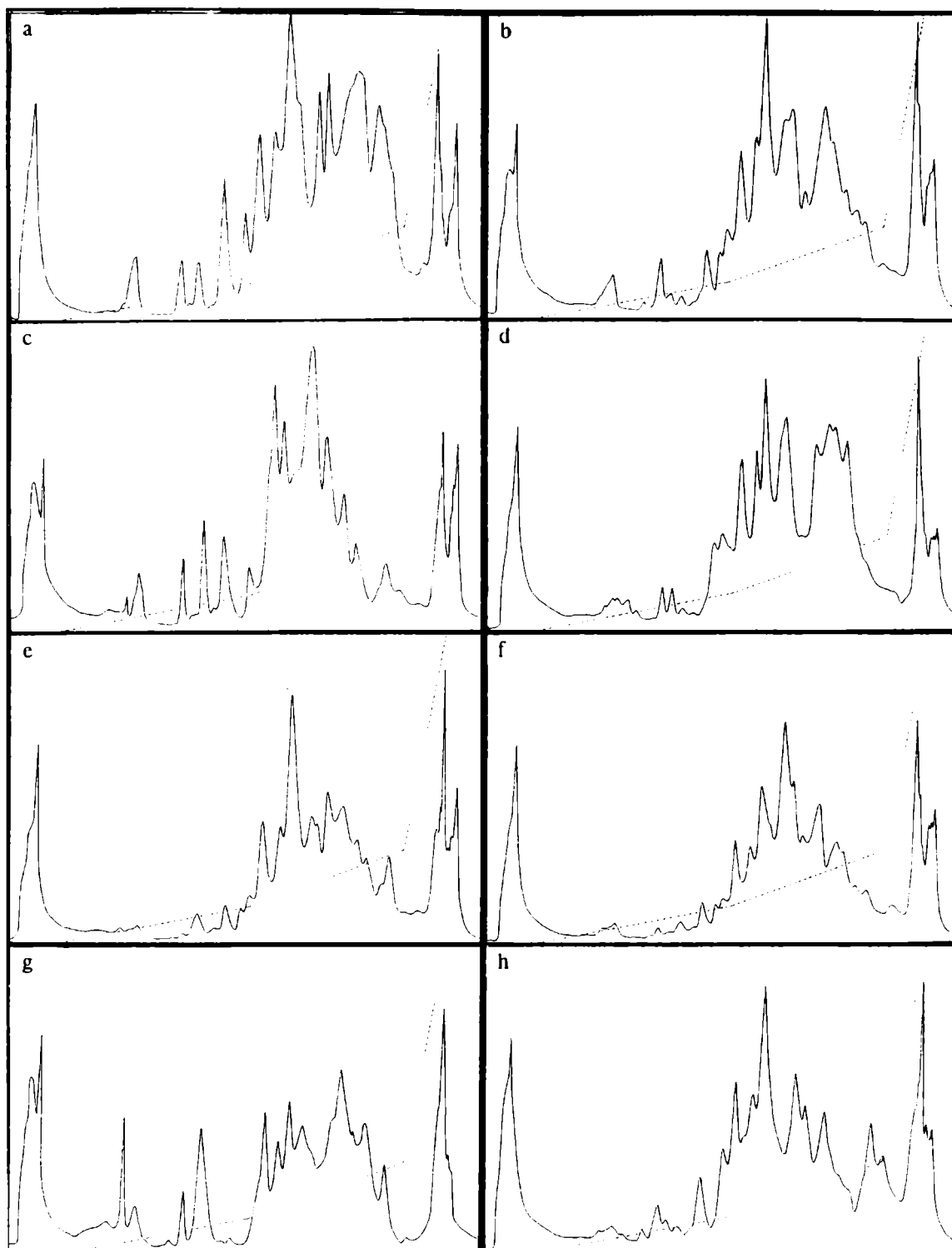


Figura 2.6. Comparación de los perfiles de elución de FPLC de intercambio catiónico de ocho cultivares de trigo. Se analizaron los extractos de gliadinas de los cultivares: (a) Staparka, (b) Buck Bagual, (c) Buck Pucará, (d) INTA Marcos Juarez, (e) Buck Fogón, (f) Buck Catriel, (g) ProINTA Pigue, (h) ProINTA Oasis. Las condiciones de elución son las mismas que en la figura 2.1. En todos los casos se sembraron aproximadamente 4 mg de proteína muestra.

2.5.- Discusión.

El aislamiento y purificación de las prolaminas se ha visto dificultado principalmente por la alta homología que presentan estas proteínas, lo que complica su separación o la recuperación selectiva, en pocos pasos, de cada una de ellas.

Se han empleado varios sistemas de cromatografía convencional (Huebner y Rothfus, 1968; Patey y Evans, 1973; Charbonnier y Mossé, 1980) y más recientemente RP-HPLC (Bietz, 1985 y 1986). Esta última, ha sido la técnica analítica de elección, pero es poco útil cuando se desea disponer de cantidades del orden de los mg de prolaminas nativas aisladas, lo cual limita los estudios fisicoquímicos e inmunoquímicos con proteínas puras.

El uso de sistemas cromatográficos que trabajan a presiones menores al HPLC, ha permitido mejorar la resolución obtenida en cromatografía convencional empleando además, menores tiempos de elución. El FPLC de intercambio iónico ha sido empleado por otros autores, para separar gliadinas en intercambio aniónico (Batey, 1984) y catiónico (Larré y col., 1991). En este trabajo, se ha optimizado una condición de elución que permite la separación de gliadinas con mayor resolución que la lograda previamente.

La separación de gliadinas por FPLC en columna Mono-S desarrollada ha permitido obtener un perfil de elución con más de 20 picos bien resueltos. Dado que las gliadinas constituyen un sistema proteico complejo, para la identificación de las fracciones eluidas de la cromatografía es necesario un análisis en paralelo por electroforesis en SDS-PAGE y A-PAGE. Como puede observarse en la **figura 2.2**, se obtuvieron 23 fracciones de composición diferente. Se logró un buen aislamiento de varias

ω -gliadinas y al menos tres fracciones que, a juzgar por los estudios electroforéticos, contienen α -, β - o γ -gliadinas con bajas cantidades de contaminantes.

El análisis de la elución de gliadina comercial (Sigma) en columna Mono-S, es indicativo de una muestra que fue posiblemente alterada o modificada en sus propiedades nativas durante su producción. Este resultado es de relevancia ya que la gliadina comercial (Sigma, en este caso) es una fuente de antígenos ampliamente usada en sistemas inmunoquímicos.

La masa de gliadinas inyectada en la columna Mono-S fue de 4 mg, aunque la carga máxima en esta columna es de 25 mg, las características fisicoquímicas de las prolaminas hacen que un aumento en la cantidad de proteína sembrada conduzca a una pérdida de resolución.

Por lo tanto, con la intención de disponer de mayores cantidades de gliadinas aisladas se optimizó la separación en una columna preparativa rellena con 60 ml de gel de S-Sepharosa.

Si bien la resolución obtenida fue menor que en la columna analítica (**figura 2.5A**), este procedimiento permitió recuperar ω -gliadinas y puede ser empleado como primer paso en un esquema de purificación de α -, β - y γ -gliadinas. Además, el uso de la *fracción enriquecida en ω -gliadinas* permitió, en pocos pasos de aislamiento, disponer de ω -gliadinas aisladas (**figura 2.5B**).

Por otro lado, empleando condiciones de elución similares a las optimizadas para la purificación de gliadinas, se logró la separación de hordeínas y secalinas. Si bien el número de componentes aislados fue mucho menor que para gliadinas, esta metodología mostró que también puede ser empleada para la purificación de prolaminas de cebada y centeno (**figuras 2.3 y 2.4**).

Verificada la reproducibilidad de la separación de gliadinas, se estudió si el procedimiento de FPLC de intercambio catiónico desarrollado podía ser de utilidad en la caracterización de cultivares de trigo. Dado que la composición proteica de los diferentes cultivares de trigo analizados es similar, los perfiles de elución obtenidos fueron semejantes. Sin embargo, es evidente que cada cultivar presenta características únicas. Las condiciones optimizadas, a diferencia de las ya publicadas (Larré y col., 1991), presentan una mayor resolución con un alto número de picos, lo que aumenta la capacidad de detectar diferencias entre cultivares (**figura 2.6**).

Si bien esta metodología es de menor resolución que el RP-HPLC (Bietz, 1985 y 1986), las diferencias encontradas entre las gliadinas de los nueve cultivares de trigo estudiados y la reproducibilidad del sistema, indican que la separación por FPLC de intercambio catiónico aquí descrita puede ser de utilidad en una primera caracterización de cultivares.

La separación de prolaminas obtenida permite disponer de componentes purificados para su empleo en métodos inmunoquímicos selectivos, tanto en técnicas cuantitativas, como en el estudio de la reactividad de AcMo y en el análisis de anticuerpos séricos de enfermos celíacos.

3.- Optimización de un ELISA competitivo con anticuerpos policlonales para la cuantificación de prolaminas.

3.1.- Preparación y evaluación de la solución estandar de gliadinas.

3.1.1.- Preparación de la solución estandar.

Con el objeto de disponer de una solución de gliadinas estable y de concentración exactamente conocida, que permitiera su utilización de manera confiable en métodos inmunoquímicos de cuantificación de prolaminas, se optimizó la preparación del estandar a partir de gliadina de origen comercial.

Debido a su baja solubilidad y tendencia a la formación de agregados, se procedió a disolver gliadina comercial en etanol 70% a una concentración aproximada de 2 mg/ml. Bajo estas condiciones, se forman agregados que no pueden ser completamente disueltos. Esta preparación fue filtrada sucesivamente, por papel Whatman N°1 y luego, sucesivamente, por membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm y 0,22 μm . Finalmente, se logró obtener una solución límpida que, almacenada a temperatura ambiente, permanece estable por varios meses. Por el contrario, cuando se almacena a 4 °C, se vuelve turbia rápidamente. La concentración de esta solución fue determinada mediante el método de Kjeldahl (protocolo 5.).

Se analizó también el uso como solvente de ácido acético 0,01 M pues, las gliadinas y en general los liofilizados de prolaminas, se disuelven rápidamente en este medio y además, este solvente es fácilmente compensado por las soluciones "buffers" empleadas en las técnicas inmunoquímicas (una dilución 1/10 en PBS tiene un pH = 7,3). Por esta razón, se preparó, mediante el procedimiento descrito anteriormente, un estandar en ácido acético 0,01 M. Aunque, se obtuvo una solución límpida, ésta mostró ser menos estable en el tiempo, con tendencia a la formación de agregados y más susceptible a la

contaminación.

Por otro lado, se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, la solución estandar del kit aprobado por la AOAC (Cortecs Diagnostic, UK). Al disolver el estandar liofilizado provisto en el kit, en etanol 40%, se obtuvo una solución ligeramente opalescente.

3.1.2.- Evaluación de métodos generales de cuantificación de proteínas aplicados a prolaminas.

En los métodos generales de cuantificación de proteínas es frecuente el empleo de BSA como proteína de referencia. Dado que BSA y gliadinas presentan características estructurales y fisicoquímicas muy diferentes, se evaluó la respuesta de las mismas frente a distintos métodos relativos de cuantificación. Se utilizaron métodos basados en la determinación de una propiedad física intrínseca como absorción de luz y métodos que involucran una propiedad química, tales como la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu o que están basados en la unión de un colorante como el Coomassie Brilliant Blue G-250. Para ello, se prepararon soluciones de BSA y de gliadinas, según el protocolo 6., las que fueron valoradas por el método de Kjeldahl.

La determinación de la absorbancia a 280 nm de soluciones de gliadinas en etanol 70% presentó una respuesta lineal hasta 1,6 mg/ml (resultado no mostrado). Por interpolación, a partir de la recta de regresión ($r=0,988$), se obtuvo un coeficiente de 0,70, para una solución de 1 mg/ml en etanol 70%. Otros autores (Molina y col., 1991), emplearon como coeficiente 0,84, aunque no indican cómo obtuvieron ese valor.

La respuesta obtenida con soluciones de BSA y gliadinas frente a los métodos de Bradford (1976), Peterson (1977) y Lowry y col. (1951) se muestra en la **figura 3.1**.

En el método de Bradford (**figura 3.1A**) la pendiente de la curva de BSA resultó casi tres veces superior a la obtenida para gliadinas (BSA = $9,27 \times 10^{-3}$, Gliadinas = $3,55 \times 10^{-3}$), mientras que con el método de Peterson (**figura 3.1B**) fue prácticamente el doble (BSA = $4,66 \times 10^{-3}$, Gliadinas = $1,98 \times 10^{-3}$). Estos resultados muestran claramente que el uso de BSA como proteína de referencia en la cuantificación de prolaminas es inadecuado. Por otra parte, el valor de la pendiente obtenida en ambos métodos, para gliadinas es demasiado bajo, lo que conduce a una baja precisión en la determinación de la concentración.

La recta obtenida para gliadinas con el método de Lowry (**figura 3.1C**) presenta, respecto a los métodos de Bradford y Peterson, el valor de pendiente más alto (BSA = $7,64 \times 10^{-3}$, Gliadinas = $6,81 \times 10^{-3}$). Por ésta razón, se

considera que de los métodos ensayados, el de Lowry es el más adecuado para la cuantificación de proteínas en extractos de prolaminas, empleando la solución estándar de gliadinas descripta.

En la reacción colorimétrica en el método de Lowry, la presencia de etanol produce turbidez, lo que conduce a una determinación errónea de la absorbancia. Esto es fácilmente corregido si previamente a la lectura espectrofotométrica, las muestras son centrifugadas a $14.000 \times g$ durante 2 min.

Se obtuvieron respuestas similares cuando se analizaron por el método de Lowry soluciones estándar de gliadinas preparadas en ácido acético 0,01 M y en etanol 70% (resultado no mostrado). Esto resultó de utilidad, ya que en general, los extractos o liofilizados de prolaminas fueron disueltos en ácido acético 0,01M y luego cuantificados por Lowry, empleando la solución estándar como referencia.

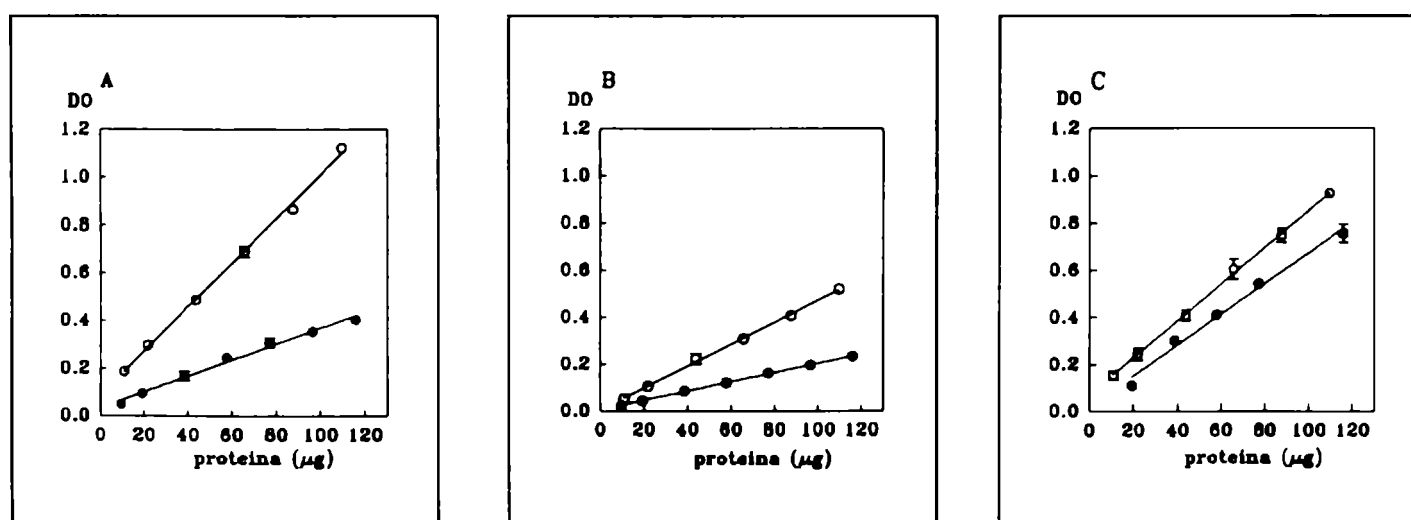


Figura 3.1: Evaluación de métodos relativos de cuantificación de proteínas. Cuantificación de soluciones de BSA (○) y gliadinas (●) estándar por los métodos de: A- Bradford, B- Peterson y C- Lowry. La concentración de cada solución estándar de proteínas fue determinada independientemente por duplicado por el método de Kjeldahl. Los resultados corresponden a las rectas de regresión de los puntos medios de experimentos por duplicado con su correspondiente desviación estándar.

3.2.- Optimización del ELISA competitivo.

3.2.1.- Obtención y caracterización del suero anti-gliadinas.

Se obtuvo un suero anti-gliadinas por hiperinmunización de conejos con gliadina comercial. La especificidad fue analizada por "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* y la *fracción prolaminas* (extraíble en etanol 70%) de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz. El análisis por SDS-PAGE muestra la complejidad de la *fracción proteínas totales* y la *fracción prolaminas* de los vegetales estudiados, fracciones compuestas por un alto número de componentes con Mr. que se encuentran entre 10 kDa y 100 kDa, aproximadamente (**figura 3.2 A y B**, panel superior). En el caso de maíz y arroz, la cantidad de proteína extraíble con etanol 70%, luego de

eliminar la *fracción albúmina-globulina*, es muy baja.

El análisis por "immunoblotting" (**figura 3.2 A y B**, panel inferior) muestra que el suero presenta buen reconocimiento de las prolaminas de trigo, cebada, centeno y triticale (calles 1, 2, 3 y 4, respectivamente). En el caso de trigo (calle 1), se observa reconocimiento de las proteínas correspondientes a las regiones de movilidad electroforética de α -, β - y γ -gliadinas, ω -gliadinas y HMW-gluteninas, (el reconocimiento de α -, β -, γ - y ω -gliadinas fue confirmado por "immunoblotting" de gliadinas resueltas por A-PAGE, **figura 4.7**). La reactividad frente a proteínas de avena resultó baja (calle 5) y no se observó reconocimiento de proteínas de soja, maíz ni arroz (calle 6, 7 y 8, respectivamente).

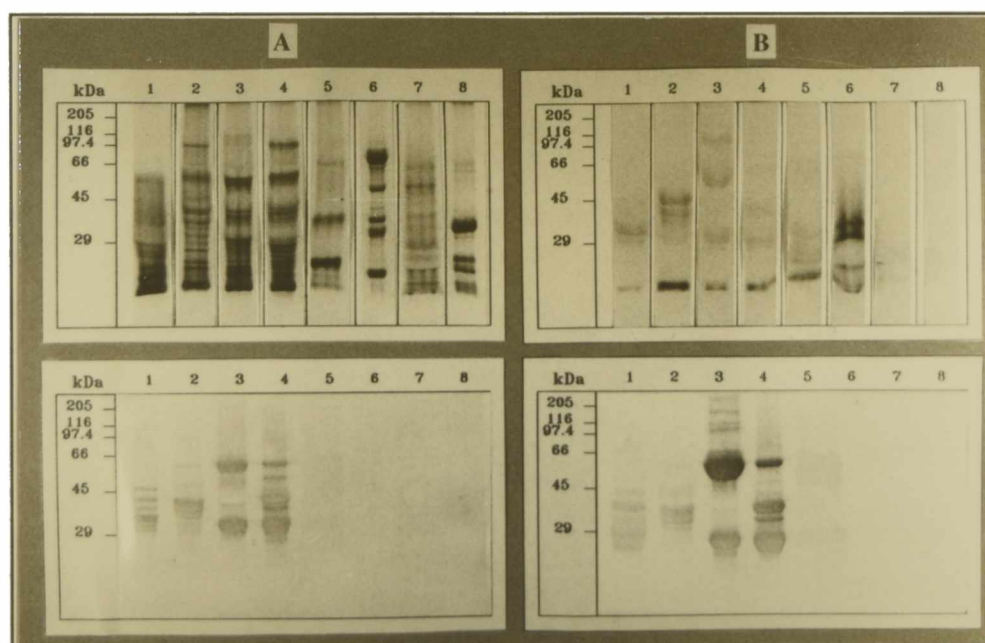


Figura 3.2: Estudio de la especificidad del suero de conejo anti-gliadinas. Análisis por SDS-PAGE (10-15%)(panel superior) e "immunoblotting" frente al suero de conejo (panel inferior), de extractos de proteínas totales (**A**) y *fracción prolaminas* (**B**) de: trigo (1), cebada (2), centeno (3), triticale (4), avena (5), soja (6), maíz (7) y arroz (8).

3.2.2.- Optimización de las etapas del ensayo.

Para la puesta a punto del ELISA competitivo secuencial se analizaron todas las etapas del ensayo en el siguiente orden:

- *Titulación del antisuero y elección de la dilución de trabajo.*

- *Competición con gliadina en fase sólida.*

- *Interacción antígeno-anticuerpo en fase fluida. Preincubación.*

- *Concentración de gliadina en la sensibilización.*

- *Titulación del antisuero y elección de la dilución de trabajo.* La sensibilización de la placa fue realizada durante 16 h a 4 °C con tres concentraciones de gliadina: 0,1, 1 y 10 µg/ml. En la **figura 3.3A**, se observa que el suero presenta alta actividad, las diluciones de trabajo óptimas se encuentran en el rango de 1/100.000 a 1/200.000. En base a la curva obtenida para cada concentración de sensibilización, se eligió una dilución de trabajo tal que en 20 min de desarrollo de color se obtuviera una DO_{490nm} de 1,5 - 2.

- *Competición con gliadina en fase sólida.* Se evaluó la competición entre gliadinas inmovilizadas en fase sólida y los complejos inmunes, formados por preincubación (4 °C durante 16 h) de las soluciones de gliadinas estandar con el suero inmune. La competición se realizó durante diferentes tiempos: 20, 30, 60, 120 o 240 min a 37 °C.

En la **figura 3.3B**, los resultados se muestran como gráficos de la transformación logit de las

DO_{490nm} en función del logaritmo de la concentración de gliadinas. Se observa que las rectas presentan pendientes similares, es decir, la diferencia en los tiempos de competición no influye sobre la sensibilidad del ensayo. Se observó que la mayor detectabilidad se logra con tiempos de competición de 20 o 30 min ya que, por ejemplo, 50% de desplazamiento (logit $p=0$) para las curvas de 20 o 30 min, se logra con concentraciones menores que para los otros tiempos analizados.

- *Interacción antígeno-anticuerpo en fase fluida. Preincubación.*

Para una etapa de competición de 30 min a 37 °C, se analizó la influencia de diferentes condiciones de preincubación (16 h a 4°C o 30 min, 1 h, 2 h a 37 °C). Los resultados, presentados en la **figura 3.3C**, muestran para las distintas condiciones de preincubación, rectas de pendientes similares. Se observa que la mayor detectabilidad en el ensayo se logra con una preincubación de 120 min a 37 °C.

- *Concentración de gliadina en la sensibilización.*

En las condiciones de preincubación y de competición previamente establecidas, se ensayaron tres concentraciones de antígeno para la sensibilización: 1, 5 y 10 µg/ml. En cada caso se eligió, de acuerdo a la **figura 3.3A**, la dilución de suero que produjera en 20 min una DO_{490nm} de 1,5-2. De los resultados mostrados en la **figura 3.3D**, se deduce que la mayor detectabilidad se logra realizando la sensibilización con una solución de gliadinas de 1 µg/ml.

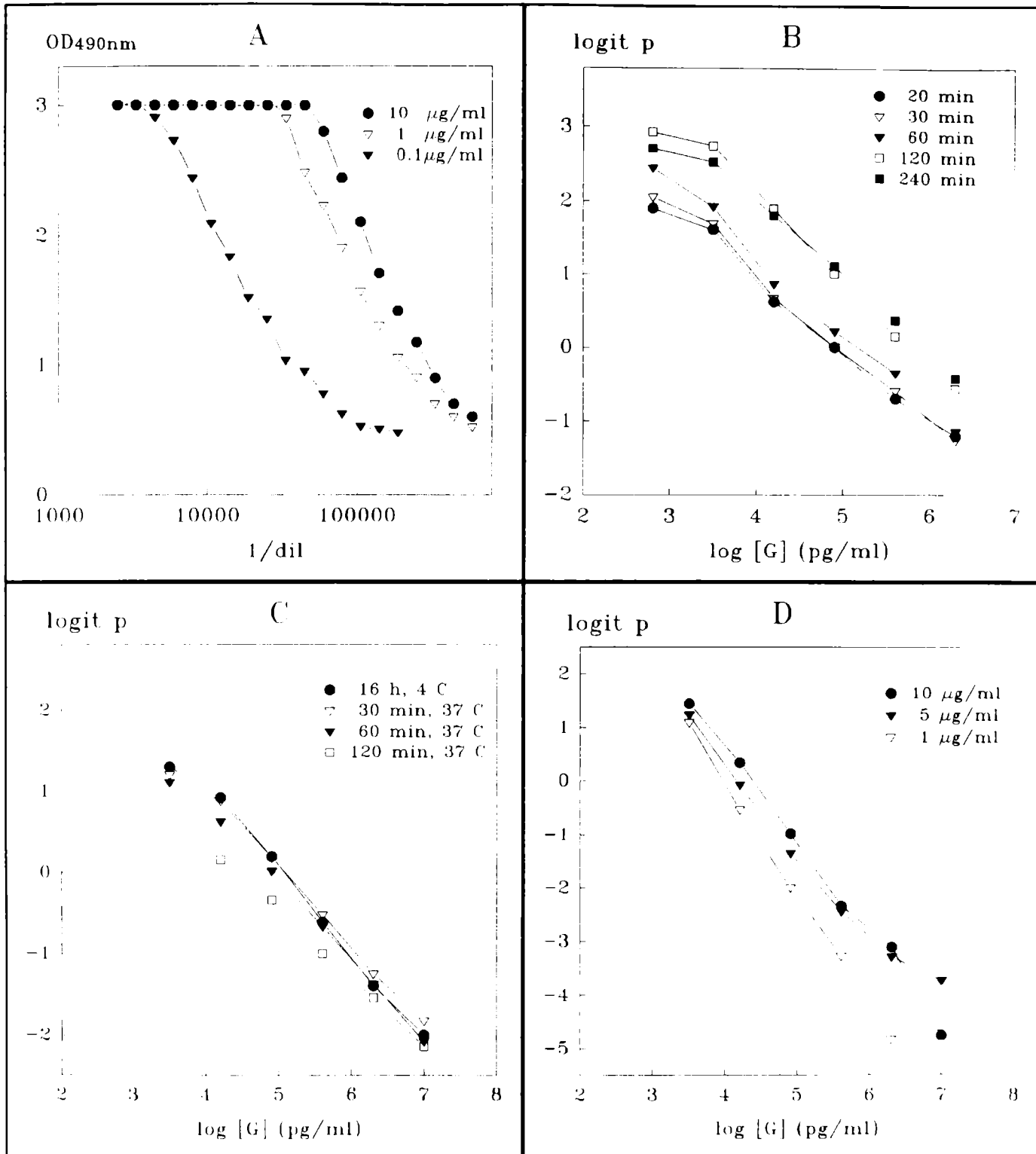


Figura 3.3: Evaluación de las etapas del ELISA competitivo.

A- Titulación del suero anti-gliadinas frente a tres concentraciones de antígeno sensibilizante (0,1, 1 y 10 µg/ml). Gráficos de logit p en función del logaritmo de la concentración de gliadinas de:

B- Influencia del tiempo de competición (20, 30, 60, 120 y 240 min a 37 °C), sensibilización: 10 µg/ml, preincubación: 2 h a 37 °C.

C- Influencia de las condiciones de preincubación (16 h a 4 °C o 30 min, 60 min y 120 min a 37°C), sensibilización: 10 µg/ml y competición: 30 min a 37 °C.

D- Efecto de la concentración de antígeno sensibilizante (1, 5 y 10 µg/ml), preincubación 2 h 37 °C y competición 30 min a 37°C.

3.2.3.- Análisis del ensayo cuantitativo.

La curva standard media de siete ensayos independientes se muestra en **figura 3.4**. Se observa que el ensayo presenta buena respuesta lineal, en un amplio rango de concentración (0,6 ng/ml a 10 µg/ml). A valores de concentración inferiores a 3 ng/ml, se observa una disminución de la pendiente. La transformación logit fue elegida para mejorar el ajuste en la curva dosis-respuesta.

La precisión del ensayo fue evaluada en las condiciones optimizadas descritas previamente. La reproducibilidad, determinada en ensayos por triplicado, presenta coeficientes de variación de los valores logit p: 4,8-25%. La repetibilidad determinada mediante siete ensayos diferentes mostró coeficientes de variación: 6,5-30%. En ambos casos la mayor dispersión se encuentra en valores inferiores a 20 ng/ml.

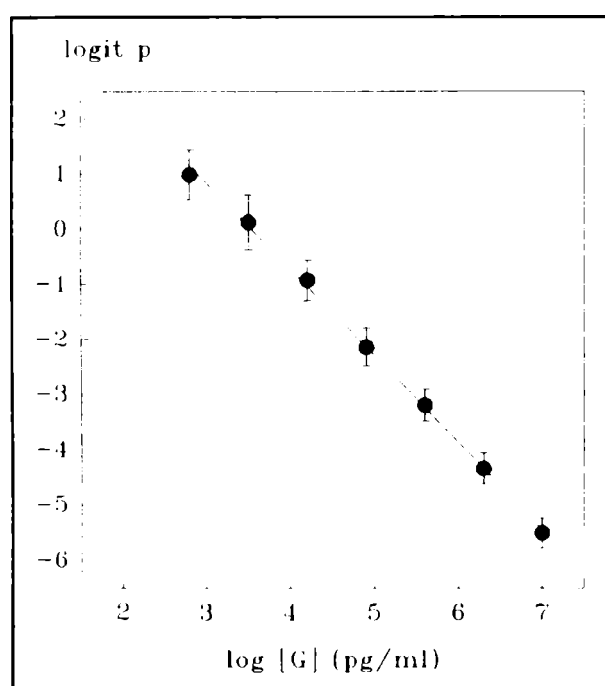


Figura 3.4: Curva estándar del ELISA competitivo secuencial. Recta de regresión de los puntos medios de siete ensayos independientes, con su correspondiente desviación estándar.

Los valores obtenidos de los parámetros de detectabilidad de éste ensayo son: 50% de inhibición (logit p=0) igual a 5 ng/ml y límite de detección (calculado por test t con 99% de confianza) de 1 ng/ml.

Por otra parte, el nivel de detección de gluten diluciones 1/50 o 1/10 del extracto muestra es de 0,1 mg/100 g y 0,02 mg/100 g de producto, respectivamente.

3.2.4.- Análisis de la reactividad cruzada entre proteínas de distintos vegetales.

Para el análisis de la *fracción prolaminas* de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz, se procedió según el protocolo 12.3.

La competición entre las proteínas extraídas de cada vegetal y gliadinas, fue analizada mediante el ELISA competitivo descrito. Para ello, los extractos proteicos se incubaron con el suero anti-gliadinas y posteriormente, los complejos inmunes formados se compitieron con gliadina inmovilizada en fase sólida.

En la **figura 3.5A**, se muestran los resultados obtenidos para cada extracto graficados como coordenadas logit p en función del log [proteínas]. Se observa una clara diferencia en la capacidad de competición de los distintos extractos proteicos, evidenciada por el desplazamiento de las rectas sobre el eje x.

En la **figura 3.5B**, los resultados son mostrados como curvas de desplazamiento. En ambas **figuras 3.5 A y B**, el desplazamiento hacia la derecha indica una menor capacidad de competición, ya que para un dado valor de inhibición se requieren mayores concentraciones de proteínas en el extracto.

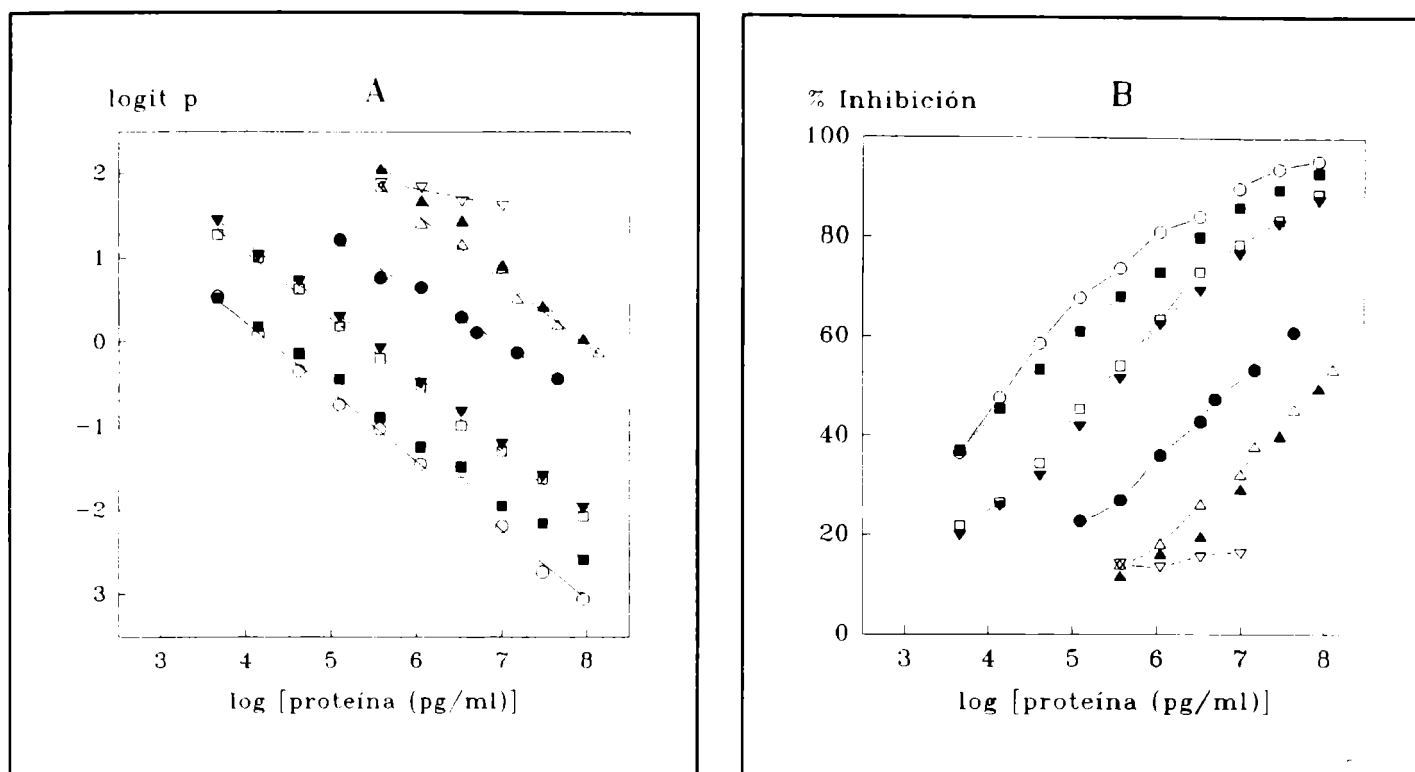


Figura 3.5: Análisis de la reactividad cruzada por ELISA competitivo. A- gráficos logit en función del logaritmo de la concentración de proteínas y B- curvas de desplazamiento, de extractos etanólicos de harina de trigo (○), cebada (◻), centeno (▼), triticale (■), avena (●), soja (▲), arroz (△) y maíz (▽).

Cabe destacar, que dado que los extractos proteicos se encuentran disueltos en ácido acético 0,01 M, se verificó el comportamiento de las prolaminas en dicho solvente. Para esto, se construyeron curvas de calibración para el ELISA competitivo, usando las soluciones de gliadinas disueltas en etanol 70% y en ácido acético 0,01 M, preparadas según el protocolo 5. Mediante el ELISA competitivo, a las diluciones estudiadas, no se detectaron diferencias en la capacidad de competición empleando las soluciones estandar de gliadinas disueltas en estos solventes.

En la **Tabla 3.1**, se presentan los índices de competición (IC) de los diferentes extractos calculados a partir de la concentración que produce un 50% de inhibición ($\text{logit } p = 0$) en la **figura 3.5A** (tomando como referencia al extracto de trigo). Se observa que triticale, cebada y centeno presentan alta capacidad de competición, mientras que la correspondiente a avena es menor.

En el caso de soja, maíz y arroz, no se obtuvo una competición significativa.

Tabla 3.1. Índices de competición relativos.

Extracto	IC
trigo	1
triticale	1,3
cebada	12,6
centeno	16,3
avena	46,8
arroz	4700
soja	5000
maíz	----

3.2.5.- Análisis del efecto del solvente de extracción sobre la inmunodetección.

En la cuantificación de gliadinas la mayoría de los test inmunoquímicos emplean como solvente de extracción etanol 70% o 40%. Puesto que el objetivo es dosar bajos contenidos de gliadinas, en general, los análisis se realizan a baja dilución del extracto muestra en el diluyente del ensayo, lo que conduce a una alta proporción de etanol en el tubo de reacción. Por esta razón, se estudió la influencia del etanol, presente en el medio de reacción, sobre la interacción antígeno-anticuerpo. Se prepararon soluciones con distintas concentraciones de etanol conteniendo 100 ng/ml de gliadinas, las que fueron analizadas mediante el ELISA descripto.

En la **figura 3.6**, se muestra la inhibición obtenida a cada concentración de etanol expresada como porcentaje respecto al control sin etanol. Se observa que el aumento de la concentración de etanol conduce a una importante disminución de la capacidad de competición y consecuentemente, a que la concentración de gliadina en la muestra sea subvaluada.

Este efecto debe ser tenido en cuenta pues los alimentos con bajo contenido de gluten son analizados a diluciones entre 1/50 y 1/10. En estas condiciones, la concentración final de etanol variará de 0,8% a 4% o de 1,4% a 7% de acuerdo a que se utilice etanol 40% o 70%, respectivamente. Los resultados indican que para concentraciones de etanol de 0,8% a 7% existe una disminución de la reactividad, obteniendo un nivel de competición, respecto al control, del 98% al 60%, respectivamente. Esto conduce a una subvaluación del contenido real de gliadinas de un 2% a un 40%.

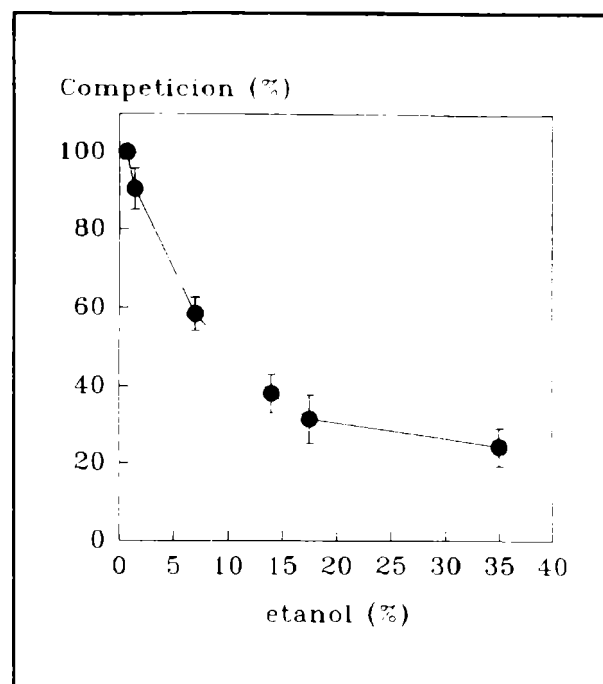


Figura 3.6: Efecto de la concentración de etanol sobre la capacidad de competición. Nivel de competición de soluciones de gliadinas de 100 ng/ml, conteniendo diferentes concentraciones de etanol. En ordenadas se indica el porcentaje de competición respecto al control sin etanol. Los puntos corresponden a la media de cuatro experimentos diferentes por duplicado con su correspondiente desviación estándar.

3.2.6.- Análisis comparativo del ELISA competitivo frente a un ELISA comercial.

La comparación se realizó con un kit comercial, procesando en forma simultánea los estándares, muestras y controles, mediante los protocolos del kit y del ensayo desarrollado. Se empleó el "Gluten assay kit", Cortecs Diagnostics, UK, aceptado como método oficial por la AOAC (Skerritt y Hill, 1991). El kit provee un estándar de gliadina liofilizado y tres controles de bajo, medio y alto contenido de gluten.

Tabla 3.2. Comparación entre el kit comercial y el ELISA competitivo.

Muestra Control	Kit comercial	Ensayo Competitivo
Bajo	< 16	0,5 ± 0,1
Medio	23 ± 2	27 ± 3
Alto	100 ± 12	115 ± 9

Análisis de los controles provistos en el kit por ambos métodos. Los resultados corresponden a experimentos por triplicado (excepto el control bajo, analizado por cuadruplicado), expresados como promedios en mg/ 100 g ± DS.

Se observó concordancia en los resultados para los controles medio y alto. En la **Tabla 3.2**, se indican los resultados obtenidos del análisis efectuado por triplicado, mediante el kit comercial y por el ELISA competitivo. En cuanto al control de bajo contenido de gluten, analizado por cuadruplicado, el ensayo desarrollado detecta 0,5 ± 0,1 mg/100 g, mientras que el reactivo comercial no puede dosar valores inferiores a 16 mg/100 g.

En ensayos paralelos por ambos métodos, no se observaron diferencias empleando el estandar propio o el del kit comercial. Los resultados obtenidos con el ELISA competitivo empleando la solución de gliadina estandar provista en el kit, confirman el alto nivel de detección del ELISA desarrollado. No se encontraron diferencias

significativas en la cuantificación cuando la misma muestra fue extraída con etanol 70% o 40% (analizada a diluciones iguales o mayores a 1/50). Resultados comparables fueron obtenidos en el análisis de diferentes alimentos en ambos ensayos.

3.2.7.- Análisis de muestras de alimentos por ELISA competitivo.

Se analizaron muestras comerciales de alimentos de diferentes tipos mediante el ELISA competitivo descrito. Los alimentos han sido clasificados en tres grupos (**Tabla 3.3**): los que en su formulación indican la presencia de harina de trigo (**A**), los que no la indican (**B**) y los que son comercializados como libres de proteínas de trigo, avena, cebada y centeno (Sin TACC)(**C**).

Tabla 3.3: Determinación de gluten en alimentos por ELISA competitivo.

A- Productos con contenido de trigo, cebada, centeno y/o avena declarado.

Alimento-Productor	gluten mg\100 g
Polvo p/preparar Bizcochuelo Vainilla Exquisita- Molinos	4000
Galletitas Traviata- Bagley	2900
Galletas c/salvado- Canale	770
Galletas de soja- Granix	1800

B- Productos en cuyo envase no se indica contenido de trigo, cebada, centeno y/o avena.

Alimento-Productor	gluten mg\100 g
Polvo p/preparar Flan Exquisita- Molinos	1
Toddy- Alimesa	n.d.
Zucoa- Noel	n.d.
Nesquik- Nestlé	n.d.
Chocolino- Bagley	n.d.
Dulfix- Emeth	n.d.
Alfajor Pleno Diet	0,3
Té Green Hills- Llorente	n.d.
Cacao Arcao- Arcor	n.d.
Galletitas Crackers- Bagley	20
Dulce de Leche- La Suipachense	4
Hamburguesas " Paty"- Paty	20
Salchichas- Wilson	300
Salchichas- San Sebastian	52
Mostaza- Fanacoa	100

C- Productos comercializados con rótulo Sin TACC.

Alimento-Productor	gluten mg/100 g
Polvo p/preparar Postre Chocolate Exquisita - Molinos	n.d.
Galletas de arroz -Macrobiótica	n.d.
Almidón de maíz- Kapac	n.d.
Cacao- Kapac	n.d.
Polvo p/preparar Pizza -Kapac	0,1
Polvo p/preparar Bizcochuelo chocolate -Kapac	n.d.
Polvo p/preparar Bizcochuelo vainilla -Kapac	n.d.
Polvo p/preparar pan -Kapac	0,1
Polvo p/preparar budín de pan - Kapac	n.d.
Fideos Blue Patna- Ind. Uruguaya	0,6
Galletitas Ecovida- Ind. Chilena	0,2

Los datos mostrados corresponden a mg de gluten por 100 g de producto. n.d. (no detectable) < 0,1 mg/ 100 g.

En la **Tabla 3.3**, se observa que el ensayo desarrollado puede ser aplicado a una gran variedad de alimentos y que conserva la capacidad de reconocer las prolaminas en alimentos procesados térmicamente, tales como por ejemplo: galletitas y salchichas. Cabe destacar que todos los productos formulados para enfermos celíacos analizados mostraron un nivel de gliadinas inferior al recomendado por la OMS. Por otra parte, el ensayo mostró un buen nivel de discriminación entre alimentos sin gluten y aquellos que lo contienen en bajas cantidades.

3.3.- Discusión.

Para el desarrollo de métodos de cuantificación relativos como los métodos inmunoquímicos, se requiere disponer de una solución estándar confiable. Sin embargo, la preparación de estándares de gliadinas presenta importantes dificultades debido a la baja solubilidad y gran tendencia a la formación de agregados de estas proteínas. En este sentido, es notorio el alto número de publicaciones, relativas a la cuantificación de gliadinas, en las que no se indica detalladamente la preparación ni la certificación de la concentración real de la solución estándar.

En la bibliografía se observa que la preparación de los estándares se realiza por extracción de las prolaminas de la harina de trigo (Troncone y col., 1986; Friis, 1988) o por disolución de liofilizados de extractos propios de gliadinas (Skerritt y Hill, 1991) o de gliadina comercial (Molina y col., 1991).

La disolución total de muestras de gliadinas, de origen comercial o de liofilizados, resulta siempre incompleta. Por lo tanto, dado que la cantidad de gliadina disuelta es variable, es imposible obtener una solución estándar de gliadina por pesada y disolución. Aún en el caso del empleo del estándar provisto en el kit

comercial aprobado por la AOAC (Skerritt y Hill, 1991), la disolución del liofilizado conduce a una solución estable pero ligeramente opalescente.

La estabilidad de la solución está determinada por las condiciones de preparación y almacenamiento. Existen publicaciones donde, si bien no se indica como se evaluó su concentración, se aconseja preparar el estándar diariamente, debido a la formación de agregados (Friis, 1988).

Algunos autores cuantifican la solución estándar por el método de Bradford (Skerritt y Hill, 1990; Molina y col., 1991) o por el método de Lowry (Freedman y col., 1987; Ellis y col., 1990), incluso empleando BSA como estándar (Cornell y Mothes, 1993).

La mejor manera encontrada para preparar soluciones de gliadina estándar, fue la disolución de gliadina comercial en etanol 70%, filtrado exhaustivo por membrana de 0,22 μm y finalmente, cuantificación por el método de Kjeldahl. Este estándar, almacenado a temperatura ambiente, resultó ser estable por varias meses.

Debido a la necesidad de conocer, en muchos casos, la cantidad de proteína presente en extractos de prolaminas, se analizaron distintos métodos generales de cuantificación de proteínas, entre ellos, la determinación por medida de absorbancia a 280 nm, y los métodos de Bradford (1970), Peterson (1977) y Lowry y col. (1951).

Por medida espectrofotométrica, se encontró que una solución de gliadinas de 1 mg/ml en etanol 70% presenta una absorbancia a 280 nm de 0,70. Otros autores han empleado un coeficiente de 0,84, aunque no especifican como fue calculado dicho coeficiente (Molina y col., 1989). Sin embargo, la determinación de la concentración de gliadinas en extractos de prolaminas, por medida de absorbancia a 280 nm no es factible

debido a la turbidez de las muestras. Aunque la filtración por membrana de 0.22 μm conduce a una solución límpida, no permite determinar el contenido proteico en la muestra original.

La absorción de luz en el ultravioleta cercano es debida principalmente a la presencia de tirosina y triptofano. El espectro de absorción de la proteína depende de la composición de aminoácidos y del solvente. Popineau y col. (1986) demostraron que los distintos componentes de las gliadinas tienen espectros de absorción característicos y por lo tanto, diferentes coeficientes de absorbancia. Esto determina que extractos de prolaminas de distinta composición presenten diferente absorción a 280 nm.

Como fue demostrado, la extracción de gliadinas con algunos de los solventes habitualmente utilizados, muestra importantes diferencias en su composición (**figura 3.1**). Además, se detectan diferencias en los extractos obtenidos de distintos cultivares de trigo. Estas variaciones en la composición de las muestras afectan el resultado de la cuantificación por medida de absorbancia.

Para estimar la concentración de soluciones de gliadinas, Hvatum y col. (1992b) emplearon la expresión de Kalchar ($\text{mg proteína/ml} = 1,45 \text{ DO}_{280\text{nm}} - 0,74 \text{ DO}_{260\text{nm}}$). Sin embargo, se encontró que, para varias soluciones de gliadinas, los valores obtenidos por lectura espectrofotométrica y cálculo por esta ecuación, fueron siempre inferiores a los determinados por el método de Kjeldahl (resultado no mostrado).

En diferentes publicaciones sobre métodos relativos de cuantificación se menciona la diferencia de respuesta entre distintas proteínas (por ejemplo, Sedmak y Grossber, 1977; Kratzer y col., 1990), las prolaminas constituyen, a su vez un caso especial por su estructura y características fisicoquímicas. Por esta razón, se estudiaron los métodos de Bradford, Peterson y Lowry, y se comparó en cada caso, la respuesta obtenida con

las soluciones estándar de gliadinas y BSA, todas cuantificadas independientemente, por el método de Kjeldahl.

En el método de Bradford, el color final desarrollado depende de la interacción colorante-proteína y por lo tanto, de la proteína en estudio. Como se observa en la **figura 3.1A** existe una gran diferencia entre las soluciones de BSA y gliadinas. La menor pendiente de la curva de gliadina indica una menor capacidad de unión del colorante o una diferente interacción colorante-proteína. Esto podría estar relacionado con el efecto metacromático ya que, como fue demostrado (**figura 1.4A**), estas proteínas presentan una interacción particular con el colorante CBB R-250, el cual es químicamente semejante al CBB G-250, colorante empleado en el método de Bradford.

La diferencia de casi tres veces en la relación Absorbancia/masa de proteína, demuestra que no se puede utilizar, con este método, una curva de calibración de BSA para cuantificar gliadinas. Resultados equivalentes se obtuvieron con el método de Peterson, donde si bien la reacción de color se realiza en un medio más alcalino y en presencia de SDS, condiciones que favorecen la disolución de gliadinas, no se obtuvo una mejoría en la respuesta colorimétrica (**figura 3.1B**).

El uso de estas técnicas no resulta conveniente para la cuantificación de prolaminas, ya que las bajas pendientes conducen a una alta imprecisión en la determinación de su concentración.

En el método de Lowry, la pendiente de gliadinas es más alta que en los otros métodos, por lo que resulta, de los analizados, el método más adecuado para la cuantificación de soluciones de prolaminas (**figura 3.1C**).

La solución de gliadina estándar preparada mostró ser estable, confiable y de aplicabilidad, tanto en los métodos generales de cuantificación de proteínas, como para el desarrollo de métodos inmunoquímicos.

Debe tenerse en cuenta que, para la cuantificación inmunoquímica de gliadinas en alimentos, la OMS ha establecido que para declarar a un alimento exento de gluten, el contenido de prolaminas no debe exceder a 1 mg/100 g de producto seco (Codex Alimentarius).

Estas proteínas forman parte de la alimentación habitual, siendo las proteínas de trigo ampliamente empleadas. Por otro lado, dadas sus propiedades funcionales, en ocasiones son adicionadas durante la fabricación de alimentos, en baja concentración, para mejorar las cualidades del producto.

Como fue discutido previamente, son proteínas poco solubles en solventes acuosos y para su extracción en general, se recurre a solventes alcohólicos.

La necesidad de certificar la composición de los alimentos destinados al consumo por enfermos celíacos, ha llevado al desarrollo de métodos inmunoquímicos cuantitativos. Sin embargo, existen varios aspectos que generan importantes inconvenientes en la optimización del inmunoensayo:

- 1- la complejidad de las prolaminas de los cereales nocivos,
- 2- su alta reactividad cruzada,
- 3- su insolubilidad en solventes acuosos,
- 4- la eficiencia del solvente en el proceso de extracción,
- 5- los efectos sobre la inmunodetección debidos a la presencia del solvente en el medio de reacción,
- 6- los cambios producidos por los procesos térmicos durante la fabricación de los alimentos.

El ELISA competitivo secuencial es un ensayo de no equilibrio en el cual, las etapas de preincubación y de competición, con el antígeno inmovilizado, influyen marcadamente en el nivel de detección alcanzado. En este formato de ensayo, tiempos largos de preincubación favorecen la formación de complejos inmunes con el antígeno soluble. Los menores tiempos de

competición disminuyen la posibilidad de que se disocien los complejos inmunes formados en la preincubación y que el anticuerpo libre interactúe con el antígeno en fase sólida. Los resultados mostrados en la **figura 3.3 B y C**, confirman ambas consideraciones.

La concentración de gliadina en la sensibilización también influye sobre la detectabilidad (**figura 3.3D**), la que aumenta cuando la concentración de gliadina disminuye. Sin embargo, a concentraciones menores de 1 $\mu\text{g/ml}$ se produce un aumento en la dispersión de los resultados.

Por lo tanto, a efectos de lograr el máximo nivel de detección posible, se eligieron las siguientes condiciones de trabajo: concentración de gliadina en la sensibilización: 1 $\mu\text{g/ml}$, preincubación: 2 h a 37°C y competición: 30 min a 37°C. De esta forma, se logran niveles de competición medibles aún en presencia de muy bajas cantidades de gliadinas en la muestra.

El ensayo competitivo descrito presenta un buen rango de respuesta lineal (0,6 ng/ml a 10 $\mu\text{g/ml}$), con un límite de detección de 1 ng/ml. El nivel de detección alcanzado permite el análisis de muestras con un contenido de gluten tan bajo como 0,1 mg/100 g de producto seco, cuando el extracto muestra es analizado a dilución 1/50, o de 0,02 mg/100 g cuando se emplea una dilución 1/10.

Se debe notar, que el ensayo presenta un incremento en los coeficientes de variación (CV) a concentraciones por debajo de 20 ng/ml, aún cuando la desviación estándar observada no aumenta significativamente (**figura 3.4**). Este aumento es debido a que en el cálculo de los CV, el denominador es el valor logit de cada punto, que a esas concentraciones es cercano a cero.

La complejidad proteica de los extractos de prolaminas, así como la alta homología entre estas proteínas y el hecho de que, en la fabricación de alimentos para enfermos celíacos, se suele

emplear como reemplazo productos en base a soja, maíz y arroz entre otros, hacen imprescindible que en los métodos de cuantificación se establezca el grado de reactividad cruzada.

El análisis inmunoquímico de prolaminas de trigo, cebada, centeno y avena, ha sido realizado por varios autores. Entre ellos, Festenstein y col. (1987), demostraron la relación antigénica entre los grupos de prolaminas de los cereales. Las regiones repetitivas son las que contribuyen en mayor medida a esta reactividad compartida como fue demostrado también por Skerritt y Underwood (1986), en el análisis de prolaminas de trigo.

En general, en los trabajos de métodos de cuantificación, la reactividad frente a las prolaminas ha sido analizada por "immunoblotting", el cual permite un análisis de la especificidad de los anticuerpos empleados pero no una evaluación cuantitativa. Skerritt y Lew (1990), para evaluar la reactividad cruzada, emplearon la titulación de AcMo frente a proteínas de trigo, cebada, centeno, maíz y arroz. Este análisis no permite una evaluación exacta de la interacción antígeno-anticuerpo, puesto que se trata de mezclas proteicas complejas en las que la composición varía según la preparación, y dado que es un sistema muy heterogéneo, la unión a la placa puede diferir en cada especie proteica. Además, las afinidades relativas para cada sistema antígeno-anticuerpo varían.

A diferencia de esto, el análisis de desplazamiento, realizado en nuestro ensayo, evalúa la interacción real entre los anticuerpos y los extractos proteicos durante el inmunoensayo cuantitativo.

En las figuras 3.5 A y B, se puede observar que los más altos niveles de desplazamiento se obtienen con los extractos de trigo, triticale, cebada y centeno, siendo menor para avena. Los niveles de competición para arroz y soja son 5000 veces menores, mientras que para maíz no se

encontró un desplazamiento significativo.

Estos resultados indican que el ELISA descrito presenta alta especificidad para las proteínas nocivas a los enfermos celíacos y que no presenta reactividad cruzada con proteínas no relacionadas.

Para la cuantificación de gliadinas se han empleado diferentes solventes de extracción, pero, en general, la mayoría de los autores prefieren el uso de solventes alcohólicos, principalmente etanol.

Debe ser tenido en cuenta que el solvente de extracción pasa a ser importante en la cuantificación pues, determina el grado de recuperación de prolaminas de la muestra durante la etapa de extracción y además, al formar parte del medio de reacción donde se efectúa el inmunoensayo, puede afectar la interacción antígeno-anticuerpo.

Por esta razón, se evaluó el efecto del etanol a diferentes concentraciones en el ELISA descrito.

Los resultados indican que, para una concentración de etanol en el medio de reacción de 1,4% a 7%, existe una importante disminución de la capacidad de competición, lo que conduce a informar un resultado como 92% o 60% de su valor verdadero, respectivamente. Esto es de especial relevancia, ya que esas concentraciones de etanol, en el medio de reacción, se encuentran al analizar muestras con bajo contenido de gluten a diluciones, del extracto muestra de etanol 70%, 1/50 a 1/10. Dicha interferencia conduce a que el contenido real de gluten en la muestra sea subvaluado en 8% al 40%.

Cabe destacar, que si bien al extraer con etanol 40% el efecto del solvente es menor, etanol 70% posee una mayor capacidad de extracción de prolaminas, por lo que es frecuentemente adoptado como extractante en la cuantificación de gliadinas.

Debe destacarse que, aunque exista una disminución del 40% en la capacidad de competición, cuando un extracto es analizado a dilución 1/10 en el ELISA desarrollado, un alimento puede ser aún correctamente evaluado en cuanto a si es o no apto para consumo por enfermos celíacos (límite propuesto por la OMS 1 mg/100 g), ya que el límite de detección de este ensayo, para dicha dilución de la muestra, es de 0,02 mg/100 g de producto.

Se comparó el "Gluten assay kit", Cortecs Diagnostics, UK, aceptado como método oficial por la Association Official Analytical Chemist (AOAC), con el ELISA competitivo descrito. El kit es un ELISA sandwich con un AcMo anti- ω -gliadinas, presenta una curva de calibración sigmoidea cuyo nivel más bajo de trabajo es 160 ng/ml, lo que corresponde, para una dilución 1/50 del extracto, a una concentración de 16 mg/100 g alimento.

Cuando se comparó el ensayo optimizado con el kit comercial, se obtuvieron valores similares en diferentes muestras analizadas, así como en los controles provistos en el kit de medio y alto contenido de gluten. En cuanto al control

de bajo contenido de gluten, el ELISA competitivo desarrollado detecta $0,5 \pm 0,1$ mg/100 g, mientras que el reactivo comercial no puede detectar la presencia de gliadinas a concentración por debajo de 16 mg/100 g (**Tabla 3.2**).

El ELISA competitivo desarrollado es aplicable a muestras comerciales, incluso a alimentos que durante su fabricación son sometidos a tratamientos térmicos (**Tabla 3.3**).

Debe tenerse en cuenta que debido a la falta de control adecuado de los alimentos o al incumplimiento de las normas de formulación y etiquetado, en muchos países (incluso el nuestro), es necesario analizar una gran cantidad de productos para identificar los alimentos aptos para el consumo por enfermos celíacos. En este sentido, el alto costo del kit comercial con AcMo constituye una limitante para su aplicación. Por el contrario, el desarrollo de un ELISA competitivo de estas características, con anticuerpos policlonales, está al alcance de muchos laboratorios y puede ser aplicado masivamente por su menor costo.

4.- Aplicación de anticuerpos monoclonales al estudio y la cuantificación de prolaminas.

4.1.- Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales anti-prolaminas.

Con el objeto de producir AcMo de especificidad restringida a determinados grupos de prolaminas, se inmunizaron ratones BALB/c con gliadina comercial. Mediante la fusión de células del mieloma no secretor NSO con esplenocitos de bazo de esos ratones, se obtuvieron treinta hibridomas positivos por ELISA indirecto frente a gliadina total y a la *fracción enriquecida en ω -gliadinas*. El análisis de isotipo demostró que la mayoría de los AcMo eran IgG, varios IgM, dos IgG, y uno de isotipo IgA.

Se analizaron once de los treinta hibridomas obtenidos por "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* de trigo separadas por

SDS-PAGE. En la figura 4.1, se puede observar que los diferentes hibridomas presentan perfiles de reconocimiento de prolaminas de trigo muy variados. Algunos son de reconocimiento amplio, mientras que otros presentan reactividad más restringida. Los hibridomas 11A2, 12A1, 13B4 y 14D4 (calles 1, 6, 7 y 11, respectivamente), reconocen prolaminas de varios grupos, en particular, los AcMo 12A1 y 14D4 presentan un perfil de reconocimiento muy semejante, aunque el sobrenadante correspondiente al segundo tiene menor actividad. Es interesante la comparación de los AcMo 12A1 y 13B4 (calles 6 y 7). Ambos reconocen, aunque con algunas diferencias, componentes de α -, β - y γ -gliadinas, pero sólo el AcMo 12A1 reconoce ω -gliadinas.

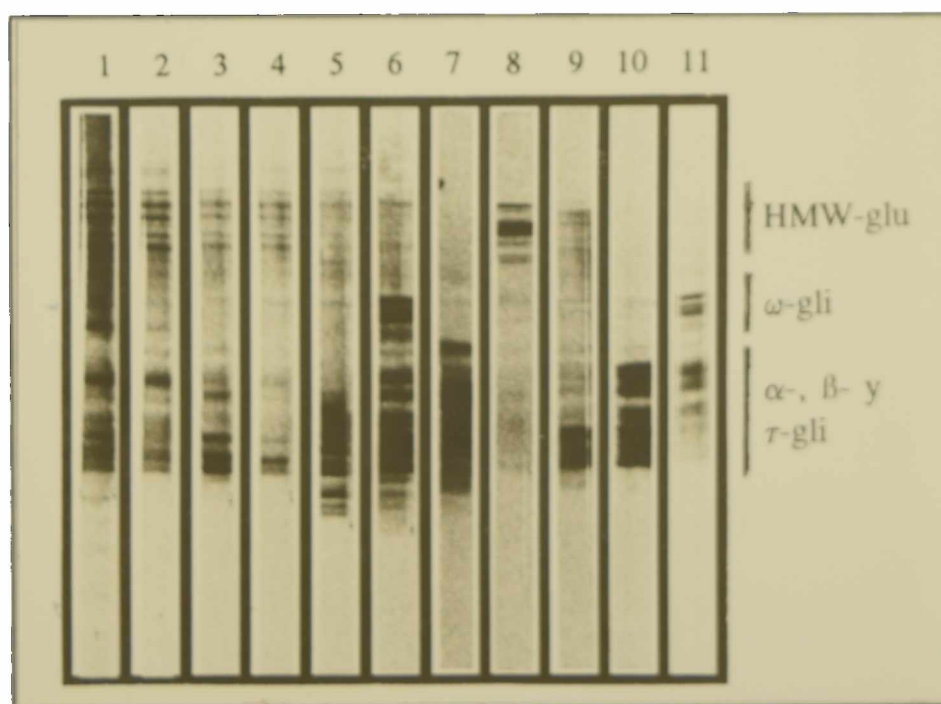


Figura 4.1: Selección de los AcMo. Análisis del sobrenadante de cultivo de once hibridomas por "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* de trigo separadas por SDS-PAGE en gradiente de acrilamida (10-15%). Los AcMo corresponden a las calles: 1- 11A2, 2- 11C2, 3- 11C4, 4- 11C6, 5- 11D5, 6- 12A1, 7- 13B4, 8- 13D1, 9- 14A6, 10- 14B6 y 11- 14D4.

Dentro de los AcMo de especificidad más restringida se encuentran 11C4, 11C6, 11D5 y 14A6 (calles 3, 4, 5 y 9, respectivamente), aunque presentan perfiles bien diferenciados, reconocen fundamentalmente componentes de la región de movilidad correspondiente a α -, β - y γ -gliadinas. En especial, el AcMo 11C6 (calle 4), presenta fuerte reactividad selectiva hacia un número reducido de proteínas. Es importante destacar al AcMo 13D1 (calle 8), el que presenta reactividad muy intensa sólo con HMW-gluteninas.

4.2.- Estudio del perfil de reactividad.

Con el objeto de una mejor caracterización de su especificidad, cinco de los treinta hibridomas obtenidos fueron estudiados por "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* y a la *fracción prolaminas* (extraíble en etanol 70%) de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz.

En la **figura 4.2**, los hibridomas han sido agrupados de acuerdo a dos tipos de reactividad: aquellos AcMo de reconocimiento amplio, 11C4, 12A1 y 14B6 y los que son selectivos hacia un determinado grupo de prolaminas: 13B4 y 11B4.

Los AcMo 11C4 y 12A1 presentan un perfil similar, de amplio reconocimiento de prolaminas de todos los grupos de trigo, cebada, centeno y triticale. Estos AcMo reconocen α -, β - y γ -gliadinas y algunos componentes de ω -gliadinas. Ambos AcMo ponen en evidencia la alta reactividad cruzada entre las proteínas homólogas de los cuatro cereales. Con trigo, se observan dos bandas intensas en la región de ω -gliadinas (*Mr.* 50 a 55 kDa). Con cebada, se detecta una banda de *Mr.* cercana a 50 kDa, correspondiente a C-hordeínas, mientras que para centeno existen proteínas reconocidas en la zona de *Mr.* de 50 kDa donde se encuentran las ω -secalinas. También se observa reactividad frente a las proteínas homólogas de γ -gliadinas. Con cebada y centeno, existe reconocimiento de la región cercana a 40

kDa, la que corresponde a B-hordeínas y γ -secalinas, respectivamente. Con ambos AcMo, se observa reactividad contra triticale en los componentes compartidos con trigo y centeno. El 11C4 reconoce débilmente algunos componentes de avena. Cuando este AcMo fue analizado en la **figura 4.1**, aparecía como un AcMo de reconocimiento restringido, lo que indica que parte de su reactividad no fue detectable por estar en baja concentración, fenómeno que ha sido documentado también por Brett y col. (1990).

El hibridoma 14B6 también presenta reconocimiento de proteínas de los cuatro cereales, aunque más restringido que el observado con 11C4 y 12A1. 14B6 reconoce algunos componentes de trigo (α -, β - y γ -gliadinas) y presenta intensa reactividad frente a centeno y por lo tanto, también contra triticale (calles 1, 3 y 4, respectivamente). Reconoce débilmente B-hordeínas y γ -secalinas de *Mr.* cercana a 40 kDa. El perfil observado en el "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* y a la *fracción prolaminas* es muy similar, aunque es llamativa la aparición de una banda de *Mr.* de aproximadamente 35 kDa, de fuerte reactividad sólo con el extracto de trigo en etanol 70%.

De los hibridomas de reconocimiento restringido se muestran el 13B4 y el 11B4 (**figura 4.2, cont.**). El AcMo 13B4 presenta una intensa reactividad contra proteínas de trigo y triticale. Se observa que existe reconocimiento en la región de α -, β - y γ -gliadinas y que no presenta reactividad contra ω -gliadinas. La reactividad con triticale (calle 4) sólo se encuentra en la región de *Mr.* correspondiente a las prolaminas homólogas a α -, β - y γ -gliadinas. La reactividad contra prolaminas de cebada y centeno, es muy débil (calles 2 y 3, respectivamente).

El análisis de reactividad del AcMo 11B4 frente a la *fracción proteínas totales* y a la *fracción prolaminas* muestra alta selectividad hacia algunas B-hordeínas de *Mr.* cercana a 30 kDa (calle 2). Frente a la *fracción prolaminas* se observa además, una débil reactividad frente a

centeno y triticale (figura 4.2B, calles 3 y 4, respectivamente).

La similitud observada en el análisis por "immunoblotting", frente al extracto de proteínas totales y a la fracción soluble en etanol 70% de cada uno de los cereales analizados (figura 2,

paneles A y B), confirma que la reactividad de estos AcMo está dirigida esencialmente, hacia prolaminas de los cereales nocivos a los enfermos celíacos.

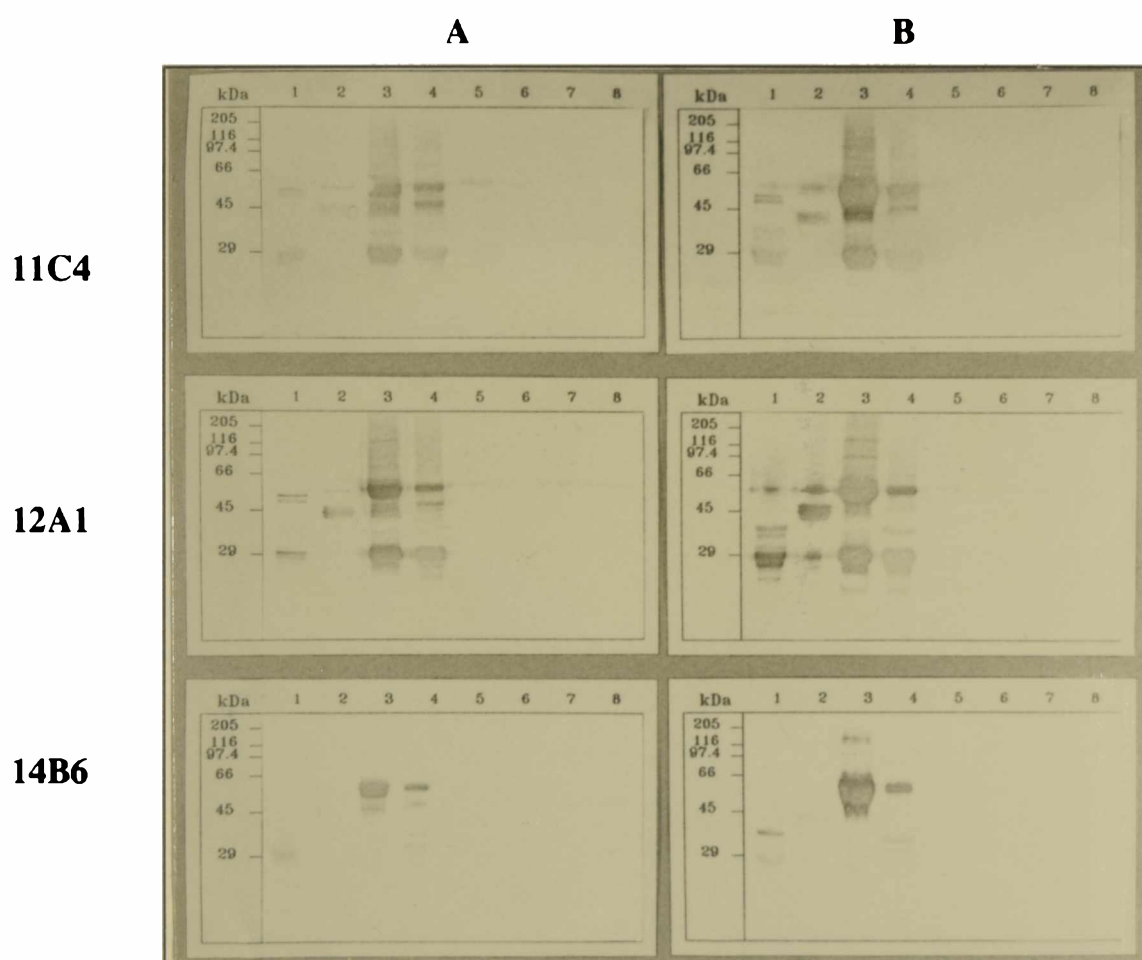


Figura 4.2: Análisis del perfil de reactividad de cinco AcMo. Análisis de los AcMo 11C4, 12A1 y 14B6, por "immunoblotting" frente a extractos proteicos separados por SDS-PAGE (10-15%). A: *fracción proteínas totales* y B: *fracción prolaminas* de harina de: 1- trigo, 2- cebada, 3- centeno, 4- triticale, 5- avena, 6- soja, 7- maíz y 8- arroz.

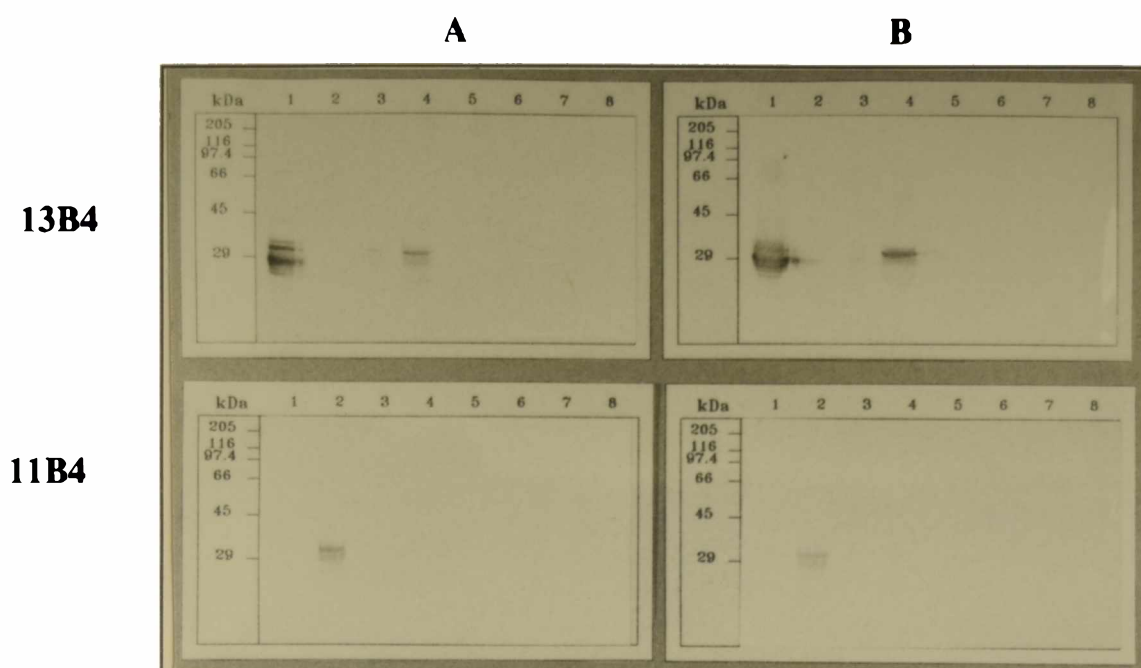


Figura 4.2, cont.: Análisis del perfil de reactividad de cinco AcMo. Análisis de los AcMo 13B4 y 11B4.

4.3.- Reactividad de los AcMo contra diferentes cultivares de trigo.

Con el objeto de estudiar la aplicación de los AcMo como herramienta en la diferenciación de cultivares, se analizó por "immunoblotting" la reactividad de cuatro de los AcMo obtenidos frente a la *fracción proteínas totales* de los doce cultivares de trigo descritos en Materiales y Métodos.

En la **figura 4.3**, se pueden observar importantes diferencias en los perfiles de reconocimiento de cada uno de los AcMo analizados. Para cada AcMo si bien se observa que existe un perfil de reactividad conservado

para todos los cultivares estudiados, en muchos casos las diferencias encontradas permiten diferenciarlos.

Además, cuando los resultados del "immunoblotting" obtenido con un AcMo se comparan con los obtenidos con otros AcMo se incrementa la capacidad para discriminar entre cultivares. Así por ejemplo, empleando el AcMo 12A1, es posible diferenciar los cultivares 1, 2 y 3, o 10 y 11 que presentaban el mismo perfil con el 14B6. En forma análoga se logra la diferenciación entre los cultivares, cuando se analizan los "immunoblotting" obtenidos con los AcMo 13B4 y 11C4.

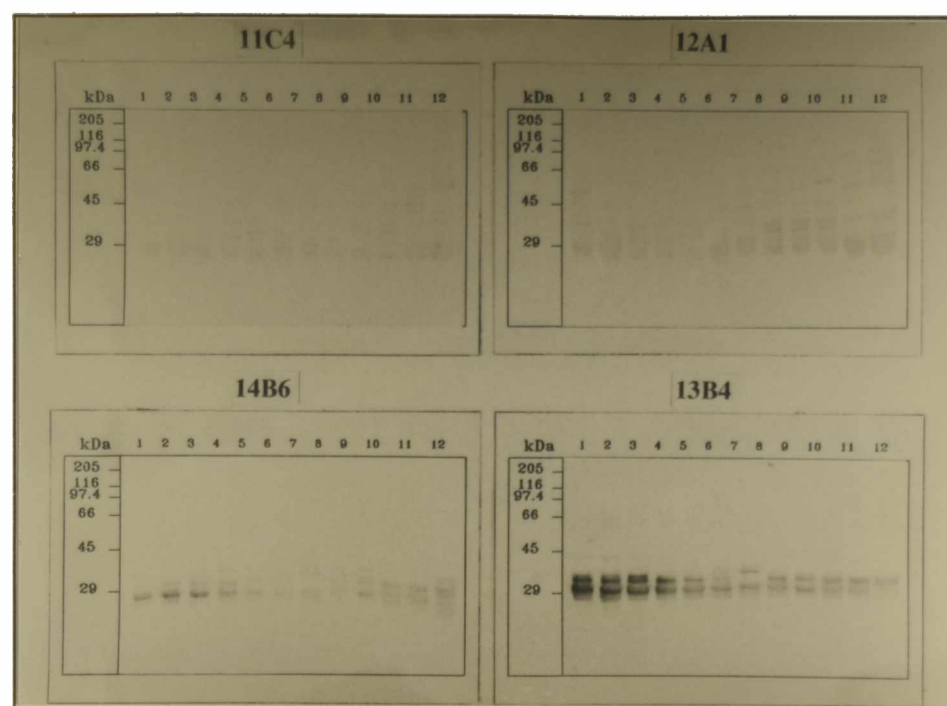


Figura 4.3: Diferenciación de cultivares de trigo mediante los AcMo 14B6 y 12A1. "Immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales* resuelta por SDS-PAGE (10-15%) de doce cultivares de trigo: 1- INTA La Paz, 2- ProINTA Oasis, 3- Buck ñandú, 4- Buck Patacón, 5- Buck Fogón, 6- ProINTA Pigué, 7- INTA Marcos Juarez, 8- Buck Catriel, 9- Buck Pucará, 10- Staparka, 11- Buck Bagual y 12- Valverde.

4.4.- Purificación de los AcMo.

De acuerdo a las características de reconocimiento establecidas en el análisis por "immunoblotting", se seleccionaron tres AcMo: 11C4, 12A1 y 13B4, todos de isotipo IgG₁. Estos fueron preparados en mayor escala mediante la producción de líquido ascítico.

Las inmunoglobulinas fueron precipitadas del ascitis con SO₄(NH₄)₂ al 50% de saturación, tratamiento que permite obtener una preparación de estos AcMo con un 90-95% pureza (Weir, 1978).

Con el objeto de disponer de un reactivo de mayor pureza para su uso en métodos inmunoquímicos, se procedió a su separación por FPLC de intercambio aniónico. Primero se estudió la elución en una columna analítica

(Mono-Q).

En la **figura 4.4A**, se muestra el perfil de elución en condiciones que permiten la mejor resolución en menor tiempo. El comportamiento de elución de los tres AcMo es muy similar, aunque presentan un ligero desplazamiento en los tiempos de retención. Por otro lado, el análisis por ELISA, frente a gliadinas totales de las fracciones de estas cromatografías, mostró que la actividad anticuerpo se encuentra en el pico principal.

Para disponer de una mayor masa de los AcMo se utilizó una columna preparativa de Q-Sepharosa. En la **figura 4.4B**, se observa que los perfiles de elución son similares para los tres AcMo estudiados, conservando las diferencias observadas con la columna analítica.

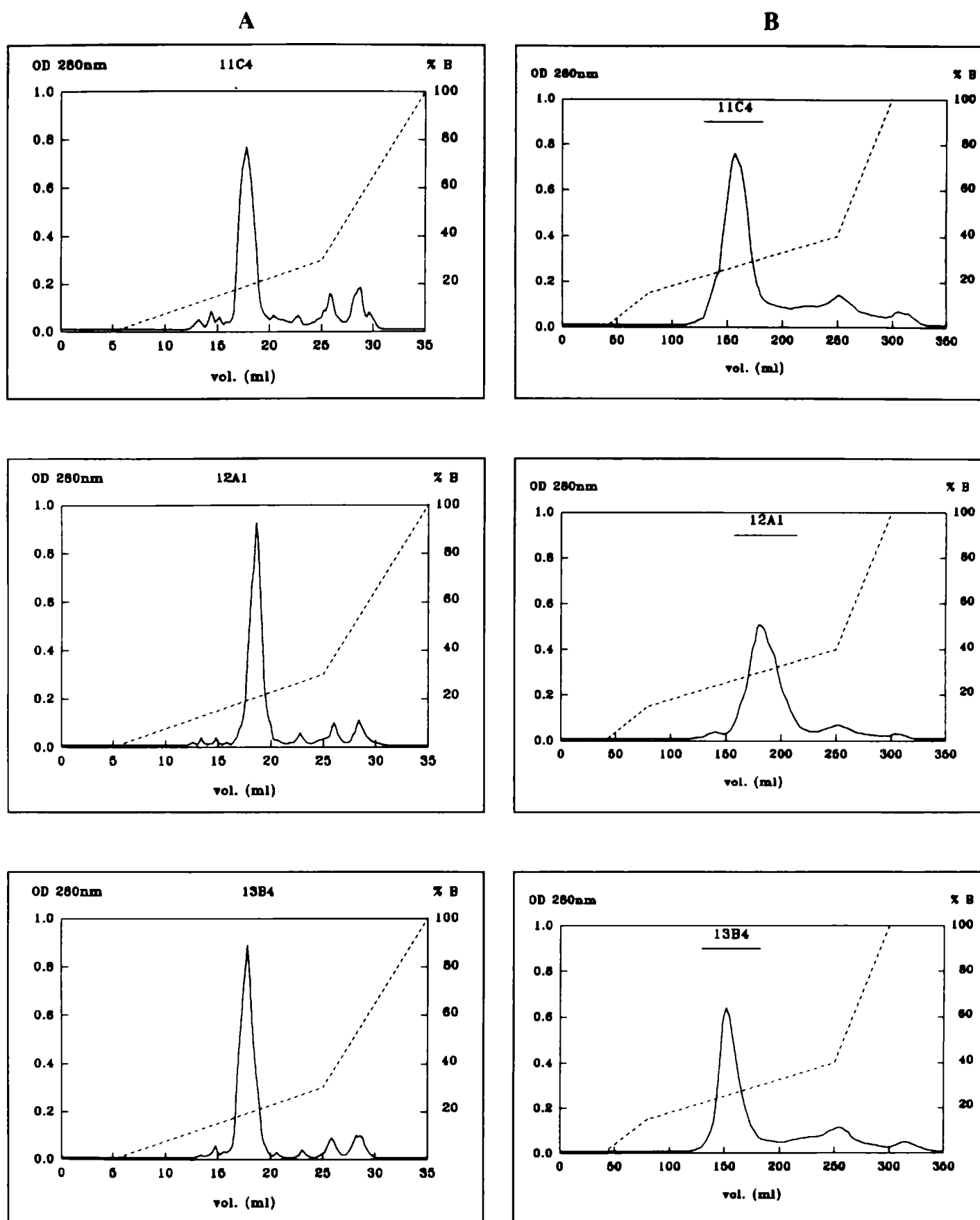


Figura 4.4: Purificación de los AcMo 11C4, 12A1 y 13B4, por FPLC de intercambio aniónico, A: columna analítica (Mono Q) y B: columna preparativa (Q-Sepharosa). El eje de abcisas corresponde al volumen de elución. En líneas de trazos se indica el gradiente de concentración en porcentaje de buffer B (100% corresponde a NaCl 1M). En cada registro cromatográfico (de la parte B) se indican las fracciones del AcMo, donde se detecta actividad anticuerpo.

4.5.- Análisis por SDS-PAGE e isoelectroenfoque de los AcMo purificados.

Con el objeto de verificar la pureza obtenida en el fraccionamiento cromatográfico y determinar sus puntos isoelectricos, los tres AcMo purificados por FPLC fueron analizados por SDS-PAGE e isoelectroenfoque.

La composición de las fracciones colectadas fue analizada por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. En la **figura 4.5**, se muestra el análisis por SDS-PAGE de seis fracciones correspondientes al pico mayoritario de la elución indicada en la **figura 4B** del AcMo 13B4, resultados similares fueron obtenidos con los otros dos AcMo. En condiciones no reductoras (**figura 4.5A**), sólo se detecta una banda de alto M_r , mientras que en condiciones reductoras dicha banda es descompuesta en dos subunidades

(**figura 4.5B**). Las M_r corresponden a la inmunoglobulina nativa, y a las cadenas pesadas y livianas respectivamente. Este análisis muestra que las fracciones colectadas correspondientes al AcMo están prácticamente libres de contaminantes.

En el análisis por isoelectroenfoque (**figura 4.6**), se observa que los tres AcMo presentan un elevado grado de pureza, detectándose en la región ácida, bajas cantidades de contaminantes, los que son comunes a las tres muestras.

Los tres AcMo están constituidos por un grupo de cuatro a cinco bandas de diferente movilidad, que corresponden a isoformas de glucosilación diferencial. El pI promedio y rango determinado para cada AcMo, fue: **13B4**=7,04 (6,84-7,23), **11C4**=6,37 (6,24-6,49) y **12A1**=6,58 (6,38-6,77).

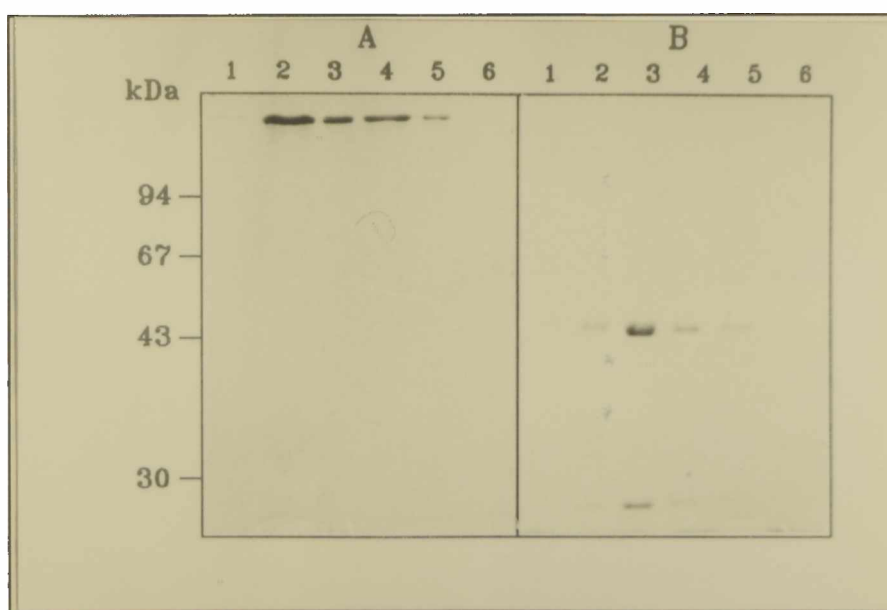


Figura 4.5. Análisis por SDS-PAGE de fracciones colectadas del AcMo 13B4. SDS-PAGE en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B) de seis fracciones del pico mayoritario de la elución del AcMo 13B4 indicada en la figura 4.4B.

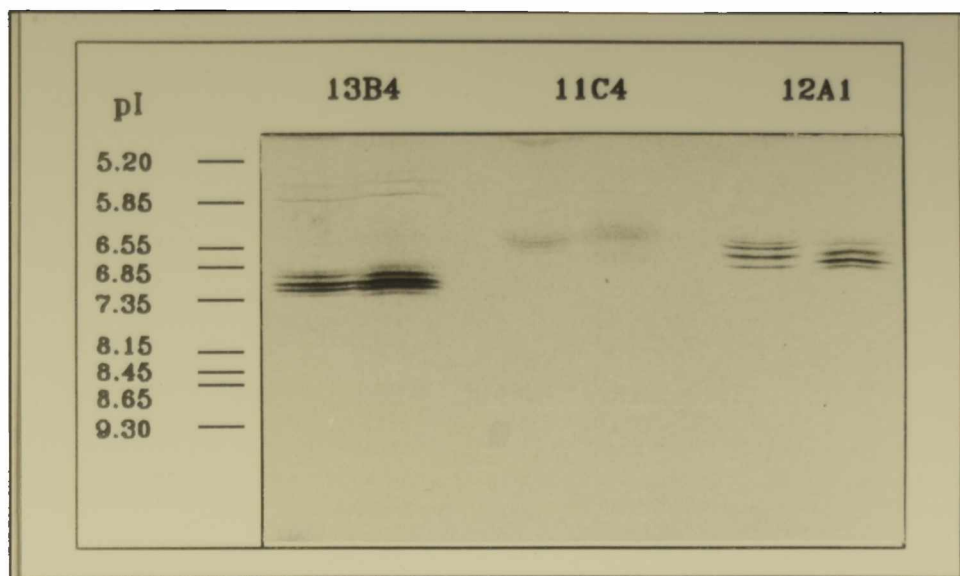


Figura 4.6: Análisis por isoelectroenfoque de los AcMo 13B4, 11C4 y 12A1 purificados por FPLC. A la izquierda se indican los marcadores de punto isoeléctrico.

4.6.- Reactividad de los AcMo purificados frente a gliadinas separadas por A-PAGE.

Los AcMo purificados fueron analizados por "immunoblotting", frente a gliadinas separadas por A-PAGE. En la **figura 4.7**, se observa que los tres AcMo reconocen α -, β - y γ -gliadinas pero en forma diferente.

El AcMo 13B4 (calle 1) reconoce α -, β - y γ -gliadinas y débilmente algunas ω -gliadinas. El AcMo 11C4 (calle 2) reconoce α -, β - y γ -gliadinas pero más selectivamente que el anterior. En cambio, el AcMo 12A1 (calle 3) reconoce más intensamente un grupo de γ -gliadinas y presenta una marcada reactividad hacia varias ω -gliadinas. Como comparación del perfil de reactividad, se muestra el análisis con el suero de conejo anti-gliadinas (calle 4).

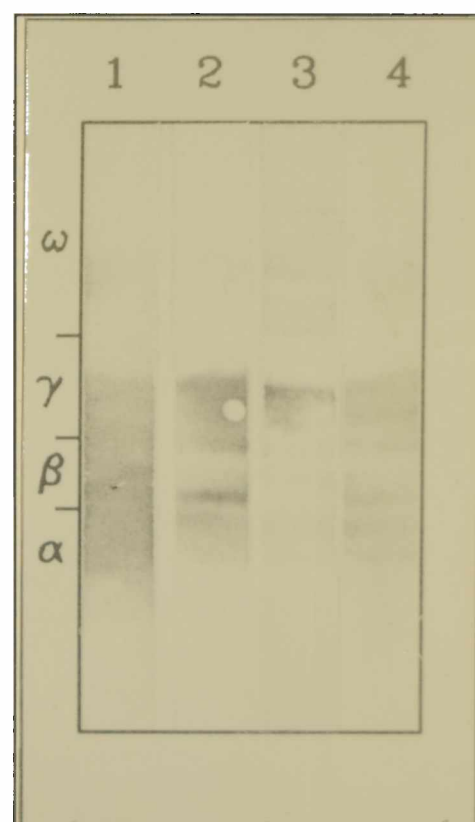


Figura 4.7: Análisis de la reactividad de los AcMo purificados. "Immunoblotting" frente a gliadinas separadas por A-PAGE de los AcMo: 13B4 (1), 11C4 (2) y 12A1 (3) y del suero de conejo anti-gliadinas (4).

4.7.- Análisis de epitopes reconocidos por los AcMo.

Las prolaminas presentan extensas regiones formadas por secuencias repetitivas con unidades de 5 a 9 aminoácidos, las que son inmunógenos fuertes. Gran parte de la respuesta inmune está dirigida a estas estructuras, encontrándose con facilidad solapamiento en los epitopes reconocidos (Skerritt y Underwood, 1986; Festenstein y col., 1987; Brett y col., 1990; Skerritt y Hill, 1990). Por lo tanto, dado que gran parte de esta reactividad está dirigida contra esas regiones, se analizó si existían pares de AcMo que reconocieran el mismo epitope o epitopes solapados.

Con el objeto de disponer de ensayos de alta capacidad de detección, se empleó el sistema de amplificación basado en la interacción de alta afinidad entre biotina y estreptavidina. Para este fin, los AcMo previamente purificados por FPLC, fueron conjugados con biotina (protocolo 11.).

El análisis de epitopes reconocidos se realizó mediante un ensayo de competición simultánea. Para esto, se estudiaron siete AcMo, incubando cada uno de ellos frente a un AcMo biotinilado (11C4 o 13B4) en presencia de gliadina en fase sólida.

En la **figura 4.8A**, se muestra el resultado de éste análisis empleando el AcMo 11C4 biotinilado. Se observa que sólo existe desplazamiento significativo del AcMo biotinilado cuando éste es competido consigo mismo. Por lo que, se concluye que 11C4 no interacciona con epitopes reconocidos por los otros AcMo analizados. Resultados similares se obtuvieron al emplear el 12A1 biotinilado (resultado no mostrado).

Cuando se realizó el mismo ensayo pero empleando el AcMo 13B4 biotinilado, se encontró que éste era desplazado por 13D1 pero sólo a altas concentraciones (**figura 4.8B**). Este resultado sugiere que ambos AcMo podrían reconocer epitopes solapados presentes en algunas prolaminas.

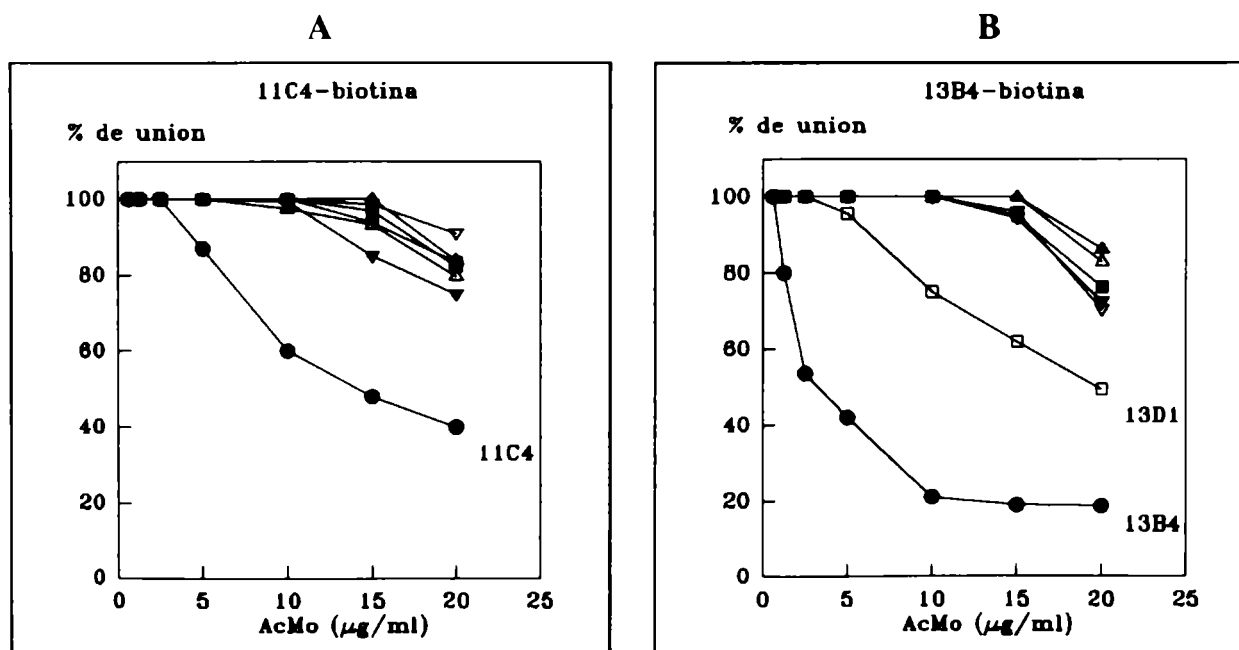


Figura 4.8: Análisis de epitopes reconocidos por los AcMo. Ensayo de competición simultánea entre los AcMo: 12A1, 11C4, 13B4, 13D1, 14B4, 14B6 o 14D4 y 11C4 biotinilado (A) o 13B4 biotinilado (B), frente a gliadina inmovilizada en fase sólida (10 $\mu\text{g/ml}$). En ordenadas se expresa el porcentaje de unión respecto al control sin AcMo competidor y en abscisas, la concentración del AcMo no biotinilado.

4.8.- Enzimoimmunoensayos cuantitativos con AcMo anti-prolaminas.

Se analizaron en paralelo dos formatos de enzimoimmunoensayos. El primero consistió en un ELISA competitivo secuencial. El segundo diseño fue un ELISA de captura con un AcMo, empleando como segundo anticuerpo el mismo AcMo biotinilado.

4.8.1.- Desarrollo de un ELISA competitivo secuencial con AcMo.

Se diseñó un ELISA competitivo secuencial, empleando los AcMo biotinilados. Las condiciones de preincubación y de competición empleadas fueron las mismas que las optimizadas para el ELISA competitivo con anticuerpos policlonales.

Para cada AcMo biotinilado, se estableció por titulación, la dilución de trabajo como aquella que permite obtener un 80-90% de unión máxima. En la **figura 4.9A**, se observa que el AcMo 13B4

conjugado a biotina es el que presenta mayor actividad. Para los AcMo 13B4, 11C4 y 12A1, aproximadamente el 90% de unión máxima se obtiene a diluciones de 1/3200, 1/200 y 1/1600, respectivamente.

Los tres AcMo conjugados a biotina fueron empleados en el ELISA competitivo secuencial. Para el ensayo cuantitativo los valores de DO_{405nm} fueron transformados por la función logit. Se observó que el AcMo 13B4 presentaba una buena respuesta lineal con alto nivel de detección. A diferencia de éste, los AcMo 11C4 y 12A1 dieron rectas con bajas pendientes (**figura 4.9B**).

El análisis cuantitativo por ELISA competitivo secuencial empleando el AcMo 13B4 biotinilado presenta un 50% de inhibición igual a 500 ng/ml y un límite de detección (test t, 99% de confianza) de 150 ng/ml. Para el análisis de una muestra en dilución 1/50 o 1/10, el límite de detección es de 15 mg/100 g o 3 mg/ 100g de producto.

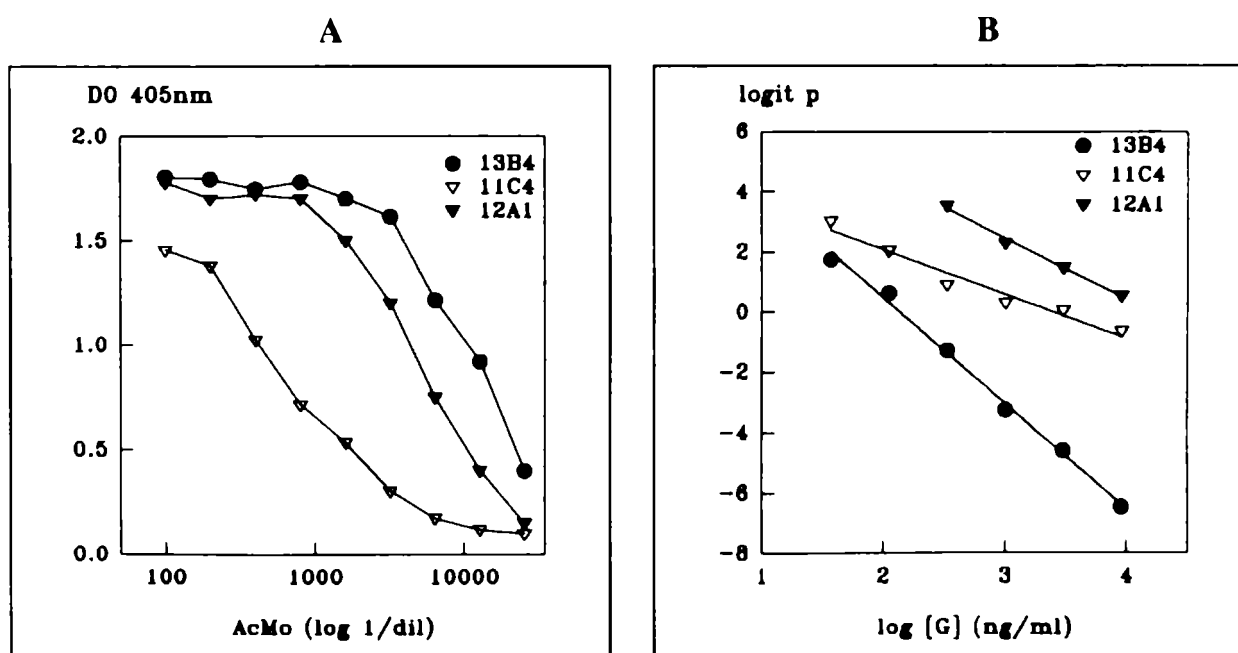


Figura 4.9: ELISA competitivo empleando los AcMo: 12A1, 11C4 y 13B4. A- Curvas de titulación, frente a gliadina en fase sólida (10 μ g/ml) y B- Cuantificación de gliadinas por ELISA competitivo, logit p en función del log [gliadinas].

4.8.2.- ELISA de captura con AcMo.

Con el objeto de optimizar un enzimoimmunoensayo de captura, se determinó la concentración de sensibilización de la placa para cada AcMo. En la **figura 4.10A**, se observa que la concentración óptima de AcMo sensibilizante es de aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$. Cuando se trabajó en las mismas condiciones experimentales para los tres AcMo, incubando con gliadina a concentración saturante (10 $\mu\text{g/ml}$), se observó que con 11C4 y 12A1, se obtienen valores de $\text{DO}_{405\text{nm}}$ cercanos a 1,5, mientras que para 13B4 los valores máximos alcanzados llegaron a 0,8.

En la **figura 4.10B**, se muestra un ELISA de captura con una curva de calibración con soluciones de gliadinas en el rango de 50 pg/ml a 20 $\mu\text{g/ml}$, empleando una dilución 1/30 de cada AcMo biotinilado. Se observa que los mejores resultados se obtienen empleando el AcMo 12A1. La curva para el 11C4 está desplazada a mayores concentraciones, lo que conduce a un ensayo de menor detectabilidad (límite de detección: 150 ng/ml). En forma análoga, el AcMo 13B4

presenta una curva de saturación a mayores concentraciones de gliadina y además, dado que la saturación se alcanza a valores de absorbancia menores que para los otros dos AcMo (**figura 4.10A**), se obtiene un ensayo con pequeño rango de trabajo y baja sensibilidad (resultado no mostrado).

De acuerdo a los resultados mostrados en la **figura 4.10B**, se concluye que 12A1 es el AcMo de elección para el desarrollo de un ELISA de captura. La curva de calibración obtenida para el AcMo 12A1 presenta un rango de respuesta lineal entre 1 ng/ml y 100 ng/ml, con un límite de detección (test t, 99% de confianza) de 10 ng/ml. Para el análisis de una muestra en dilución 1/50, el límite de detección es de 1 mg/100 g.

En la **figura 4.10B**, se muestra también la curva obtenida para el ensayo de captura del "Gluten assay kit" Cortecs Diagnostic UK, cuyo límite de detección es de 160 ng/ml. Se observa que este ensayo tiene menor detectabilidad que el ensayo de captura empleando el AcMo 12A1.

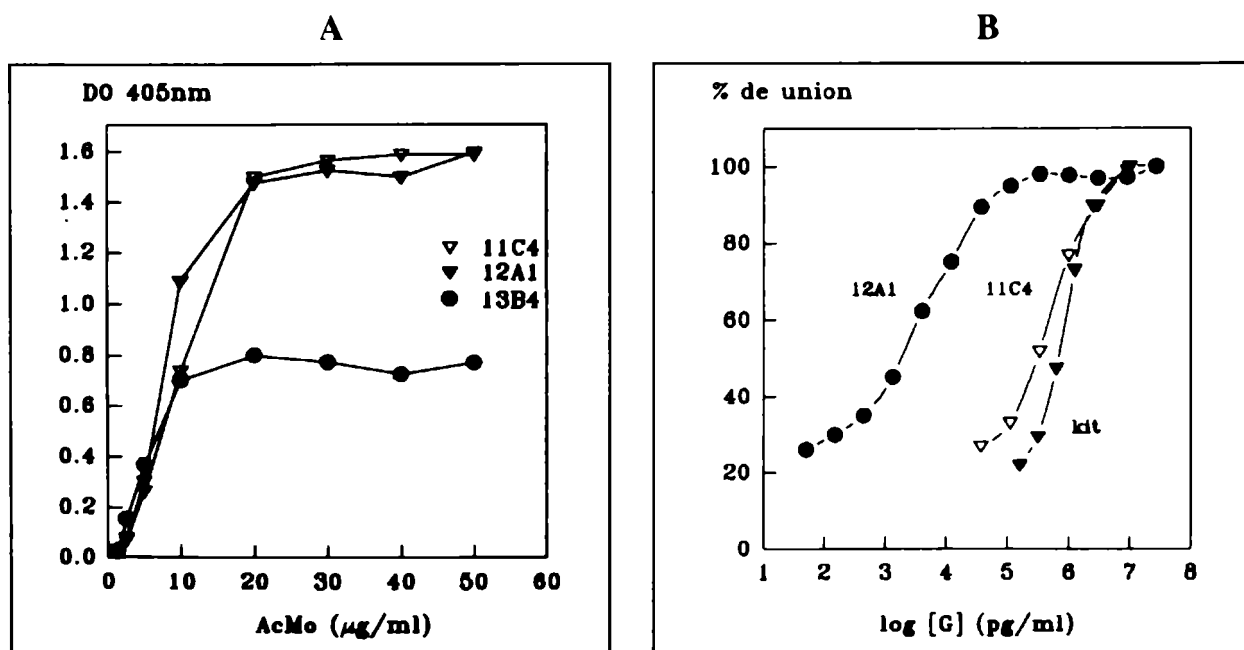


Figura 4.10: ELISA de captura. A- Determinación de la concentración de los AcMo: 13B4, 11C4 y 12A1, para la sensibilización y B- Cuantificación de gliadinas por ELISA de captura con los AcMo 12A1 y 11C4, y comparación con un kit comercial.

4.9.- Discusión.

El esquema de inmunización y el método de selección de hibridomas ("screening"), adoptados han permitido lograr, como resultado de la fusión celular, un alto número de hibridomas secretores de anticuerpos anti-prolaminas. Muchos de ellos fueron del isotipo IgG₁ y mostraron alta actividad en análisis posteriores. Estos resultados contrastan con los encontrados en otras publicaciones donde la fusión fue de baja eficiencia, el isotipo predominante era IgM o los AcMo obtenidos eran, en general, de baja afinidad (Freedman y col., 1987).

El "screening" por ELISA en paralelo frente a gliadina total y a la *fracción enriquecida en ω-gliadinas*, seguido por "immunoblotting" frente a la *fracción proteínas totales de trigo*, permitió una selección eficaz de varios AcMo cuyo comportamiento en cuanto a perfil de reconocimiento y actividad, resultaron útiles.

La complejidad del sistema de las prolaminas, es puesta de manifiesto en el análisis por "immunoblotting" de las **figuras 4.1 y 4.2**.

Se sabe que las regiones repetitivas son inmunógenos fuertes (Skerritt y Underwood, 1986; Festenstein y col., 1987; Brett y col., 1990; Skerritt y Hill, 1990) y es probable, que gran parte de la reactividad de los AcMo obtenidos esté dirigida hacia epitopes repetitivos. Esto es evidente en el análisis mostrado en la **figura 4.2**, ya que se observa que los AcMo reconocen un alto número de proteínas de diferentes grupos de un cereal, además de reconocer las prolaminas homólogas en los otros cereales.

El análisis de los perfiles de reconocimiento por "immunoblotting", junto con los datos estructurales y los rangos de Mr. en los que migra cada grupo de las prolaminas en SDS-PAGE, permitieron una caracterización parcial de las reactividades de varios de los AcMo producidos.

Dado que los AcMo pueden interactuar con epitopes presentes en las secuencias

repetitivas, se analizó mediante ELISA de inhibición, si diferentes pares de AcMo reconocían el mismo epitope o epitopes solapados. En especial se estudió a los AcMo 11C4 y 12A1, que presentan un similar perfil de reconocimiento de prolaminas de los cereales nocivos a los enfermos celíacos. Estos AcMo son el ejemplo del patrón de más amplio reconocimiento. Esto puede atribuirse a la interacción con un tipo de secuencia frecuentemente expresada o con varios tipos de secuencias repetitivas similares. Aunque, entre ellos, es posible observar pequeñas diferencias en la reactividad (**figuras 4.1 y 4.2**).

Los resultados obtenidos en el ELISA de inhibición de siete AcMo muestran que no existe competición entre ellos, y en especial, que los AcMo 11C4 y 12A1 reconocen epitopes diferentes (**figura 4.8A**).

También fue analizado, por ELISA de inhibición, el AcMo 13B4, el que resultó parcialmente desplazado por el AcMo 13D1 (**figura 4.8B**). Este resultado parece discordante con el obtenido en el análisis por "immunoblotting" (**figuras 4.1 y 4.2**), ya que mientras el AcMo 13B4 era específico de algunas gliadinas, el AcMo 13D1 había mostrado ser selectivo para HMW-gluteninas. Este resultado podría deberse a que el AcMo 13D1, además de interactuar con HMW-gluteninas, reconoce epitopes solapados o estructuras relacionadas a las reconocidas por el AcMo 13B4, las que pueden estar presentes en baja frecuencia y no ser detectadas por "immunoblotting". Debe tenerse presente, que la sensibilidad y la forma en que se presenta el antígeno en ambos métodos es diferente, por lo tanto, es necesario un estudio simultáneo por ambas técnicas (Brett y col., 1990; Denery y col., 1994).

El AcMo 11B4 muestra una alta selectividad hacia algunas B-hordeínas. El análisis frente a la *fracción prolaminas* muestra una débil reactividad frente a centeno y triticale. Estos resultados indican que el AcMo 11B4 es altamente selectivo hacia prolaminas de cebada.

El AcMo 14B6 presenta reactividad hacia α -, β - y/o γ -gliadinas y prolaminas de centeno, por tal razón muestra también una fuerte reactividad hacia triticale. Reconoce débilmente B-hordeínas. Se encontró una fuerte reactividad contra gliadinas de Mr. aproximada 35 kDa, la cual sólo es detectada en el extracto etanólico (figura 4.2).

En el análisis de la especificidad por "immunoblotting", es importante tener presente que, en muchos casos, parte de la reactividad de los AcMo es perdida cuando las proteínas son resueltas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Esto se observó con AcMo específicos de gliadinas (Donovan y col., 1989) y en particular con AcMo anti- ω -gliadinas (Brett y col., 1990). Cuando se requiere una caracterización de la reactividad de AcMo anti-prolaminas es imprescindible realizar el estudio frente a proteínas nativas (mediante "immunoblotting" de proteínas separadas por A-PAGE). En el análisis de la figura 4.7, se observa que si bien los tres AcMo purificados reconocen básicamente α -, β - y γ -gliadinas, se encuentran importantes diferencias de reactividad. Los AcMo 13B4 y 11C4 reconocen además, débilmente algunas ω -gliadinas, mientras que el AcMo 12A1 reconoce intensamente un grupo de γ -gliadinas y selectivamente varias ω -gliadinas.

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las condiciones en las que se realiza el "immunoblotting" influyen en la asignación de la reactividad, pues la variación de la concentración del AcMo puede modificar sustancialmente el perfil de reconocimiento (Donovan y col., 1989). Efecto que fue observado con el AcMo 11C4 (figuras 4.1 y 4.2).

Skerritt y Lew (1990), entre otros autores, describen AcMo anti-prolaminas que reconocen proteínas de otros vegetales. En métodos de cuantificación de prolaminas en alimentos para consumo por enfermos celíacos, no es correcto el

empleo de AcMo que reconocen proteínas diferentes a las prolaminas nocivas, por ejemplo maíz, arroz y soja. Por esta razón, se estudió la reactividad cruzada de los AcMo por "immunoblotting" frente a extractos proteicos de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz. Los resultados obtenidos muestran que los AcMo obtenidos reaccionan con proteínas de la fracción prolaminas de los cereales nocivos a los enfermos celíacos y no interaccionan con proteínas de soja, maíz y arroz (figura 4.2).

En ocasiones anticuerpos (poli- o monoclonales) obtenidos por inoculación de un determinado inmunógeno, presentan mejor interacción con una proteína diferente a la empleada en la inmunización. Este fenómeno se denomina heteroclítico y ha sido encontrado en distintos antígenos, y en particular en prolaminas (Festenstein y col., 1987; Skerritt y Lew, 1990). Algunos de los AcMo obtenidos presentan esta característica, por ejemplo, el AcMo 11B4 reconoce intensamente proteínas de cebada y débilmente al inmunógeno (proteínas de trigo).

Se han realizado análisis de especificidad de AcMo estudiando su reactividad frente a los péptidos correspondientes a unidades de secuencias repetitivas (Brett y col., 1990; Andrews y Skerritt, 1994). Estos estudios permiten una fina evaluación del reconocimiento de cada AcMo, aunque en ocasiones, su utilidad es limitada. Esta limitación es debida a que los epitopes son principalmente de tipo conformacional, o en particular para este sistema, a que las regiones repetitivas presentes en las moléculas, poseen pequeñas diferencias, que conducen a interacciones de afinidad muy variada. Estas características determinan que la interacción real, con cada prolamina, pueda no correlacionar con la información obtenida del análisis frente a los péptidos aislados.

El análisis por "immunoblotting" de la fracción proteínas totales de doce cultivares de trigo, resueltos en SDS-PAGE frente al AcMo 12A1 (figura 4.3), muestra perfiles de reconocimiento muy diferentes para varios de los cultivares estudiados. La capacidad para discriminar entre cultivares es notablemente incrementada cuando se emplean varios AcMo. En este sentido, se evaluaron los AcMo: 12A1, 11C4, 14B6 y 13B4. El análisis comparativo permitió obtener una clara diferenciación entre los doce cultivares estudiados. De esta manera, como también fue propuesto por otros autores (Dawood y col., 1989), si bien otras técnicas analíticas, como IEF y RP-HPLC, tienen mayor potencial de resolución, el empleo de un panel de AcMo como el obtenido puede contribuir a la caracterización o diferenciación de cultivares.

Para la mayoría de los usos, los AcMo pueden ser empleados como líquido ascítico. Sin embargo, en ocasiones se requiere disponer de productos altamente purificados. Con este fin, se desarrolló una separación cromatográfica por FPLC de intercambio aniónico después de una precipitación salina. Se obtuvo buena recuperación de los AcMo, con alto grado de pureza y actividad biológica (figura 4.4).

Los AcMo purificados fueron analizados por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y por IEF, lo que permitió verificar al alto grado de pureza alcanzado, detectándose sólo una mínima contaminación (figuras 4.5 y 4.6). Además, el análisis por IEF, mostró que los AcMo presentan microheterogeneidad, apareciendo un grupo de cuatro a cinco bandas, debidas a efectos postraduccionales de glucosilación diferencial, lo que ya ha sido observado por varios autores (Dwek y col., 1993). Por esta razón, los resultados del análisis por IEF fueron expresados como pI promedio y rango, 13B4 = 7,04 (6,84-7,23), 11C4 = 6,37 (6,24-6,49) y 12A1 = 6,58 (6,38-6,77). Estos resultados, junto con el hecho de que los tres

AcMo son de isotipo IgG₁, permiten, en parte, explicar los perfiles de elución obtenidos en la purificación por FPLC de intercambio aniónico.

Con el objeto de desarrollar enzimoimmunoensayos cuantitativos empleando el sistema de amplificación biotina-estreptavidina, los tres AcMo purificados fueron conjugados con biotina, y se evaluaron dos formatos de ensayos: un ELISA competitivo y un ELISA de captura.

El primer formato de ensayo analizado fue un ELISA competitivo secuencial empleando las mismas condiciones que para el ensayo con anticuerpos policlonales. En este ensayo se observó, cuando se graficó la respuesta como logit en función del log [gliadinas], que los AcMo 12A1 y 11C4 presentaban rectas de baja pendiente, lo que conduce a ensayos de baja sensibilidad y detectabilidad (figura 4.9B). Resultado por el cual, estos AcMo no son adecuados para este formato de ensayo.

El AcMo 13B4 mostró ser el AcMo de elección para un ELISA competitivo. Se obtuvo un ensayo con un 50% de inhibición de 500 ng/ml y un límite de detección (test t, 99% de confianza) de 150 ng/ml, correspondiendo, para un análisis de una muestra en dilución 1/50, a 15 mg/100 g. Otros autores (Hill y Skerritt, 1990), describen un ELISA competitivo con un AcMo anti- ω -gliadinas de menor detectabilidad que el ensayo desarrollado, cuyo límite de detección es de 200 mg/100 g, empleando la misma dilución de la muestra.

En el segundo caso, ELISA de captura, los mejores resultados fueron obtenidos con el AcMo 12A1. A diferencia, el AcMo 11C4 presentó una curva desplazada hacia más altas concentraciones de gliadinas (figura 4.10B).

Un hecho particular se encontró con el AcMo 13B4, el que presentó la mayor actividad comparada en un ensayo de titulación (figura 4.9A), sin embargo, cuando se lo analizó en ELISA de captura, se obtuvieron valores más

bajos que para los otros dos AcMo (figura 4.10A). Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que si bien los epitopes reconocidos por el AcMo 13B4 son repetitivos pueden estar presentes con baja frecuencia, de tal manera que la captura y revelado con el mismo AcMo se ve limitada, fenómeno similar al observado por Skerritt y Hill (1990).

El ELISA de captura desarrollado con el AcMo 12A1 presenta respuesta lineal en el rango 1 ng/ml a 100 ng/ml y un límite de detección (test t, 99% de confianza) de 10 ng/ml (figura 4.10B). Mediante este ensayo, cuando una muestra es analizada a dilución 1/50, el límite de detección alcanzado es de 1 mg/100 g de producto.

El ELISA de captura ha sido un diseño ampliamente utilizado en ensayos cuantitativos de prolaminas.

Freedman y col. (1987), para desarrollar un ELISA de captura, emplearon suero de conejo anti-gliadinas como captura y un AcMo IgM anti-gliadinas como segundo anticuerpo. Este ensayo tiene un límite de detección de 15 ng/ml, pero no reconoce ω -gliadinas y presenta baja reactividad contra proteínas de cebada y centeno. Estas características conducen a que este ensayo no sea adecuado para la cuantificación de prolaminas en alimentos.

El ensayo desarrollado por Skerritt y Hill (1990), empleando un AcMo anti- ω -gliadinas, fue adoptado como método oficial por la AOAC (Skerritt y Hill, 1991). El límite de detección de este ensayo es de 160 ng/ml y dado que el AcMo reconoce ω -gliadinas (las gliadinas más estables térmicamente), el método es aplicable a productos alimenticios que en su fabricación sufrieron tratamiento térmicos.

Cuando se comparó la curva obtenida en el ensayo desarrollado en este estudio, con la del kit comercial (figura 4.10B), se observó claramente que el kit presenta una curva desplazada a

concentraciones más altas y por lo tanto, una detectabilidad mucho menor que la del ELISA desarrollado en este estudio.

El ensayo comercial presenta algunos inconvenientes. En la curva de calibración, que es sigmoidea, los autores consideran como límite de detección al punto más bajo de la curva, el cual no se encuentra dentro de la región de respuesta lineal, si no que pertenece a una región de baja pendiente y por lo tanto, de baja precisión. Además, el límite de detección de prolaminas en alimentos es de 16 mg/100 g, por lo que no presenta una detectabilidad acorde con la propuesta por la OMS (Codex Alimentarius).

El ensayo del kit se basa en el reconocimiento de ω -gliadinas, las que constituyen en promedio, sólo el 10% de las gliadinas, disminuyendo la capacidad de detección del ensayo. Por otra parte, se ha observado una variación en el contenido de ω -gliadinas entre diferentes cultivares (6-20%), lo que origina, un error en la cuantificación (-44% a +80%)(Ellis y col., 1994). Si bien éste es un hecho a tener en cuenta, el resultado final puede que no sea afectado significativamente, ya que en general, en la fabricación de alimentos suelen emplearse harinas que son mezclas de diferentes cultivares.

Ellis y col. (1994), desarrollaron un ELISA empleando un suero de conejo anti-gliadinas como captura y un AcMo anti- α -gliadinas como segundo anticuerpo. El AcMo fue obtenido por inmunización con un péptido de 54 aminoácidos de la región N-terminal de α -gliadinas. Reconoce α -, β -, γ - y ω -gliadinas, y prolaminas de cebada, centeno y avena, aunque con muy diferente afinidad. También reconoce α -, β -, γ - y ω -gliadinas, tratadas térmicamente (100 °C, 30 min), siendo la interacción con ω -gliadinas la menos afectada. Este ensayo tiene un límite de detección de 15 ng/ml, nivel de detectabilidad menor al obtenido con el ensayo desarrollado en este estudio.

5.- Estudio de la reactividad de los anticuerpos séricos de enfermos celíacos.

5.1.- Análisis de especificidad de los anticuerpos anti-prolaminas.

Con el objeto de analizar la respuesta inmune humoral de enfermos celíacos, la reactividad de los anticuerpos séricos anti-prolaminas fue estudiada por "immunoblotting". Dado que la enfermedad está fuertemente asociada a HLA, se estudiaron pacientes que expresan HLA-DQ2 pero que difieren en la región DR.

En la **figura 5.1** se observa el análisis por "immunoblotting" de los anticuerpos séricos de 20 pacientes celíacos, frente al extracto de proteínas totales de trigo resuelto por SDS-PAGE. A pesar de que en muchos casos el registro es muy tenue (en especial para los anticuerpos de clase IgA, por ejemplo los sueros: 5, 10, 11 y 19), es evidente

que no existe un perfil conservado o característico de reactividad. Las diferencias de reconocimiento son detectadas aún dentro de los grupos de pacientes que comparten el mismo HLA, como puede observarse para los sueros 6, 7, 8, 9 y 10, de pacientes que expresan DR 11/7, tanto para los anticuerpos séricos IgG como IgA. Además, en ciertos casos para un mismo suero, la reactividad de anticuerpos IgG e IgA es notoriamente diferente, como sucede con los sueros 3, 4, 9, 12 y 17.

Se observa que la mayoría de los sueros reconocen proteínas de la región HMW-gluteninas, pero analizado en conjunto, es posible detectar reactividad contra todas las prolaminas.

No se observó que un grupo de gliadinas fuera preferencialmente reconocido.

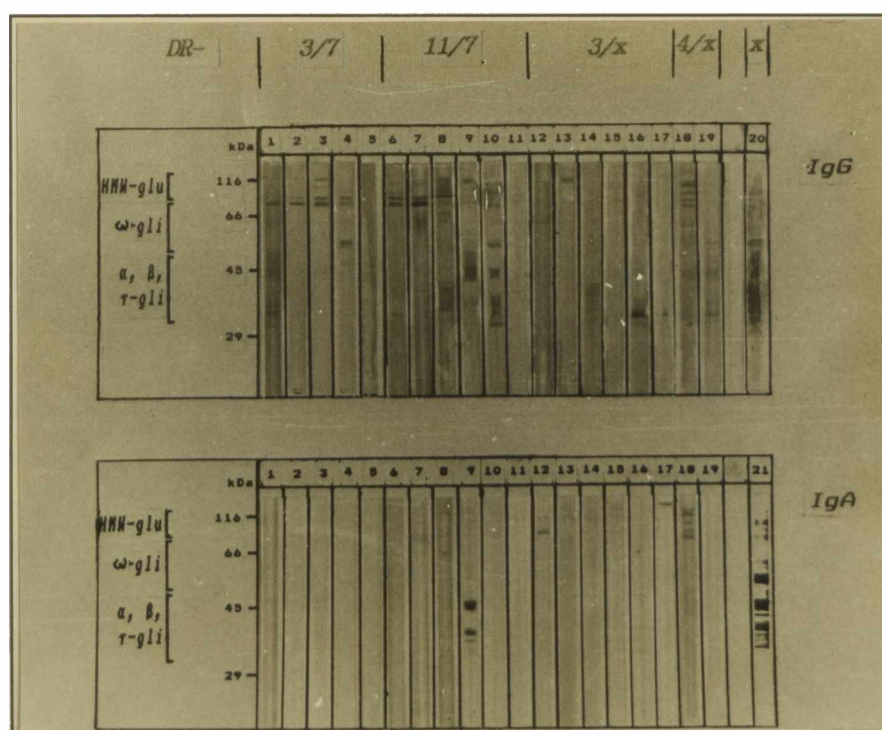


Figura 5.1. Análisis por "immunoblotting" de la reactividad de los anticuerpos séricos de enfermos celíacos. Los pacientes celíacos fueron agrupados de acuerdo a su tipificación HLA. Los sueros fueron diluidos 1/20 y analizados frente al extracto total de proteínas de trigo resuelto por SDS-PAGE (10-15%).

5.2.- Análisis por ELISA de los anticuerpos séricos anti-gliadinas.

Se analizó la reactividad de los anticuerpos séricos IgG e IgA de enfermos celíacos, por ELISA indirecto, empleando fracciones de gliadinas purificadas por FPLC de intercambio catiónico.

Los grupos de pacientes analizados corresponden a: enfermos celíacos con enteropatía activa (Act), pacientes en tratamiento (DLG) y en desafío con ingesta de gluten (Des). Además de población control normal, se estudió un grupo de pacientes con enfermedad gastrointestinal no celíaca (GNC) y un grupo con parasitosis intestinal (P).

Las fracciones de gliadinas empleadas fueron: el extracto de gliadinas total, una fracción compuesta mayoritariamente por ω -gliadinas y una fracción rica en α -, β - y γ -gliadinas.

En la **figura 5.2** se muestran los resultados de los inmunoensayos y se indican para cada grupo, el número de casos positivos respecto al total analizado. El valor de corte se estableció como la media de la población normal + tres desvíos estándar.

Se observa que los enfermos celíacos con enteropatía activa presentan alta respuesta anti-gliadinas frente a las mezclas antigénicas ensayadas.

El análisis de la reactividad de los anticuerpos séricos frente a la fracción que contiene ω -gliadinas muestra que los niveles de IgG son más elevados que los de IgA, encontrando una relación de positivos de 7/10 y 8/10, respectivamente (**figura 5.2 A y B**).

Los pacientes en tratamiento presentan en general menores niveles de anticuerpos que los pacientes con enteropatía activa.

En la población estudiada, sólo dos pacientes corresponden a un seguimiento realizado con toma de muestra en los estadios de enteropatía activa y

bajo tratamiento. En ambos casos, se observó una significativa disminución de los niveles de los anticuerpos anti-gliadinas con el tratamiento .

De la población de sueros analizados se destacan tres casos:

Caso A: corresponde al suero de un paciente celíaco con enteropatía activa. Resulta negativo en la determinación de anticuerpos anti-gliadinas y es también negativo en la determinación de EMA.

Caso B: corresponde al suero de un paciente control con enfermedad gastrointestinal no celíaca, que resulta positivo en las determinaciones de anticuerpos anti-gliadinas y EMA.

En el mismo grupo (GNC), se observa un suero con resultado positivo para IgG, mientras que es negativo para anticuerpos IgA anti-gliadinas y anti-endomisio.

Caso C: corresponde a un paciente con parasitosis intestinal, el cual resulta positivo en la determinación de anticuerpos anti-gliadinas, pero no se dispone del resultado de EMA y no puede descartarse la presencia de EC simultánea a la parasitosis.

Un análisis similar puede realizarse al observar la reactividad de los anticuerpos séricos frente a la fracción que contiene α -, β - y γ -gliadinas (**figura 5.2 C y D**).

Resultados comparables se obtuvieron empleando el extracto total de gliadinas (resultado no mostrado).

La mayoría de los sueros ensayados presentan niveles similares de anticuerpos anti-gliadinas frente a las tres fracciones estudiadas. Sin embargo, en algunos casos, se encuentra una respuesta más intensa contra una de las fracciones. En la **figuras 5.2 B y D**, se muestran como ejemplo el caso D, que presenta mayor reactividad frente a la fracción que contiene ω -gliadinas que a la fracción que contiene α -, β - y γ -gliadinas; mientras que en el caso E sucede lo inverso.

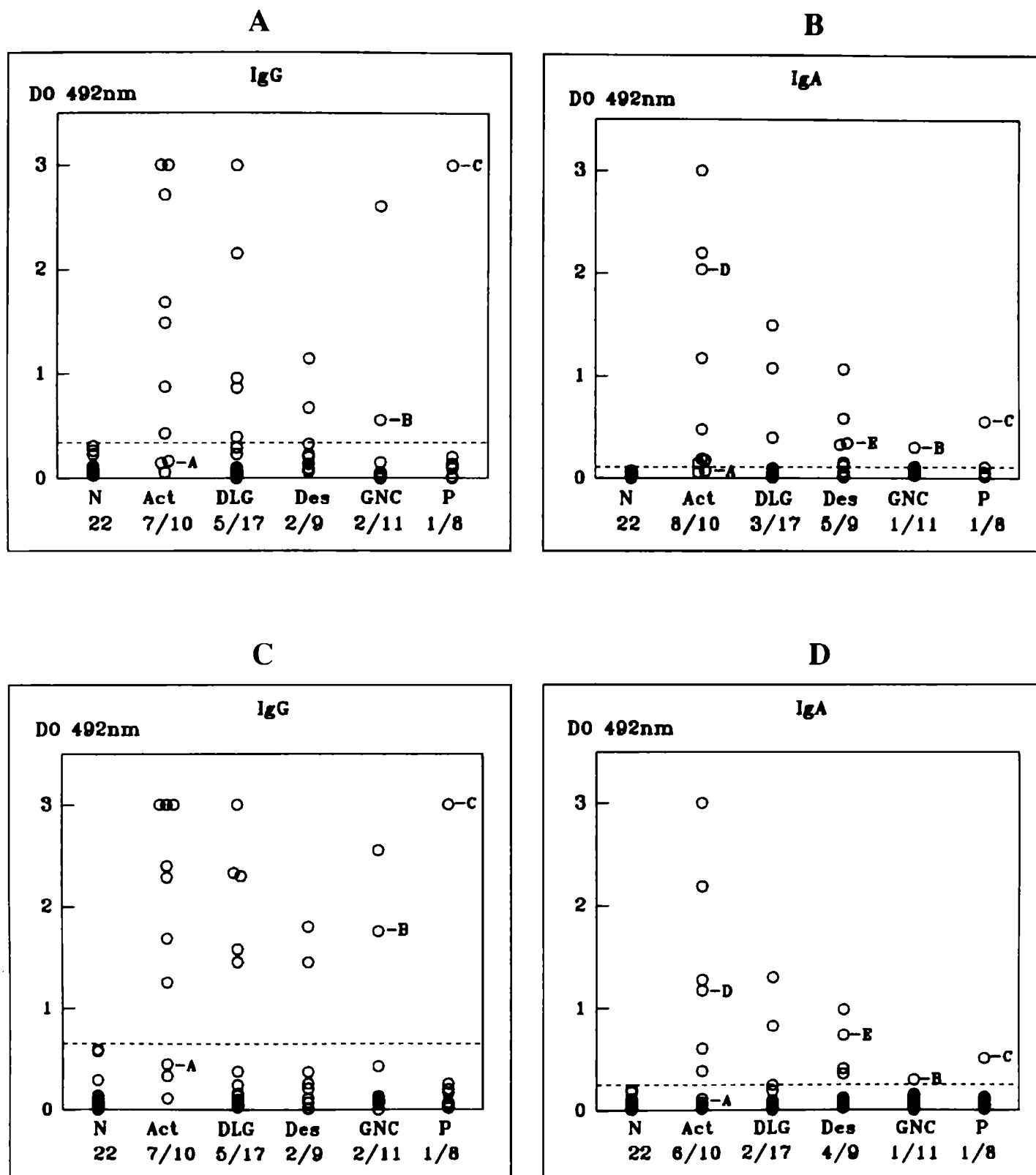


Figura 5.2. Análisis por ELISA indirecto de anticuerpos séricos frente a fracciones de gliadinas. Las mezclas antigénicas empleadas son: fracción rica en ω -gliadinas (A y B) y fracción rica en α -, β - y γ -gliadinas (C y D). Los sueros corresponden a: población control normal (N), enfermos celíacos: con enteropatía activa (Act), en tratamiento (DLG) y en desafío (Des), pacientes con enfermedad gastrointestinal no celíaca (GNC) y pacientes con parasitosis intestinal (P). Los sueros fueron analizados para IgG e IgA a dilución: 1\800 y 1\100, respectivamente. Los resultados corresponden a los valores medios de experimentos por duplicado. Las líneas de trazos indican el valor de corte de cada ensayo.

Tabla 5.1. Valores porcentuales de los índices de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, de la determinación de anticuerpos séricos frente a distintas fracciones de gliadinas.

Fracción gliadinas	Clase	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Totales	IgG	70	84	70	84
	IgA	60	95	88	78
α-, β- y γ-	IgG	70	84	70	84
	IgA	60	90	75	81
ω-	IgG	70	84	70	84
	IgA	80	90	80	90

En la **Tabla 5.1**, se indican para los ensayos descriptos, los valores de: índice de detectabilidad de positivos (sensibilidad), índice de detectabilidad de negativos (especificidad), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN), considerando la población en análisis a los enfermos celíacos con enteropatía activa y como controles, los pacientes con enfermedad gastrointestinal no celíaca y parasitosis.

$$\text{sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN} \quad \text{VPP} = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$\text{especificidad} = \frac{VN}{VN + FP} \quad \text{VPN} = \frac{VN}{VN + FN}$$

donde, VP y FP: son verdaderos y falsos positivos, y VN y FN: son verdaderos y falsos negativos.

En vista de los resultados obtenidos y los valores de los índices mostrados en la **Tabla 5.1**, la determinación de IgA anti-ω-gliadinas parece ser la más adecuada para el desarrollo de un test serológico para EC.

5.3.- Comparación de las determinaciones de anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio.

Como ha sido comentado en la Introducción (2.9), los anticuerpos anti-endomisio (EMA) de clase IgA son recomendados para el "screening" poblacional. Por esta razón, se compararon, en todos los grupos de enfermos celíacos, datos de EMA disponibles del Hospital de Niños "R. Gutierrez", con los niveles de anticuerpos IgA anti-gliadinas. Los resultados de la determinación de EMA se expresan en grado de positividad.

La población en estudio fue de 36 enfermos celíacos, distribuidos según: pacientes con enteropatía activa (10), pacientes en tratamiento (17), pacientes en desafío (9) y 11 pacientes de grupo control con enfermedad gastrointestinal no celíaca.

En la **figura 5.3** se muestra la distribución de resultados positivos y negativos de las determinaciones de anticuerpos IgA anti-ω-gliadinas e IgA anti-endomisio. Similar análisis se realizó para todas las determinaciones de anticuerpos anti-gliadinas y EMA.

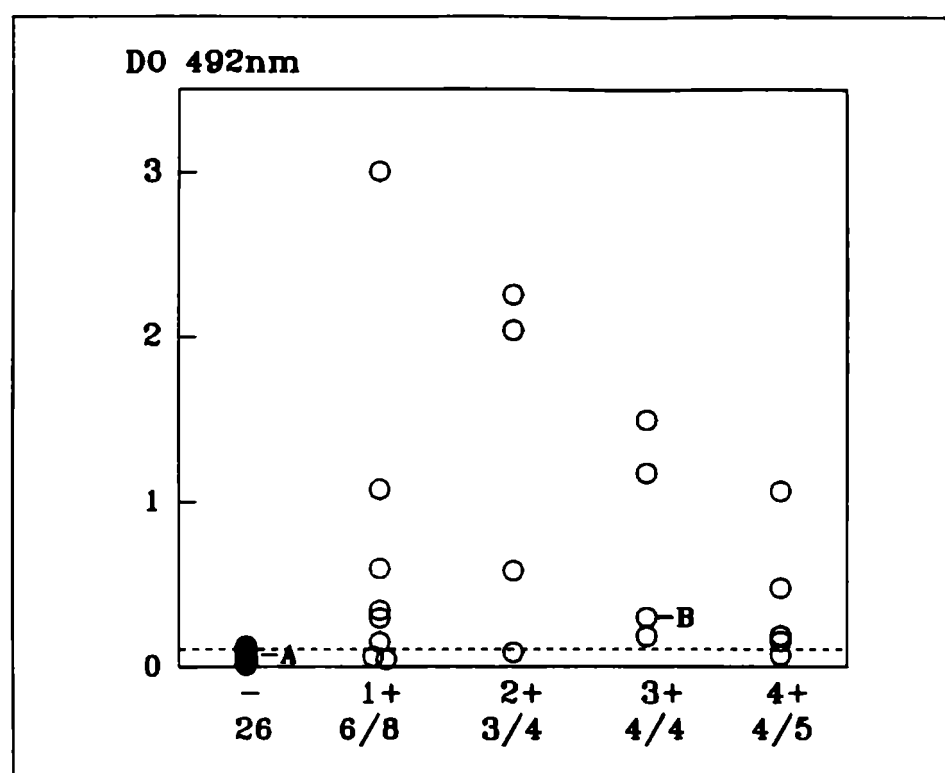


Figura 5.3. Comparación de los resultados de las determinaciones de anticuerpos IgA anti-gliadinas y anti-endomisio. Como antígeno se empleó la fracción que contiene ω -gliadinas. En ordenadas se muestra el nivel de anticuerpos IgA anti-gliadinas y en abscisas el grado de positividad en la determinación de anticuerpos anti-endomisio. Las líneas de trazos indican el valor de corte del ensayo. A y B corresponden a los casos mostrados en la figura 5.2.

Se observa que no hay relación entre el nivel de anticuerpos anti-gliadinas y el grado de positividad en EMA. Sin embargo existe una alta correlación entre resultados positivos y negativos por ambos métodos. En particular, empleando las tres fracciones analizadas, no se observaron falsos positivos en la determinación de anticuerpos anti-gliadinas.

La más alta sensibilidad se logró empleando como antígeno la fracción que contiene ω -gliadinas, pues de los 21 sueros positivos en la determinación de EMA, 17 presentaron niveles de anticuerpos anti-gliadinas por encima del valor de corte.

En la figura 5.3 se muestran los casos de los sueros A y B, mencionados previamente. Se observa que el caso A es negativo por ambos métodos, a pesar de tratarse de un paciente con entoropatía activa (según el resultado de la biopsia). Mientras que el caso B, paciente del grupo control (GNC), es positivo en ambas determinaciones.

En la Tabla 5.2, se muestra en forma comparativa, los resultados de IgA anti-gliadinas referidos a la determinación de EMA. Para esto, se consideró que el ensayo de EMA presenta una eficiencia para la determinación de resultados positivos y negativos verdaderos del 100%. En base a esta comparación, se puede concluir que el uso de la fracción que contiene ω -gliadinas permite obtener los mejores resultados.

Tabla 5.2. Parámetros de la determinación de anticuerpos anti-gliadinas referidos a la evaluación de EMA.

Fracción gliadinas	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
totales	62	100	100	76
α -, β - y γ -	62	100	100	76
ω -	90	100	100	87

5.4.- Discusión.

Los anticuerpos séricos anti-gliadinas y anti-endomisio (EMA) están fuertemente relacionados con la ingesta de gluten y con los cambios morfológicos de la mucosa intestinal. Sus niveles se elevan rápidamente en el período de ingesta de gluten, en especial los de IgG anti-gliadinas, y luego disminuyen lentamente cuando se comienza el tratamiento (DLG) (Lerner y col., 1994). Los niveles de EMA parecen relacionarse más directamente con las alteraciones en la mucosa intestinal (Ferreira y col., 1992).

Los niveles de anticuerpos anti-gliadina tienden a disminuir con la edad y en adultos, se relacionan menos, que en niños, con la ingesta de gluten y con las alteraciones en la mucosa (Maki y col., 1991).

Como es sabido, el criterio diagnóstico definitivo de EC es el examen microscópico de muestras de biopsia duodenal (Marsh, 1992). Esta técnica invasiva y traumática, en especial en niños, no permite una evaluación periódica de la EC. Por esta razón, se han empleado test serológicos (ELISA para anticuerpos anti-gliadinas e inmunofluorescencia para anti-endomisio), en la evaluación de los enfermos celíacos.

Actualmente, la recomendación original de tres biopsias duodenales para la confirmación de EC, ha sido dejada de lado y en general, el diagnóstico se basa en una biopsia y un seguimiento posterior por serología, o ante un cuadro clínico compatible con EC, una biopsia

posterior a una serología positiva. De ahí que se requiere que los test empleados posean alta sensibilidad y especificidad y puedan aplicarse masivamente (Ferguson y col., 1993). Aunque diferentes estudios indican que la determinación por inmunofluorescencia de IgA EMA es la más adecuada (Lerner y col., 1994), se reconoce que la dificultad operativa y su alto costo, provocan serios inconvenientes, en el empleo de esta técnica en "screening" poblacional.

En estudios independientes, Corrao y col. (1994) y Catassi y col. (1994), sugieren un "screening" en pasos, donde la prueba selectiva sea la determinación de anticuerpos anti-gliadinas y los casos positivos evaluarlos mediante IgA EMA como prueba confirmatoria. En el estudio de Corrao y col (1994) realizado en Italia, se analizaron niños sin sospecha clínica de EC de 11 a 15 años de edad, determinando una prevalencia de 1:260, una de las más altas documentadas.

Ambos estudios coinciden en la necesidad de una prueba inicial de IgG e IgA anti-gliadinas por su mayor aplicabilidad y menor costo seguida, en los casos positivos, por la determinación de anticuerpos anti-endomisio.

Por lo tanto, aún en el centro de controversia, en cuanto a la manera más adecuada de realizar el "screening" de enfermos celíacos, la determinación de anticuerpos anti-gliadinas resulta de suma utilidad.

La aplicación de diferentes inmunoensayos, donde se emplea extracto total de gliadinas o digestos enzimáticos (Devery y col., 1989),

gliadina comercial (Arnason y col., 1992; Lerner y col., 1994) o algún grupo de gliadinas (Kelly y col., 1987), ha conducido a resultados contradictorios. Mientras que Levenson y col. (1985), observaron que la respuesta de anticuerpos séricos era comúnmente dirigida a más de un grupo de gliadinas y más intensa para α -, β - y γ -gliadinas que para ω -gliadinas, Kelly y col. (1987) muestran que la mayor reactividad se logra frente a α -gliadinas. En cambio, los resultados de Sjostrom y col. (1992), mostraron que la reactividad era específicamente dirigida a γ -gliadinas. Estudios por "immunoblotting" (Friis y col., 1986 y 1988), también resultaron contradictorios en cuanto a la especificidad de los anticuerpos séricos.

Por otro lado, diferentes estudios muestran que existe respuesta inmune a las prolaminas tanto en enfermos celíacos como en la población normal, y que a su vez ambas poblaciones presentan solapamiento en cuanto a los niveles de los anticuerpos anti-gliadinas y al perfil de reactividad (Levenson y col., 1985). La respuesta en todos los casos se dirige principalmente hacia epitopes de secuencia repetitivas, los que generan intensa reactividad cruzada entre las prolaminas (Devery y col., 1989).

Además, en ningún estudio se logró demostrar que la respuesta estuviera principalmente restringida a determinadas gliadinas.

Para el desarrollo de un inmunoensayo como prueba serológica, es práctica corriente, la selección del antígeno a emplear estudiando la reactividad de los sueros por "immunoblotting". Con este fin, se analizaron los anticuerpos séricos de 20 pacientes celíacos tipificados en su HLA, frente al extracto total de proteínas de trigo resuelto por SDS-PAGE.

En la **figura 5.1**, se observa diversidad en la respuesta inmune de los pacientes. No se encontró un perfil único o característico de reactividad en los anticuerpos de clase IgG o IgA y es posible

observar, para un mismo suero, diferencias de reconocimiento en los anticuerpos de ambas clases. Las diferencias individuales son notorias aún al comparar los pacientes dentro de un mismo grupo HLA.

La variabilidad en el perfil de reactividad podría estar dada, al menos en parte, por el hecho de que los pacientes tipificados en su HLA corresponden a diferentes estadios de la enfermedad.

Si bien existen cambios evidentes en los niveles de los anticuerpos séricos anti-gliadinas cuando comienza el tratamiento o en la etapa de ingesta de gluten, hasta la fecha no se ha documentado que exista un cambio de especificidad. Por lo tanto, es más probable que la variabilidad de reconocimiento resulte de diferentes características individuales.

De estos resultados y del análisis de la bibliografía, se concluye que no se encuentra una respuesta inmune preferencial hacia un determinado grupo de gliadinas.

Maki y col. (1991) analizaron, en parientes de primer grado de enfermos celíacos, la presencia de anticuerpos anti-gliadinas y anti-reticulina, y expresión del fenotipo HLA asociado a EC. No encontraron relación entre los niveles de reactividad de anticuerpos anti-gliadinas y anti-reticulina. Pero observaron que la presencia de serología positiva y fenotipo de HLA eran altamente indicativas de EC (resultado confirmado por biopsia duodenal). Si bien emplearon una determinación de IgA anti-gliadinas de pobre sensibilidad y especificidad, encontraron que en niños, la serología se relacionaba mejor con las alteraciones de la mucosa que en pacientes adultos. Aunque estos autores no analizaron la especificidad de los anticuerpos anti-gliadinas con el fenotipo HLA, sus resultados muestran la utilidad de la determinación conjunta de anticuerpos anti-gliadinas y HLA en la detección de pacientes asintomáticos.

La variación individual observada por "immunoblotting" (figura 5.1), descarta el uso de un único antígeno en inmunoensayos para "screening" de EC. Por lo tanto, se emplearon distintas fracciones de gliadinas separadas por FPLC de intercambio catiónico para la optimización de test serológicos.

Dado el solapamiento en la reactividad de los anticuerpos séricos, entre los enfermos celíacos e individuos de la población normal y enfermos con otras patologías gastrointestinales, la puesta a punto de inmunoensayos requiere el análisis de distintos grupos de individuos. Los enfermos celíacos fueron divididos en tres grupos: enfermos con enteropatía activa, pacientes en tratamiento, y pacientes con ingesta de gluten.

Los resultados obtenidos (figura 5.2) muestran que, tanto para IgG como para IgA, que los enfermos celíacos con enteropatía activa presentan altos niveles de anticuerpos séricos anti-gliadinas, niveles que en conjunto, son menores en el grupo de enfermos en tratamiento.

En los grupos de pacientes en tratamiento o aquellos con ingesta de gluten, los niveles de anticuerpos anti-gliadinas son altamente variables y dependen principalmente de lo estricta que sea la DLG, de la cantidad de gluten ingerido y de características individuales.

Cuando se analizan los resultados para los grupos control de enfermedad gastrointestinal no celíaca y parasitosis intestinal, es posible encontrar casos con niveles de IgG anti-gliadinas tan elevados como en enfermos celíacos con enteropatía activa. En esos casos, los niveles de IgA son negativos o bien superan el valor de corte, pero son comparativamente menores que los de IgG. De ahí que la determinación de IgA anti-gliadinas es más específica que la de IgG. Sin embargo, la determinación de los niveles de IgG es útil en la evaluación del cumplimiento de la DLG y particularmente importante si se considera que aproximadamente 3% de los enfermos

celíacos presentan deficiencia selectiva de IgA (Troncone y Auricchio, 1991).

Los grupos de pacientes celíacos no presentan relación entre sí, es decir no corresponden al seguimiento de un mismo paciente, excepto en dos casos, en los que se observó una importante disminución de los niveles de anticuerpos IgG e IgA anti-gliadinas al comenzar la DLG.

Cuando se analizó la reactividad, frente a distintas fracciones de gliadinas, se observó que, en general, los niveles de anticuerpos para un paciente eran similares para las tres fracciones analizadas. Sin embargo, en varios casos se observaron importantes diferencias de reactividad entre distintas mezclas antigénicas. Este resultado es acorde a la variabilidad individual observada por "immunoblotting" (figura 5.1).

El análisis de los parámetros de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, indican que el uso de la fracción rica en ω -gliadinas parece más adecuado que el empleo de gliadinas de otros grupos. Esto se debe, al menos en parte, a que la población control presenta menor respuesta anti- ω -gliadinas y por lo tanto, se obtiene un valor de corte menor. El inmunoensayo con ω -gliadinas presenta una sensibilidad más alta sin disminución de la especificidad.

La determinación de IgA anti-endomisio (EMA) es considerada el test serológico de elección para EC (Lerner y col., 1994). Por esta razón, se compararon los resultados obtenidos en los inmunoensayos descritos con los datos de EMA obtenidos en el Hospital R. Gutierrez, en los tres grupos de enfermos celíacos y en el grupo control con enfermedad gastrointestinal no celíaca.

En la figura 5.3 se observa que no hay relación entre los niveles de anticuerpos anti-gliadinas y el grado de positividad en la determinación de EMA. Este resultado es similar

al obtenido por Maki y col. (1991) quienes tampoco encontraron relación al analizar anticuerpos anti-gliadinas y anti-reticulina.

Se encontró una alta correlación entre las determinaciones de IgA anti-gliadinas y EMA. En el ensayo descrito, todos los sueros negativos en la determinación de anticuerpos anti-gliadinas fueron también negativos en el ensayo de EMA. Por otro lado, se observó que 17 de los 21 sueros positivos en la determinación de EMA, presentan niveles de anticuerpos anti-gliadinas por encima del valor de corte.

Con el fin de comparar los resultados entre anticuerpos anti-gliadinas y la determinación de EMA, se consideró a este último ensayo como prueba de referencia y se le adjudicó un 100% de eficiencia en la determinación de resultados positivos y negativos verdaderos. En estas condiciones, el cálculo de los parámetros de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, indican que de las mezclas antigénicas analizadas, la fracción que contiene ω -gliadinas es la más adecuada para el desarrollo de un test serológico de EC (**Tabla 5.2**).

Si bien la determinación de IgA anti- ω -gliadinas es menos sensible que la de EMA, en este estudio mostró alta correlación. Dos casos merecen mencionarse, uno se obtuvo en un paciente que presentaba biopsia con alteraciones en la mucosa pero los anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio resultaron negativos. En este caso, se puede sospechar que la alteración en la mucosa puede ser debida a otra condición diferente a EC, ya que tampoco se observó IgG anti-gliadinas. El otro caso se trata de un paciente perteneciente al grupo control, el cual presenta altos niveles de

anticuerpos anti-gliadinas y anti-endomisio, pero la biopsia duodenal es normal. Este caso puede ser indicativo de un paciente asintomático con EC latente.

Respecto a la serología de EC, es necesario considerar a la población asintomática. Estos individuos con leves o marcadas alteraciones morfológicas en la mucosa intestinal presentan anticuerpos anti-gliadinas circulantes, pero no tienen ningún síntoma de EC. Por lo tanto, dada la característica de la enfermedad, un resultado serológico positivo en un individuo sin sospecha clínica de EC, puede ser un falso positivo del método o el hallazgo de un paciente con condición celíaca silente o latente.

Es por eso, que en muchos casos la idea de que un ensayo es poco específico, puede ocultar a individuos que, sin sospecha clínica de EC, pertenecen al grupo de pacientes asintomáticos o también, casos donde la EC está enmascarada con otra patología, como sucede en niños con parasitosis intestinal.

La alta prevalencia de EC y la alta proporción de pacientes con condición celíaca asintomática, requieren de la optimización de test serológicos de alta capacidad de detección y ensayos de aplicabilidad a programas masivos de evaluación.

Los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos anti- ω -gliadinas resultan alentadores en cuanto a su utilidad para el diagnóstico de EC, justifican un estudio más profundo y el análisis de una población de mayor número de pacientes.

Discusión General

La EC es una enfermedad gastrointestinal desencadenada, en individuos susceptibles, por la ingesta de alimentos que contienen prolaminas de trigo, cebada y centeno. Las alteraciones en la mucosa intestinal, así como la sintomatología, desaparecen con una dieta libre de dichas proteínas.

Por lo tanto, siendo el único tratamiento posible, la OMS ha establecido que los alimentos destinados a pacientes celíacos deben presentar un contenido de gluten inferior a 1 mg/100 g de producto. Para esto, se requieren ensayos cuantitativos que permitan certificar la composición de los productos comerciales.

En la cuantificación de gliadinas, inicialmente se emplearon técnicas inmunoquímicas de precipitación en gel de agar. Esta técnica es de baja sensibilidad y poco útil en un sistema tan complejo y de baja solubilidad en soluciones acuosas, como lo es el extracto de prolaminas. Como consecuencia, se obtienen resultados inexactos o que conducen a errores de interpretación, los cuales indican que esta técnica no debe ser empleada en la determinación de prolaminas en alimentos. Sin embargo, en nuestro país, esta metodología es el ensayo de cuantificación oficial en los organismos de control nacionales y provinciales.

Por otro lado, las proteínas del endosperma del grano de trigo presentan propiedades fisicoquímicas particulares, por las que son ampliamente usadas en la industria alimenticia. Aunque, en algunos casos, su adición en productos comerciales puede constituir una adulteración.

Por lo tanto, razones económicas, legales y relacionadas con la prevención y el tratamiento de la enfermedad celíaca, determinan la necesidad de disponer de métodos de cuantificación de alta detectabilidad para el análisis de prolaminas en alimentos.

Para ello se requiere, como primer paso, la caracterización del sistema proteico.

Con este fin, se evaluaron distintas condiciones de extracción de prolaminas de harina de trigo y posteriormente, los extractos fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Como una observación llamativa, algunas bandas de proteínas de los geles, teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 (comúnmente empleado en PAGE), tomaban una coloración rojiza, en vez de la característica tinción azul. Este fenómeno era reproducible y observado tanto en proteínas de trigo, como en cebada y centeno.

Se consideró que profundizar el análisis sobre éste particular fenómeno y relacionarlo con la información estructural y bioquímica disponible en bibliografía, podría contribuir a una mejor caracterización del sistema proteico.

La estructura primaria de las prolaminas presenta un alto contenido de prolina y glutamina, aminoácidos que forman parte de unidades repetitivas que abarcan extensas regiones de la molécula y son responsables, en gran parte, de sus propiedades fisicoquímicas.

Los estudios por técnicas electroforéticas de extractos de proteínas de trigo, cebada y centeno, muestran que algunos componentes de las prolaminas presentan una particular interacción con el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250. La coloración rojiza obtenida se debe a un desplazamiento, hacia menores longitudes de onda, en el espectro de absorción del complejo colorante/proteína.

Este efecto metacromático fue observado tanto en electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) como en PAGE a pH=3 (A-PAGE). Para mejorar su estudio, se establecieron condiciones de registro densitométrico que permiten una rápida y fácil detección de componentes metacromáticos.

En base a los resultados obtenidos se pudo demostrar que los componentes metacromáticos pertenecen a dos grupos homólogos de proteínas: prolaminas de alto peso molecular: HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas y a prolaminas pobres en azufre: ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas, presentes en trigo, cebada y centeno, respectivamente.

El análisis de la información estructural de estas proteínas permite interpretar estos resultados considerando, como responsable del fenómeno metacromático, a las regiones repetitivas que forman una estructura " β -turn" y su repetición en una amplia región, a una estructura " β -spiral". Esto está de acuerdo con el hecho de que en la fracción albúminas-globulinas, donde no hay este tipo de secuencias, no se observa efecto metacromático. A su vez, en α/β -gliadinas las secuencias repetitivas difícilmente forman estructuras " β -turn" en grandes extensiones, pues se encuentran irregularmente distribuidas y separadas por regiones α -hélice. En avena, no se detectó metacromasia y si bien presenta regiones repetitivas, éstas difieren sustancialmente de las encontradas en las prolaminas metacromáticas.

Por otro lado, dada la alta intensidad de color rojizo observado en componentes aislados, en especial en ω -gliadinas, el efecto metacromático resultó de utilidad práctica, ya que en la purificación por FPLC, permitió una rápida identificación de las fracciones que contienen ω -gliadinas.

La necesidad de disponer de gliadinas purificadas ha conducido al empleo de técnicas cromatográficas. Pero dada la alta homología estructural y como consecuencia, la similitud en las propiedades fisicoquímicas, su aislamiento y purificación se han visto enormemente dificultados. Las técnicas cromatográficas convencionales no permiten la obtención de componentes puros. El RP-HPLC presenta la mayor capacidad analítica, pero es poco útil

cuando el objetivo es disponer de cantidad suficiente de prolaminas puras para estudios inmunoquímicos.

Por lo expuesto, se decidió emplear un equipo de FPLC con el fin de purificar prolaminas. La optimización de la cromatografía permitió disponer de gliadinas puras de todos los grupos.

Si bien de menor resolución que el RP-HPLC, la alta reproducibilidad obtenida con la columna analítica Mono-S, permite emplear este sistema en una primera caracterización de cultivares de trigo.

El empleo de columnas de mayor tamaño, aunque con menor capacidad resolutive, permite una mayor recuperación de prolaminas, lo cual resulta útil para la obtención de ω -gliadinas o en un esquema de purificación en pasos, donde las fracciones obtenidas pueden ser recromatografiadas.

La aplicación del FPLC de intercambio catiónico a prolaminas de cebada y centeno, con condiciones similares a las optimizadas para la separación de gliadinas, permitió también obtener algunas hordeínas y secalinas aisladas.

La separación por FPLC permite disponer de gliadinas purificadas para su empleo como inmunógenos y como mezclas antigénicas en métodos inmunoquímicos de cuantificación o en ensayos serológicos para la evaluación de enfermos celíacos.

En términos generales, la cuantificación de prolaminas mediante métodos inmunoquímicos involucra tres factores: la extracción de prolaminas de la muestra, el standard y el ensayo inmunoquímico en sí. Estos factores, junto con las características del sistema de anticuerpos empleado (especificidad y afinidad), determinan la exactitud, confiabilidad y capacidad de detección del ensayo.

Dado que las prolaminas es una compleja mezcla de proteínas, con características de solubilidad ligeramente diferentes, el procedimiento de extracción, en particular el solvente elegido, determina la eficiencia en la recuperación de las prolaminas de la muestra y la composición final del extracto. Se han empleado diferentes protocolos y solventes de extracción, introduciendo variabilidad en los resultados obtenidos y conclusiones discordantes.

Según Skerritt y Hill (1990), el solvente de elección es etanol 40%. Mientras que en el estudio aquí presentado se observa, en base a análisis cuali y cuantitativos, que los solventes más adecuados en la recuperación de prolaminas de todos los grupos son, etanol 70% y 1-propanol 50%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wieser y col. (1994).

Se estudió el comportamiento de las gliadinas en los métodos generales de cuantificación de proteínas. Para esto, se comparó la respuesta obtenida con la de BSA, proteína usualmente empleada como referencia. El análisis por los métodos de Bradford, Peterson y Lowry, muestra que existe una notable diferencia en la relación absorbancia/masa de proteína entre gliadinas y BSA.

Estos resultados permitieron concluir que no es correcto el uso de BSA como referencia en la cuantificación de gliadinas en extractos de prolaminas, razón por la cual, es imprescindible el empleo de un standard de gliadinas.

Por otra parte, se observó que el método de elección, para la determinación de proteínas en extractos de prolaminas, es el de Lowry, puesto que su mayor relación dosis/respuesta conduce a una mayor precisión que la obtenida con los otros dos métodos.

En todo método de cuantificación relativo, tal como ELISA, el standard usado debe presentar un comportamiento similar al del compuesto en

estudio, y su concentración debe ser exactamente conocida. Para obtener una solución de concentración conocida, se requiere que la sustancia empleada como standard sea completamente soluble en el solvente del ensayo. Pero, en el caso de las gliadinas, la imposibilidad de obtener una total disolución conduce a importantes inconvenientes.

Si bien las características de estas proteínas son conocidas (baja solubilidad y tendencia a formar agregados), las dificultades encontradas en la preparación de estándares para la cuantificación de prolaminas no han recibido suficiente atención.

La necesidad entonces de disponer de un standard adecuado condujo a la preparación de soluciones de gliadinas en etanol 70%, las que filtradas por membrana de 0,22 μm y cuantificadas por el método de Kjeldahl, resultan en un standard estable, confiable y útil para la preparación de curvas de referencia, tanto en la determinación de la concentración proteica en extractos de prolaminas por el método de Lowry como en técnicas inmunoquímicas.

Con el objeto de desarrollar un inmunoensayo cuantitativo para el análisis de prolaminas en alimentos, se empleó un ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización de conejos con gliadina comercial. Se optimizaron cada una de las etapas del ensayo, logrando la mayor detectabilidad mediante una preincubación de 2 h y una competición de 30 min. ambas a 37 °C. Esta condición de preincubación favorece la formación de complejos inmunes con el antígeno en fase fluida (gliadina de la muestra en análisis), mientras que tiempos cortos de competición disminuyen la disociación de los complejos formados y la unión del anticuerpo a la fase sólida. En conjunto, ambas condiciones llevan a una más alta detectabilidad.

Este ensayo presentó un límite de detección de gliadinas de 1 ng/ml, nivel que corresponde a 0,1 mg/100 g o 0,02 mg/100 g de producto según la dilución del extracto muestra (1/50 o 1/10, respectivamente). Este nivel de detección cumple con la recomendación de la OMS para análisis de alimentos destinados a enfermos celíacos, y es el más alto alcanzado de los ensayos publicados en bibliografía.

Los resultados obtenidos indican que el ELISA competitivo desarrollado presenta altos niveles de detección, con adecuada precisión aún a muy bajas concentraciones de gliadinas. Puede ser aplicado a muestras de alimentos de composición muy variada y mostró ser adecuado, tanto para productos crudos como para alimentos procesados térmicamente, incluyendo productos carneos.

El análisis cuantitativo de la reactividad cruzada entre las proteínas extraíbles con etanol 70% de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz, realizado mediante el mismo ELISA competitivo, indicó que las proteínas no relacionadas con las prolaminas nocivas a los enfermos celíacos no presentan una competición significativa, resultando un ensayo altamente específico.

Considerando que, en el análisis de alimentos con bajo contenido de gluten, los extractos muestra son diluidos 1/10 o 1/50, el porcentaje de etanol en el medio de reacción resulta de 7% o 1,4%, respectivamente. En estas condiciones, se demostró que el solvente genera una interferencia que conduce a una disminución en la inmunoreactividad, por la cual, el contenido de gliadinas en la muestra resulta subvaluado y es informado como 60% o 92% del contenido real.

Sin embargo, dado los niveles de detección del ELISA desarrollado, la interferencia del solvente no impide detectar alimentos con contenido de gluten superior al recomendado por la OMS.

En el análisis de gliadinas en alimentos debe considerarse que, durante su fabricación, gran parte de los productos comerciales son sometidos a procesos térmicos, los cuales indudablemente, afectan a las proteínas. Es sabido que las ω -gliadinas son las prolaminas más resistentes al tratamiento térmico. Por esta razón, Skerritt y Hill (1991) desarrollaron un inmunoensayo con un AcMo anti- ω -gliadinas, el cual fue adoptado por la AOAC como ensayo oficial.

Sin embargo, este ensayo presenta un límite de detección de 160 ng/ml (16 mg/ 100 g).

La comparación con el ensayo desarrollado en este estudio mostró que el método de AOAC presenta una detectabilidad mucho más baja.

En la cuantificación inmunoquímica de prolaminas en alimentos siempre existe error en la determinación, ya que la historia previa de la muestra (procesamiento térmico durante su fabricación), es desconocida y variable. Además, en el ensayo, el extracto muestra es comparado con un estándar no tratado térmicamente. Es por eso, que si bien es correcta la detección de ω -gliadinas como una manera segura de detectar prolaminas tóxicas (aún luego de la disminución de reactividad ocasionada por el tratamiento térmico), es más conveniente disponer de AcMo con alta afinidad, capaces de reconocer tanto ω -gliadinas como gliadinas de otros grupos y optimizar el ensayo con el fin de lograr alta detectabilidad. De esta manera, se podrán identificar alimentos en los cuales la cantidad de prolaminas es muy baja o aún en aquellos en que, gran parte de la reactividad, se haya perdido por el tratamiento térmico.

Con el objeto de desarrollar inmunoensayos de estas características se produjeron AcMo cuya especificidad fue caracterizada por "immunoblotting" frente a proteínas de trigo, cebada, centeno, triticale, avena, soja, maíz y arroz, separadas por SDS-PAGE. De acuerdo a este análisis, se seleccionaron tres AcMo: 13B4,

11C4 y 12A1. Estos AcMo fueron purificados por FPLC y conjugados a biotina, para un posterior uso del sistema de amplificación biotina-estreptavidina.

El análisis de la reactividad de estos tres AcMo por "immunoblotting" frente a gliadinas separadas por A-PAGE mostró que los tres AcMo reconocen aunque en forma diferente α -, β -, γ -gliadinas. Pero, mientras que los AcMo 13B4 y 11C4 reconocen débilmente ω -gliadinas, el AcMo 12A1 presenta una marcada reactividad hacia varias de estas proteínas.

El análisis por ELISA de inhibición mostró que sólo dos AcMo (13B4 y 13D1) de los siete estudiados, compiten parcialmente por el mismo epítopo. Aunque el análisis por "immunoblotting" (figura 4.1) no parecía indicar que estos AcMo reconocieran una estructura en común, no puede descartarse que estos resultados discordantes sean debidos a la diferencias en la forma en que se presenta el antígeno y en la sensibilidad de ambas técnicas.

En el análisis de especificidad, de epítopos reconocidos por AcMo anti-prolaminas, es difícil llegar, en muchos casos, a resultados concluyentes, ya que ligeras variantes en las secuencias repetitivas conducen a interacciones con distintos AcMo con un espectro de afinidades muy amplio.

El empleo del panel de AcMo obtenido en "immunoblotting" mostró capacidad de diferenciar entre variedades de trigo. Por lo tanto, esta técnica puede ser útil en la caracterización de cultivares.

El uso de los AcMo anti-prolaminas permitió el desarrollo de dos tipos de inmunoensayos cuantitativos: ELISA competitivo y de captura.

En el primer caso, se empleó un ELISA competitivo secuencial, similar al descrito con anticuerpos policlonales, obteniendo los mejores resultados con el AcMo 13B4 (límite de detección 150 ng/ml).

Mientras que en ELISA de captura, resultó más útil el AcMo 12A1. Este AcMo, que reconoce α -, β -, γ - y ω -gliadinas, fue empleado en un formato de ensayo similar al del kit aprobado por la AOAC y presenta un límite de detección de gliadinas de 1 ng/ml. La detectabilidad de este ensayo es superior a la del kit comercial (160 ng/ml).

Las diferencias encontradas al comparar, en distintos ensayos, algunos AcMo del panel obtenido, indican claramente que no es posible establecer reglas generales acerca del empleo de AcMo para la determinación de gliadinas. En efecto, se observó que el AcMo 13B4, que permite la mayor detectabilidad en un ELISA competitivo, no puede ser empleado en un ELISA de captura. Mientras que el AcMo 12A1 permite optimizar un ELISA de alta detectabilidad sólo si se emplea un ensayo de captura.

Actualmente el diagnóstico de certeza de EC requiere el estudio por biopsia duodenal y seguimiento por serología de los pacientes. Sin embargo, conocido el alto nivel de prevalencia de la enfermedad y la alta proporción de individuos asintomáticos, la serología se ha convertido en la prueba más importante en la detección de EC.

Si bien se ha documentado la mayor eficiencia de la determinación de IgA anti-endomisio, también se reconoce su inaplicabilidad, en programas de "screening", por su alto costo. Razón por la cual, se requiere disponer de ensayos para anticuerpos anti-gliadinas de mayor sensibilidad y especificidad.

El análisis de especificidad de los anticuerpos séricos de pacientes celíacos por "immunoblotting", indica que no existe un perfil característico de la enfermedad. Diferencias importantes son observadas aún dentro de un grupo de pacientes que expresan el mismo HLA, concluyendo que no se encuentra un grupo de prolaminas preferencialmente reconocido.

En la bibliografía, se observan resultados contradictorios en la determinación por ELISA de los niveles de anticuerpos anti-gliadinas. Se encuentran diferencias tanto en los parámetros que definen los test empleados, como en la interpretación de cuales de las gliadinas son más relevantes en la respuesta inmune. Esto es una consecuencia de la falta de estandarización de los ensayos, en especial de los antígenos empleados. Por esta razón, se estudió el empleo de gliadinas purificadas por FPLC.

En los inmunoensayos presentados en este estudio se detectó alta respuesta de anticuerpos IgG e IgA anti-gliadinas en los enfermos celíacos. Estos resultados indican la utilidad del empleo de las fracciones de gliadinas purificadas por FPLC, como antígenos en ensayos serológicos para EC.

Si bien no se encontró una diferencia marcada entre las diferentes preparaciones antigénicas, el análisis de los parámetros de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, indican que parece más adecuado el uso de ω -gliadinas que gliadinas de otros grupos o gliadinas totales. Esto surge del hecho que la dispersión de la población normal en anticuerpos anti- ω -gliadinas es menor que la obtenida cuando se emplean otros antígenos, conduciendo a un ensayo con menor valor de corte y más alta sensibilidad, sin disminución de la especificidad.

Cuando se consideraron todos los enfermos celíacos de este estudio y se calculó la relación de resultados positivos y negativos determinados por IgA anti-gliadinas e IgA anti-endomisio, se encontró que el empleo de la fracción ω -gliadinas conduce a la mejor correlación.

En esta correlación, no se obtuvo ningún resultado falso negativo cuando se compararon los resultados de las determinaciones de IgA anti-gliadinas y EMA, pero si se encontró un caso falso positivo, por ambos métodos. Sin embargo, es posible que este paciente, así como individuos de la población control que presentan niveles elevados de anticuerpos anti-gliadinas, no signifiquen un falso positivo del método si no que tal vez pertenezcan a la población celíaca asintomática. Un seguimiento de este tipo de pacientes puede llevar al diagnóstico de EC.

Los parámetros de los ensayos obtenidos en este estudio son promisorios y como fue descrito en la Introducción, similares a los publicados recientemente. Sin embargo, se requiere de estudios más profundos para la implementación de estos ensayos, así como de estudios poblacionales mayores, aunque éstos son difíciles de realizar debido a que se requiere el seguimiento de niños diagnosticados mediante biopsia duodenal.

Conclusiones

De los resultados presentados y discutidos en este estudio surgen las siguientes conclusiones:

1a.- Por análisis de proteínas mediante PAGE, tanto en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como en PAGE a pH = 3 (A-PAGE), en geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250, se observó efecto metacromático en prolaminas de trigo, cebada y centeno.

1b.- Este efecto resulta del desplazamiento del espectro de absorción del complejo colorante/proteína y fue observado en dos grupos homólogos de proteínas, HMW-prolaminas: HMW-gluteninas, D-hordeínas y HMW-secalinas, y en las prolaminas pobres en azufre: ω -gliadinas, C-hordeínas y ω -secalinas, en trigo, cebada y centeno, respectivamente.

1c.- Dichos resultados sugieren que este fenómeno puede deberse a la interacción de moléculas del colorante con una extensa región repetitiva " β -turn", estructura típica de las prolaminas que exhiben comportamiento metacromático.

2a.- La cromatografía mediante FPLC de intercambio catiónico en columna analítica permite la purificación de gliadinas de todos los grupos, así como también de algunas hordeínas y secalinas.

2b.- Dicha separación muestra alta resolución y reproducibilidad, permitiendo el empleo de esta técnica en la caracterización de cultivares de trigo.

2c.- El empleo de cromatografía de FPLC preparativa es útil para la obtención de ω -gliadinas y fracciones mezclas que contienen α -, β - y γ -gliadinas.

3a.- Se encontró que existen importantes diferencias entre soluciones de gliadinas y seroalbúmina bovina, cuando se comparan sus respuestas por los métodos de Bradford, Peterson y Lowry (método de elección para la cuantificación de gliadinas en extractos de prolaminas). Razón por la cual, en la cuantificación de prolaminas por métodos fisicoquímicos sólo puede emplearse una solución standard de gliadinas.

3b.- Se obtuvo una solución standard de gliadinas estable y confiable, por disolución de gliadina comercial en etanol 70%, filtración por membrana de nitrocelulosa y cuantificación por el método de Kjeldahl. Este standard es útil para la construcción de curvas de calibración, tanto para su empleo en la cuantificación de proteínas en extractos de prolaminas por el método de Lowry, como para la cuantificación de gliadinas por métodos inmunoquímicos.

3c.- Por análisis cuali y cuantitativo de los extractos de gliadinas obtenidos con distintos solventes se observó que etanol 70% y 1-propanol 50% son los extractantes de elección.

4a.- Se pudo desarrollar un ELISA competitivo secuencial con anticuerpos policlonales que presenta un nivel de detección de gliadinas de 1 ng/ml. Este ELISA presenta mayor nivel de detección que el requerido por la Organización Mundial de la Salud para el análisis de alimentos destinados al consumo por enfermos celíacos.

4b.- El ELISA descrito es altamente selectivo hacia las prolaminas nocivas y es aplicable a alimentos comerciales, incluso aquellos sometidos a tratamientos térmicos durante su producción.

4c.- Se demostró que la presencia de etanol en el ensayo, a las diluciones de la muestra 1/50 o 1/10 (habitualmente empleadas cuando se analizan alimentos con bajo contenido de gluten), produce una disminución en la inmunoreactividad, que conduce a subvaluar el contenido de gliadinas en la muestra e informar un resultado como el 92% o el 60% del contenido real.

4d.- El ELISA cuantitativo desarrollado presenta mayor detectabilidad que el ELISA comercial más ampliamente difundido y aprobado como método oficial por la AOAC.

5a.- Se obtuvo un panel de AcMo anti-prolaminas con perfiles de reconocimiento variado hacia prolaminas de trigo, cebada, centeno y triticale. No se detectaron AcMo con reactividad hacia proteínas de soja, maíz y arroz.

5b.- El panel de AcMo obtenido permite diferenciar entre distintas variedades de trigo y puede ser empleado en la caracterización de cultivares.

5c.- Los perfiles de reconocimiento indican que la mayoría de estos AcMo reconocen una estructura repetitiva, aunque en el análisis de epitopes sólo dos AcMo de los siete analizados (13B4 y 13D1) reconocen epitopes solapados.

5d.- El AcMo 13B4 resultó de utilidad para el desarrollo de un ELISA competitivo, el que presenta un límite de detección de gliadinas de 150 ng/ml. Este AcMo sin embargo, no puede ser empleado en un ELISA de captura.

5e.- El AcMo 12A1 resultó útil para el desarrollo de un ELISA de captura, con un límite de detección de gliadinas de 1 ng/ml. Este ensayo presenta mayor detectabilidad que el ELISA de captura aprobado por la AOAC.

6a.- No se encontraron prolaminas preferencialmente reconocidas por los anticuerpos séricos de enfermos celíacos. El análisis de especificidad reveló que no existe un perfil característico de reconocimiento, habiéndose observado diferencias aún dentro de pacientes que expresan el mismo HLA.

6b.- El empleo de fracciones de gliadinas separadas por FPLC en ensayos serológicos para EC, permitió detectar alta respuesta de anticuerpos séricos tanto IgG como IgA, en los enfermos con enteropatía activa, mientras que la mayoría de los pacientes de los grupos control presentan niveles inferiores al valor de corte.

6c.- La utilización de ω -gliadinas para la detección de anticuerpos séricos IgA en pacientes celíacos conduce a un ensayo con: 80% de sensibilidad, 90% de especificidad, 80% de valor predictivo positivo y 90% de valor predictivo negativo, valores más altos que los obtenidos empleando el extracto total de gliadinas o la fracción que contiene α -, β - y γ -gliadinas. Los valores de los parámetros del ensayo desarrollado de anticuerpos anti-gliadinas son comparables con los descritos en la bibliografía.

6d.- Se obtuvo alta correlación al comparar los niveles de IgA anti-gliadinas con la clasificación de positivos y negativos determinada mediante IgA anti-endomisio. Los mejores resultados se obtienen empleando la fracción que contiene ω -gliadinas.

6e.- Los resultados señalados previamente indican la necesidad de profundizar el estudio de la aplicación de fracciones purificadas de gliadinas al diagnóstico y seguimiento de la EC.

Apéndice

1.- Reactivos para electroforesis en geles de poliacrilamida.**1.1.- SDS-PAGE.**1.1.a.-Buffer de separación 4X:

Tris	18,18 g
SDS	0,4 g
Agua destilada desionizada c.s.p. ajustar a pH = 8,8	100 ml

1.1.b.-Buffer de "stacking" 4X:

Tris	6,06 g
SDS	0,4 g
Agua destilada desionizada c.s.p. ajustar a pH = 6,8	100 ml

1.1.c.- Buffer para muestras:

buffer de "stacking" 4X	5 ml
glicerol	8 ml
SDS	0,4 g
azul de bromofenol	1 mg
2-mercaptoetanol	1 ml
Agua destilada desionizada c.s.p.	20 ml

1.1.d.-Solución de acrilamida-bisacrilamida:

acrilamida	30 g
bisacrilamida	0,8 g
agua destilada desionizada c.s.p. filtrar por papel Whatman N° 1	100 ml

1.1.e.- Gel de "stacking" (3%):

sol. acrilamida-bisacrilamida	1 ml
buffer de "stacking" 4X	2,5 ml
agua destilada desionizada	6,5 ml
sol. de persulfato de amonio 10%	60 μ l
TEMED	10 μ l

1.1.f.- Gel de separación:

	Homogéneo	Gradiente	
	12,5%	10%	15%
sol. acrilamida-bisacrilamida	1 ml	2,6 ml	4 ml
buffer de separación 4X	2,5 ml	2 ml	2 ml
agua destilada desionizada	6,5 ml	3,4 ml	1,2 ml
sacarosa	-	-	1,2 g
sol. de persulfato de amonio 10%	60 μ l	70 μ l	12 μ l
TEMED	10 μ l	3 μ l	3 μ l

1.2.- A-PAGE.1.2.a.- Solución A (acrilamida-bisacrilamida):

acrilamida	28 g
bisacrilamida	1,2 g
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
filtrar por papel Whatman N° 1	

1.2.b.- Solución B:

KOH	3,5 g
ácido láctico (85%)	25 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
filtrar por papel Whatman N° 1	

1.2.c.- Solución C:

lactato de aluminio	6,25 g
ácido láctico (85%)	10 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
filtrar por papel Whatman N° 1	

<u>1.2.d.- Solución D:</u>	nitrato de plata	17 mg/ml
<u>1.2.e.- Solución E:</u>	persulfato de amonio	90 mg/100ml
<u>1.2.f.- Solución F:</u>	H ₂ O ₂ (30%)	33 µl/ml

1.2.g.- Buffer de precorrida:

Diluir la solución B 1/50, en agua destilada desionizada.

1.2.h.-Buffer de corrida:

Diluir la solución C 1/50, en agua destilada desionizada.

1.2.i.- Buffer para muestras 2X:

Diluir la solución C 1/50, en agua destilada desionizada.

sacarosa	30 %
violeta de metilo	1 mg/10 ml

1.2.k.-Gel de separación:

	Gradiente	
	4 %	7%
Solución A	1,4 ml	2,4 ml
Solución B	0,2 ml	0,2 ml
Solución D	0,1 ml	0,1 ml
urea (5M)	0,2 ml	0,2 ml
agua destilada desionizada	8,1 ml	6,3 ml
sacarosa	-	1,2 g
sol. de persulfato de amonio 10%	100 µl	20 µl

2.- Electrotransferencia.**2.1.- Buffer de electrotransferencia para SDS-PAGE (3X):**

Tris	7,268 g
glicina	43,465 g
metanol	20%
agua destilada desionizada c.s.p.	1 l
ajustar a pH = 8,35	

2.2.- Buffer de electrotransferencia para A-PAGE:

ácido láctico	0,1 M
---------------	-------

3.- Reactivos para técnicas inmunoquímicas.**3.1.- PBS:**

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
KH_2PO_4	1,5 mM
Na_2HPO_4	8,1 mM
pH	7,4

3.2.- TBS:

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
pH	7,4

3.3.- Reacciones de color.**3.3.a- Reacción de color en ELISA empleando peroxidasa:**

buffer sustrato:

ácido cítrico	2,1 g
Na_2HPO_4	1,42 g
agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
ajustar a pH = 5	

solución sustrato (preparar en el momento):

buffer sustrato	10 ml
o-fenilendiamina	10 mg
H_2O_2 (30%)	10 μl

3.3.b- Reacción de color en ELISA empleando fosfatasa alcalina:

buffer sustrato:

dietanolamina	1 ml
MgCl (0,1%)	1 ml
azida sódica (0,2%)	1 ml
agua destilada desionizada c.s.p.	10 ml
ajustar a pH = 9,8	

solución sustrato (preparar en el momento):

buffer sustrato	10 ml
p-nitro-fenol fosfato	10 mg

3.3.c- Reacción de color en "immunoblotting" empleando peroxidasa:

solución sustrato (preparar en el momento):

metanol	6 ml
4-cloro- α -naftol	18 mg
TBS	30 ml
H ₂ O ₂ (30%)	24 μ l

4.- Soluciones y medios de cultivo empleados en cultivos celulares.**4.1.- Medio de cultivo:**

RPMI-1640 (Gibco)	1 sobre
NaHCO ₃	2 g
Agua destilada desionizada c.s.p.	1 l
Ajustar a pH=7,6 con HCl 1 N.	
Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 μ m.	

4.2.- Aditivos para medios de cultivo:**4.2.a.- Hipoxantina- Timidina (HT) 100X:**

Hipoxantina (Sigma)	136,1 mg
Timidina (Sigma)	38,75 mg
Agua destilada deionizada	50 ml
NaOH 0,1 M gota a gota hasta la disolución total de las drogas	
Agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 μ m.	
Conservar a - 20°C.	

4.2.b.- Aminopterina 1000X:

Aminopterina (Sigma)	17,6 mg
Agua destilada desionizada c.s.p.	50 ml
NaOH 0,1 M gota a gota hasta la disolución total de las drogas	
Agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 μ m.	
Conservar a - 20°C.	

4.2.c.- Hipoxantina-Aminopterina- Timidina (HAT) 50X:

HT 100X	50 ml
Aminopterina 1000X	5 ml
RPMI-1640	45 ml
Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 μ m.	
Conservar a - 20°C.	

4.2.d.- Antibióticos, piruvato sódico y glutamina (PSPG) 50X:

Penicilina (Bagó)	312 mg
Estreptomicina (Bagó)	500 mg
Piruvato sódico (Gibco)	270 mg
Glutamina (Gibco)	1,46 g
Agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml
Esterilizar por filtración a través de membrana de 0,22 μ m.	
Conservar a - 20°C.	

Concentración final: 50 U/ml (penicilina) y 50 μ g/ml (estreptomicina).

4.3.- Medio selectivo:

FCS (Gibco)	20 ml
HAT 50X	2 ml
PSPG 50X	2 ml
RPMI-1640	76 ml

Concentraciones finales de hipoxantina, aminopterina y timidina: 0,11 mM, $3,8 \times 10^{-4}$ mM y $1,6 \times 10^{-2}$ mM, respectivamente.

4.4.- PEG 50%:

PEG 3350 (Sigma)	1 g
Esterilizar a vapor fluente 20 min.	
Enfriar a 40 °C y agregar 1 ml de RPMI-1640.	

4.5.- Solución salina tamponada de NaCl y KCl (GKN):

NaCl	800 mg
KCl	40 mg
glucosa	200 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	69 mg
Na ₂ HPO ₄	157 mg
pH	7,2-7,4
Agua destilada desionizada c.s.p.	100 ml

Bibliografía

- Altman D.M., Sansom D. and Marsh S.G.E. 1991.** What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune disease?. *Immunol. Today* 12(8): 267-270.
- Andrews J.L. and Skerritt J.H. 1994.** Quality-related epitopes of High Mr. subunits of wheat glutenin. *J. Cereal Sci.* 19: 219-229.
- Arnason J.A., Gudjonsson H., Freysdottir J., Jonsdottir I. and Valdimarsson H. 1992.** Do adults with high gliadin antibody concentrations have subclinical gluten intolerance? *Gut* 33: 194-197.
- Arranz E. and Ferguson A. 1993.** Intestinal antibody pattern of coeliac disease: occurrence in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterol.* 104: 1263-1272.
- Ashkenazi A. and Baratz M. 1992.** Malignancy complicating celiac disease. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.)* 19: 184-193.
- Auricchio S., de Ritis G., DeVincenzi M., Mancini E., Minetti M., and Silano V. 1984.** Agglutinating activity of gliadin derived peptides from bread wheat. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 121: 428-433.
- Auricchio S., Greco L. and Troncone R. 1990.** What is the true prevalence of the coeliac disease?. *Gastroenterol. Int.* 3: 140-142.
- Auricchio S. and Troncone R. 1992.** In vitro methods for the study of coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.)* 19: 44-51.
- Bailey D.S., Freedman A.R., Price S.C., Chescoe D. and Ciclitira P.J. 1989.** Early biochemical responses of the small intestine of coeliac patients to wheat gluten. *Gut* 30: 78-85.
- Baisch J.M. and Capra J.D. 1992.** Analysis of HLA genotypes and susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. *Scand. J. Immunol.* 36: 331-340.
- Balas Perez A., García Sanchez F., Martínez M.J. y García-Novo M.D. 1992.** Inmunogenética de la dermatitis herpetiforme. *Inmunología* 11(4): 115-119
- Barnes R.M.R, Jonhson P.M., Blears J., Harvey M.M. and Finn R. 1988a.** Human serum antibodies reactive with dietary proteins. IgG subclass distribution. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 87: 184-188.
- Barnes R.M.R, Jonhson P.M., Blears J., Harvey M.M. and Finn R. 1988b.** Human serum antibodies reactive with dietary proteins. Antigenic specificity. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 87: 189-193.
- Batey I.L. 1984.** Wheat varietal identification by rapid ion-exchange chromatography of gliadins. *J. Cereal Sci.* 2: 241-248.
- Bietz J.A. 1985.** High performance liquid chromatography: how proteins look in cereals. *Cereal Chem.* 62: 201-212.
- Bietz J.A. 1986.** High-performance liquid chromatography of cereal proteins. *Adv. Cereal Sci. Tech.* vol. VIII, 105-170.
- Bland P. 1988.** MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol. Today* 9 (6):174-178.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

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

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

Bugawan T.L., Angellini G., Larrick J., Auricchio S., Ferrara G.B. and Erlich H.A. 1989. A combination of a particular HLA-DP β allele and an HLA-DQ heterodimer confers susceptibility to coeliac disease. *Nature* 339: 470-473.

Bushuk W. and Zillman R.R. 1978. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. *Can. J. Plant Sci.* 58: 505-515.

Catassi C., Rossini M., Ratsch I., Bearzi I., Santinelli A., Castagnani R., Pisani E and Coppa G.V. 1993. Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut* 34: 1515-1519.

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

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

Ciacchi C., Mahida Y.R., Dignass A., Koizumi M. and Podolsky D.K. 1993. Functional IL-2R on intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 92: 527-532.

Ciclitira P.J. and Lennox E.S. 1983. A radioimmunoassay for α - and β -gliadins. *Clin. Sci.* 64: 655-659.

Ciclitira P.J., Ellis H.J., Evans D.J. and Lennox E.S. 1985. A radioimmunoassay for wheat gliadin to assess the suitability of gluten free foods for patients with coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 59: 703-708.

Ciclitira P.J., Hooper L.B., Ellis H.J. and Freedman A.R. 1989. Gliadin antibody production by small intestinal lymphocytes from patients with coeliac disease. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 89: 246-249.

Ciclitira P.J. and Hall M.A. 1990. Coeliac disease. *Bailliere's Clin. Gastroenterol.* 4(1): 43-59.

Codex Alimentarius Commission. Marzo 1988. Programa Conjunto FAO-WHO sobre normas alimentarias.

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

Cornell H.J., Wieser H. and Belitz H. 1992. Characterization of the gliadin-derived peptides which are active in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta* 213: 37-50.

- Cornell H.J. and Mothes T. 1993.** The activity of wheat gliadin peptides in in vitro assays for coeliac disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1181: 169-173.
- Corrao G., Corraza G., Andreani M.L., Torchio P., Valentini R.A., Galatola G., Quaglino D., Gasbarrini G. and di Orio F. 1994.** Serological screening of coeliac disease: choosing the optimal procedure according to various prevalence values. *Gut* 35: 771-775.
- Corraza G., Valentini R.A., Frisoni M., Volta U., Corrao G., Bianchi F.B. and Gasbarrini G. 1992.** Gliadin immune reactivity is associated with overt and latent enteropathy in relatives of coeliac disease. *Gastroenterol.* 103: 1517-1522.
- Davidson A.G.F. and Bridges M.A. 1987.** Coeliac disease: a critical review of aetiology and pathogenesis. *Clin. Chim. Acta* 163: 1-40.
- Dawood M.R., Howes N.K. and Bushuk W. 1989.** Preparation of monoclonal antibodies against proteins and preliminary investigation of their ability to discriminate cereal cultivars. *J. Cereal Sci.* 10: 105-112.
- De Libero G., Rocci M.P., Casorati G., Giachino C., Oderda G., Tavassoli K. and Migone N. 1993.** T cell receptor heterogeneity in γ/δ T cell clones from intestinal biopsies of patients with celiac disease. *Eur. J. Immunol.* 23: 499-504.
- Denery Papini S., Briand J.P., Quillien L., Popineau Y. and Regenmore M.H.V. 1994.** Immunological differentiation of various gliadins and Low Mr. subunits of glutenin using anti-peptide antisera. *J. Cereal Sci.* 20: 1-14.
- de Ritis G., Auricchio S., Holly W.J., Lew J.L., Bernardin J.E. and Kasarda D.D. 1988.** In vitro studies of the toxicity of specific A-gliadin peptides in coeliac disease. *Gastroenterol.* 94: 41-49.
- Devery J.M., La Brooy J.T., Krillis S., Davidson G. and Skerritt J.H. 1989.** Anti-gliadin antibody specificity for gluten derived peptides toxic to celiac patients. *Clin. Exp. Immunol.* 76: 384-390.
- Dicke W.K., Weijers H.A. and Van de Kramer J.H. 1953.** Coeliac disease: the presence in wheat of a factor having deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr. Scand.* 42: 34-42.
- Dill K.A. and Shortle D. 1991.** Denatured states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 795-825
- Dinari G., Branski D. and Walker-Smith J. 1992.** Clinical presentation and long-term surveillance of coeliac disease in childhood. *Gluten-sensitive enteropathy.* *Front. Gastrointest. Res.* (Basel, Karger ed.) 19: 130-140.
- Donovan G.R., Skerritt J.H. and Castle S.L. 1988.** Monoclonal antibodies used to characterize cDNA expressing specific wheat endosperm proteins. 9: 97-111.
- Duhamel R.C., Meezan E. and Brendel K. 1980.** Metachromatic staining with Coomassie Brilliant Blue R-250 of the proline-rich calf thymus histone. *Biochim. Biophys. Acta* 626: 432-442.
- Dwek R.A., Edge C.J., Harvey D.J., Wormald M.R. and Parekh R.B. 1993.** Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 65-100.
- Ebert E.C. and Roberts A.I. 1995.** Pitfalls in the characterization of small intestinal lymphocytes. *J. Immunol. Meth.* 178: 219-227.

Egorov T.A. 1988. The amino acid sequence of the fast avenin component. *J. Cereal Sci.* 3: 289-292.

Ellis H.J., Freedman A.R. and Ciclitira P.J. 1989. The production and characterization of monoclonal antibodies to wheat gliadin peptides. *J. Immunol. Meth.* 120: 17-22.

Ellis J.H., 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: 123-130.

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

Engstrom P., Sundin U., Lavo B., Norhagen E., Hallgren R. and Smith C.I. 1992. Class and subclass-associated specificity differences of anti-gliadin antibodies from mucosa and serum. *Immunol.* 77: 604-608.

Ensari A., Ager A., Marsh M.N., Morgan S. and Moriarty K.J. 1993. Time-course of adhesion molecule expression in rectal mucosa of gluten-sensitive subjects after gluten challenge. *Clin. Exp. Immunol.* 92: 303-307.

Faber J. 1992. Life-lasting coeliac disease or transient gluten-induced enteropathy?. *Gluten-sensitive enteropathy. Front. Gastrointest. Res. (Basel, Karger ed.)* 19: 153-163.

Fais S., Maiuri L., Pallone F., De Vicenzi M., De Ritis G., Troncone R. and Auricchio S. 1992. Gliadin induced changes in the expression of MHC-class II antigens by human small intestinal epithelium. *Organ culture studies with coeliac disease mucosa. Gut* 33: 472-475.

Falchuk Z.M., Gebhard R.L. and Strober W. 1974. An in vitro model of gluten sensitive enteropathy. *J. Clin. Invest.* 53: 487-500.

Farstad I.N., Halstensen T.S., Fausa O. and Brandtzaeg P. 1993. Do Human Peyer's patches contribute to the intestinal intraepithelial γ/δ T-cell population?. *Scand. J. Immunol.* 38: 451-458.

Ferguson A., Blackwell J. and Barnetson R. 1985. Effects of additional dietary gluten on the small intestinal mucosa of volunteers and of patients with dermatitis herpetiformis. *Scand. J. Gastroenterol.* 22: 543-549.

Ferguson A., Arranz E. and O'Mahony S. 1993. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-active, silent, latent and potential. *Gut* 34: 150-151.

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

Festenstein G.N., Hay F.C. and Shewry P.R. 1987. Immunochemical relationships of the prolamins storage proteins of barley, wheat, rye and oats. *Biochim. Biophys. Acta* 912: 371-383.

Franco A., Appella E., Kagnoff M.F., Chowers Y., Sakaguchi K., Grey H.M. and Sette A. 1994. Peripheral T cell response to A-gliadin in coeliac disease: differential processing and presentation capacities of Epstein-Barr-transformed B cells and fibroblasts. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71: 75-81.

- Freedman A.R., Galfre 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. Meth.* 98: 123-127.
- Freedman A.R., Wieser H., Ellis H. J. and Ciclitira P.J. 1988.** Immunoblotting of gliadins separated by RP-HPLC: detection with monoclonal antibodies. *J. Cereal Sci.* 8: 22-29.
- Friis S.U., Noren O., Sjostrom H. and Gudman Hooyer E. 1986.** Patients with celiac disease have a characteristic gliadin antibody pattern. *Clin. Chim. Acta* 155: 133-142.
- Friis S.U. 1988.** Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta* 178: 261-270.
- Friis S.U., Sjostrom H., Noren O., Rudiger N. and Anthonsen D. 1988.** The prolamins antibody reactivity against hordein polypeptides in sera from patients with celiac disease. *Clin. Chim. Acta* 176: 241-250.
- Friis S.U., Dabelsteen E., Sjostrom H., Noren O. and Jarnum S. 1992.** Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between celiac patients in remission and control individuals. *Gut* 33: 1487-1492.
- Gadd S., Kamath K.R., Silink M. and Skerritt J.H. 1992.** Co-existence of coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus in children. *Aust. NZ. J. Med.* 22: 256-260.
- Gjertsen H.A., Lundin K.E.A., Sollid L.M, Eriksen J.A. and Thorsby E. 1994a.** T cells recognize a peptide derived from α -gliadin presented by the celiac disease-associated HLA-DQ2 heterodimer. *Human Immunol.* 39: 243-252.
- Gjertsen H.A., Sollid L.M, Ek J., Thorsby E. and Lundin K.E.A. 1994b.** T cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules. *Scand. J. Immunol.* 39: 567-574.
- Goldsbrough A.P., Bulleid N.J., Freedman R.B. and Flavell R.B. 1989.** Conformational differences between two wheat HMW-glutenin subunits are due to a short region containing six amino acid differences. *Biochem J.* 263: 837-842.
- Greco L., Mayer M., Grimaldi M., Follo D., de Ritis G. and Auricchio S. 1985.** The effect of the early feeding on the onset of symptoms in coeliac disease. *J. Paediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4: 52-55.
- Guandalini S., Ventura A., Ansaldo N., Giunta A.M., Greco., Lazzari R., Mastella G. and Rubino A. 1989.** Diagnosis of celiac disease: time for a change?. *Arch. Dis. Child.* 64: 1320-1325.
- Gutierrez-Lopez M.D., Bertera S., Chantres M.T., Vavasori C., Dorman J.S., Trucco M. and Serrano-Rios M. 1992.** Susceptibility to type-1 diabetes mellitus in Spanish patients correlates quantitatively with expression of HLA-DQ α arg 52 and HLA-DQ β non -asp 57 alleles. *Diabetología* 35: 583-588.
- Halford N.G., Tatham A.S., Sui E., Daroda L., Dreyer T. and Shewry P.R. 1992.** Identification of a novel β -turn-rich repeat motif in the D hordeins of barley. *Biochim. Biophys. Acta* 1122: 118-122.
- Hall R.P. and McKenzie K.D. 1992.** Comparison of the intestinal and serum antibody response in patients with dermatitis herpetiformis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62: 33-41.

Halstensen T.S., Scott H. and Brandtzaeg P. 1989. Intraepithelial T cells of the TcR γ/δ CD8⁻ and V δ 1/J δ 1⁺ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand. J. Immunol.* 30: 665-672.

Halstensen T.S. and Brandtzaeg P. 1993. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4⁺ α/β cells in lamina propria but proliferation (Ki-67) of α/β and γ/δ cells in the epithelium. *Eur. J. Immunol.* 23: 505-510.

Halstensen T.S., Scott H., Fausa O. and Brandtzaeg P. 1993. Gluten stimulation of coeliac mucosa *in vitro* induces activation (CD25) of lamina propria CD4⁺ T cells and macrophages but no crypt-cell hiperplasia. *Scand. J. Immunol.* 38: 581-590.

Hekkens J.M. 1991. The evolution in research in prolamin toxicity: from bread to peptide. *Food Allergy and food Intolerance. Biblio. Nutr. Dieta.* 48: 90-104.

Herrera M., Chertkoff L., Palavecino E.A., Mota A.H., Guala M.C., Faimboim L. and Satz L. 1989. Restriction fragment length polymorfism in HLA class II genes of Latin American caucasian celiac disease patients. *Human Immunol.* 26: 272-280.

Hill A. and Skerritt J.H. 1990. Determination of gluten in foods using a monoclonal antibody-based competition enzyme immunoassay. *Food Agric. Immunol.* 2: 21-35.

Holm K., Maki M., Savilahti E., Lipsanen V., Laippala P. and Koskimies S. 1992. Intraepithelial γ/δ T cell receptor lymphocytes and genetic susceptibility to coeliac disease. *Lancet* 339: 1500-1503.

Holm K., Savilahti E., Koskimies S., Lipsanen V. and Maki M. 1994. Immunohistochemical changes in the jejunum in first degree relatives of patients with celiac disease and the celiac disease marker DQ genes. HLA class II antigen expression, IL-2R⁺ cells and dividing crypt cells. *Gut* 35: 55-60.

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

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

Howdle P.D. and Blair G.E. 1992. Molecular biology and coeliac disease. *Gut* 33: 573-575.

Howell M.D., Smith J.R., Austin R.K., Kelleher D., Nepom G.T., Volk B. and Kagnoff M.F. 1988. An extended HLA-D region haplotype associated with celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 222-226.

Hoyne G.F., Callow M.G., Kuo M.C. and Thomas W.R. 1993. Presentation of peptides and proteins by intestinal epithelial cells. *Immunol.* 80: 204-208.

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

Hvatum M., Scott H. and Brandtzaeg P. 1992a. Serum IgG subclass antibodies to a variety of food antigens in patients with coeliac disease. *Gut* 33: 632-638.

Hvatum M., Scott H. and Brandtzaeg P. 1992b. Pitfalls in determining IgG and IgG subclass antibodies to food antigens. *J. Immunol. Methods.* 148: 77-85.

- Iancu T.C. and Marsh M.N. 1992.** Mucosal pathology of coeliac disease, electron microscopy. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res.* (Basel, Karger ed.) 19: 64-84.
- Isaacson P.G. 1992.** Histopathology of the complications of coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res.* (Basel, Karger ed.) 19: 194-212.
- Jonhson R.B., Labrooy J.T. and Skerritt J.H. 1990.** Antibody responses reveal differences in oral tolerance to wheat and maize grain fractions. *Clin. Exp. Immunol.* 79: 135-140.
- Kagnoff M.F., Harwood J.I., Bugawan T.L. and Erlich H.A. 1989.** Structural analysis of the HLA-DR, -DQ, and -DP alleles on the celiac disease associated HLA-DR3 haplotype. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6274-6278.
- Kagnoff M.F. 1993.** Immunology of the gastrointestinal tract. *Gastroenterol.* 105 (5): 1275-1280.
- Karpari S., Meurer M., Stolz W., Burgin-Wolff A., Braun-Falco O. and Krieg T. 1992.** Ultrastructural binding sites of endomyium antibodies from sera of patients with dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Gut* 33: 191-193.
- Kasarda D.D., Autran J.C., Lew E.J., Nimmo C.C. and Shewry P.R. 1983.** N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins. Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochim. Biophys. Acta* 747: 138-150.
- Kasarda D.D., Okita T.W., Bernardin J.E., Baecker P.A., Nimmo C.C., Lew E.J., Dietler M.D. and Greene F.C. 1984.** Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of α -type gliadins from wheat (*Triticum aestivum*) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81: 4712-4716.
- Kelly J., O'Farrelly C., Rees J., Feighery C. and Weir D.G. 1987.** Humoral response to α -gliadin as serological screening test for coeliac disease. *Arch. Dis. Child.* 62: 469-473.
- Klaus S. 1992.** Dermatitis herpetiformis and coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res.* (Basel, Karger ed.) 19: 176-183.
- Kohler G. and Milstein C. 1975.** Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495.
- Kolberg J. and Sollid L. 1985.** Lectin activity of gluten identified as wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 130: 867-872.
- Kratzer F.H., Bersch S. and Vohra P. 1990.** Evaluation of heat damage to proteins by Coomassie Blue G dye-binding. *J. Food Sci.* 55: 805-807
- Kreis M., Forde B.G., Rahman S., Mifflin B.J. and Shewry P.R. 1985.** Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *J. Mol. Biol.* 183: 499-502.
- Krishnan H.B., White J.A. and Pueppke S.G. 1990.** Immunochemical evidence for the involvement of the Golgi apparatus in the transport of the vacuolar protein, γ -secalin, in rye endosperm. *Cereal chem.* 67(4): 360-366.
- Kutlu T., Brousse N., Rambaud C., Le Deist., Schmitz J. and Cerf-Bensussan N. 1993.** Numbers of T cell receptor α/β but not of γ/δ TcR intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut* 34: 208-214.

- Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lafiandra D. and Kasarda D.D. 1985.** One- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in a single gel: separation of wheat proteins. *Cereal Chem.* 62: 314-319.
- Lane D. 1988.** *Antibodies, a laboratory manual.* Ed. Harlow.
- Larre C., Popineau Y. and Loisel W. 1991.** Fractionation of gliadins from common wheat by cation exchange FPLC. *J. Cereal Sci.* 14: 231-241.
- Lefrancois L. and Puddington L. 1995.** Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality?. *Immunol. Today* 16 (1): 16-21.
- Leigh R.J., Marsh M.N., Crowe P.J., Garner V. and Gordon D. 1985.** Studies of intestinal lymphoid tissue. XI Dose-dependent gluten induced lymphoid infiltration of coeliac jejunal epithelium. *Scand. J. Gastroenterol.* 20: 715-719.
- Lerner A., Kumar V. and Iancu T.C. 1994.** Immunological diagnosis of childhood coeliac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 95: 78-82.
- Levenson S.D., Austin R.K., Dietler M.D., Kasarda D.D. and Kagnoff M.F. 1985.** Specificity of antigliadin antibody in celiac disease. *Gastroenterol.* 89: 1-5.
- Loft D.E., Marsh M.N., Crowe P.T., Sandle G.I. and Gordon D. 1989.** Studies of intestinal lymphoid tissue. XII Epithelial lymphocyte and mucosal response to rectal gluten challenge in coeliac sprue. *Gastroenterol.* 97: 29-37.
- Logan R.A.A. 1992.** Descriptive epidemiology of coeliac disease. Gluten-sensitive enteropathy. *Front. Gastrointest. Res.* (Basel, Karger ed.) 19: 1-14.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lundin K., Sollid L., Qvigstad E., Markussen G., Gjertsen H.A., Ek J. and Thorsby E. 1990.** T lymphocyte recognition of a celiac disease associated cis or trans encoded HLA-DQ α/β heterodimer. *J. Immunol.* 145: 136-139
- Lundin K.E.A., Scott H., Hansen T., Paulsen G., Halstensen T., Fausa O., Thorsby E. and Sollid L.M. 1993.** Gliadin-specific, HLA-DQ (α^*0501 , β^*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of coeliac disease patients. *J. Exp. Med.* 178: 187-196.
- Lupano C.E. and Añón M.C. 1985.** Characterization of triticale proteins. *Cereal Chem.* 62: 174-178.
- Lycke N., Kilander A., Nilsson L., Tarkowski A. and Werner N. 1989.** Production of antibodies to gliadin in intestinal mucosa of patients with coeliac disease: a study a single cell level. *Gut* 30: 72-77.
- Madrigal L., Lynch S., Feighery C., Weir D., Kelleher D. and O'Farrelly C. 1993.** Flow cytometry analysis of surface Major Histocompatibility Complex class II expression on human epithelial cells prepared from small intestinal biopsies. *J. Immunol. Meth.* 158: 207-214.

Maki M., Holm K., Lipsanen V., Hallstrom O., Viander M., Collin P., Savilahti E. and Koskimies S. 1991. Serological markers and HLA genes among healthy first-degree relatives of patients with coeliac disease. *Lancet* 338: 1350-1353.

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

Mantovani V., Corazza R.G., Bragliani M., Frisoni M., Zaniboni M.G. and Gasbarrini G. 1993. Asp57-HLA-DQ β chain and DQA1*0501 allele are essential for the onset of DQw2⁺ and DQw2⁻ celiac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 91: 153-156.

Mantzaris G.J., Karagiannis J.A., Priddle J.D. and Jewell D.P. 1990. Cellular hypersensitivity to a synthetic dodecapeptide from human adenovirus 12 which resembles a sequence of A-gliadin in patients with coeliac disease. *Gut* 31: 688-673.

Marsh M.N. 1992. Gluten, Major Histocompatibility Complex and the small intestine. *Gastroenterol.* 102: 330-354.

Marsh M.N. 1993. Gluten sensitivity and latency: can patterns of intestinal antibody secretion define the great silent majority? *Gastroenterol.* 104: 1550-1553.

Mayrhofer G. and Spargo L.D.J. 1990. Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway. *Immunol.* 70: 11-19.

McCormick P.J., Chandrasekhar S. and Millis A.J.T. 1979. Direct visualization of collagens and procollagens in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* 97: 359-366.

Micko S. and Schlaepfer W.W. 1978. Metachromasy of peripheral nerve collagen on polyacrylamide gels stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. *Anal. Biochem.* 88: 566-572.

Molina M.C., Salinas G. and Nieto A. 1989. Título y avidez de los anticuerpos antigliadinas en la enfermedad celíaca. *Inmunología* 8(3): 102-106.

Molina M.C., Salinas G. and Nieto A. 1991. Enzimoinmunoanálisis de alta especificidad y sensibilidad para la determinación de prolaminas tóxicas en alimentos para celíacos. *Inmunología.* 10 (1): 9-14.

Mowat A.M. 1987. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. *Immunol. Today.* 8 (3): 93-97.

Nepom G.T. 1989. Determinants of genetic susceptibility in HLA associated autoimmune disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 53: S53-S62.

O'Farrelly C. and Gallagher R.B. 1992. Intestinal gluten sensitivity: snapshots of an unusual autoimmune-like disease. *Immunol. Today* 13(12): 474-476.

Palavecino E.A., Mota A.H., Awad J., Derosa S., Herrera M., Chertkoff L., Satz L. and Faimboim L. 1990. HLA and celiac disease in Argentina: involvement of the DQ subregion. *Disease Markers* 8: 5-10.

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

Pentilla I.A., Devery J.M., Gibson C.E., LaBrooy J. and Skerritt J.H. 1991. Cellular and humoral responses in coeliac disease. I. Wheat protein fractions. *Clin. Chim. Acta* 204: 95-108.

Perticari S., Not T., Cauci S., Luchesi A. and Presani G. 1992. ELISA method for quantitative measurement of IgA and IgG specific antigliadin antibodies. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 15: 302-309.

Peterson G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al., which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.

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

Powis S.H., Rosenberg M.C., Hall M., Mockridge I., Tonks S., Ivinson A., Ciclitira P.J., Jewell D.P., Lanchbury J.S., Bell J.I. and Trowsdale J. 1993. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 38: 345-350.

Robijn R.J., Bloemendal H., Jainandusing S., Wiegman L.J., Vanberge-Henegouwen G.P., Logtenberg T. and Koningsberger J.C. 1993. Phenotypical and molecular characterization of human monoclonal TcR γ/δ T cell lines from jejunum and colon of healthy individuals. *Scand. J. Immunol.* 38: 247-253.

Roschmann E., Wienker T.F., Gerok W. and Volk B.A. 1993. T-cell receptor variable genes and genetic susceptibility to coeliac disease: an association and linkage study. *Gastroenterol.* 105: 1790-1796.

Rosenberg W.M.C., Wordsworth B.P., Jewell D.P. and Bell J.I. 1989. A locus telomeric to HLA-DPB encodes susceptibility to coeliac disease. *Immunogenetics* 30: 307-310.

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

Rosenthal H.L., Berger R.A., Tyler A.N. and Moore B.W. 1988. Isolation of a component from commercial Coomassie Blue R-250 that stains rubrophilin and other proteins red on polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta* 965: 106-113.

Rust C., Kooy Y., Peña S., Mearin M.L., Kluin P. and Koning F. 1992. Phenotypical and functional characterization of small intestinal TcR γ/δ T cells in coeliac disease. *Scand. J. Immunol.* 35: 459-468.

Salazar M., Yunis I., Alosco S.M., Chopek M. and Yunis E.J. 1992. HLA-DPB1 allele mismatches between unrelated HLA-A,B,C,DR DQA1- identical unrelated individuals with unreactive MLC. *Tissue Antigens* 39: 203-208.

Sanderson I.R. and Walker W.A. 1993. Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders. *Gastroenterol.* 104: 622-639.

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

Sedmak J.J. and Grossberg S.E. 1977. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.* 79: 544-552.

- Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M. and Miflin B.J. 1986.** The classification and nomenclature of wheat proteins. *J. Cereal Sci.* 4: 97-106.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Pappin D.J. and Keen J. 1988.** N-terminal amino acid sequences show that D hordein of barley and High Molecular Weight (HMW) secalins of rye are homologous with HMW glutenin subunits of wheat. *Cereal Chem.* 65: 510-511.
- Shewry P.R. and Tatham A.S. 1990.** The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *Biochem. J.* 267: 1-12.
- Sjolander A. and Magnusson K. 1987.** Effects of antigen challenge on intestinal permeability and morphology in rats immunized with gliadin or ovalbumin. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 84: 284-290.
- Sjostrom H., Friis S.U., Noren O. and Anthonsen D. 1992.** Purification and characterization of antigenic gliadins in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta* 207: 227-237.
- Skerritt J.H., Smith R.A., Wrigley C.W. and Underwood P.A. 1984.** Monoclonal antibodies used to examine cereal grain protein homologies. *J. Cereal Sci.* 2: 215-224.
- Skerritt J.H. 1985a.** A sensitive monoclonal-antibody based test for gluten detection: quantitative immunoassay. *J. Sci. Food Agric.* 36: 987-994.
- Skerritt J.H. and Smith R.A. 1985b.** A sensitive monoclonal-antibody based test for gluten detection: studies with cooked or processed foods. *J. Sci. Food Agric.* 36: 980-986.
- Skerritt J.H. and Underwood P.A. 1986.** Specificity characteristics of monoclonal antibodies to wheat grain storage proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 874: 245-254.
- Skerritt J.H. and Martinuzzi O. 1986.** Effects of solid phase and antigen solvent on the binding and immunoassay of water-insoluble flour proteins. *J. Immunol. Methods.* 88: 217-224.
- Skerritt J.H. 1988.** Immunochemistry of cereal grain storage proteins. *Adv. Cereal Sci. Tech.* vol. IX, 263-322.
- Skerritt J.H. and Lew P.Y. 1990.** Homologies between grain storage proteins of different cereal species. 1. Monoclonal antibody reaction with total protein extracts. *J. Cereal Sci.* 11: 103-121.
- Skerritt J.H. and Hill A.S. 1990a.** Homologies between grain storage proteins of different cereal species. 2. Effects of assay format and grain extractant on antibody cross-reactivity. *J. Cereal Sci.* 11: 123-141.
- Skerritt J.H. and Hill A.S. 1990b.** Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1771-1778.
- Skerritt J.H., Devery J.M., Pentilla I.A. and LaBrooy J. 1991.** Cellular and humoral responses in coeliac disease. 2. Protein extracts from different cereals. *Clin. Chim. Acta* 204: 95-108.
- Skerritt J.H. and Hill A.S. 1991.** Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 257-264.

- Sollid L.M., Markussen G., Ek J., Gjerde H., Vartdal F. and Thorsby E. 1989.** Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J. Exp. Med.* 169: 345-350.
- Sollid L.M. and Thorsby E. 1993.** HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterol.* 105(3): 910-922.
- Stepankova R., Tlaskalova HY., Fric P. and Trebichavsky I. 1989.** Enteropathy induced in young rats by feeding with gliadin. *Folia Biológica* 35: 19-27.
- Tatham A.S., Drake A.F. and Shewry P.R. 1985a.** A conformational study of a glutamine- and proline- rich cereal seed protein, C hordein. *Biochem. J.* 226: 557-562.
- Tatham A.S., Shewry P.R. and Belton P.S. 1985b.** ^{13}C -n.m.r. study of C hordein. *Biochem. J.* 232: 617-620.
- Tatham A.S., Mifflin B.J. and Shewry P.R. 1985c.** The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: relationships to gluten elasticity. *Cereal Chem.* 62: 405-412.
- Tatham A.S., Field M.J., Smith S.J. and Shewry P.R. 1987.** The conformations of wheat gluten proteins, aggregated gliadins and Low Molecular Weight subunits of glutenin. *J. Cereal Sci.* 5: 203-214.
- Tatham A.S. and Shewry P.R. 1991.** Conformational Analysis of secalin storage proteins of rye. *J.Cereal Sci.* 14: 15-23
- Thorne C.J.R. 1978.** Techniques for determining protein concentration. *Techn. Prot. Enz. Biochem.* B104: 1-18.
- Tighe M.R., Hall M.A., Barbado M., Cardi E., Welsh K.I. and Ciclitira P.J. 1992.** HLA class II alleles associated with coeliac disease susceptibility in a southern european population. *Tissue Antigens.* 40: 90-97.
- Tijssen P. 1985.** Practice and theory of enzymeimmunoassays. Ed. Elsevier. Amsterdam.
- Tkachuk R. and Mellis V.J. 1987.** Use of two dimensional electrophoresis procedure to characterize wheat proteins. In *Gluten proteins*; Lásztity, R., Békés, F., Eds.; World Scientific, Singapore.
- Towbin H. 1979.** Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4356.
- Trejdosiewicz L.K. 1992.** Intestinal intraepithelial lymphocytes and lymphoepithelial interactions in the human gastrointestinal mucosa. *Immunol. Letters* 32: 13-20.
- 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: 21-23.
- Troncone R. and Auricchio S. 1991.** Gluten-sensitive enteropathy. *Food Reviews Int.* 7(2): 205-231.
- Verkasalo M.A., Arato A., Savilahti E. and Tainio V. 1990.** Effect of the diet and age on jejunal and circulating lymphocyte subsets in children with coeliac disease: persistence of CD4 $^{+}$ intraepithelial T cells through treatment. *Gut* 31: 422-425.

Viney J., Macdonald T.T. and Spencer J. 1990. γ/δ T cells in the gut epithelium. Gut 31: 841-844.

Volta U., Molinaro N., Fratangelo D. and Bianchi F.B. 1990. IgA subclass antibodies to gliadin in serum and intestinal juice of patients with celiac disease. Clin. Exp. Immunol. 80: 192-195.

Weir D.M. 1978. Immunochemistry (vol. 1). Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications.

Wieser H. and Belitz H.D. 1989. Amino acid compositions of avenins separated by reversed/phase High-Performance Liquid Chromatography. J. Cereal Sci. 9: 221-229.

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

Wilson C.M. 1992. An update on proteins stains: Amido Black, Coomassie Blue G and Coomassie Blue R. Biotechnic. Histochem. 67 (4): 224-234.



Dra. MARIA CRISTINA ARON
DIRECTORA



CHARLES ALBERTO

