

24ª REUNIÓN DEL GRUPO DE TRABAJO SOBRE TOXICIDAD Y ANÁLISIS DE LAS PROLAMINAS

Ancona (Italia), 1-2 octubre 2010

El Grupo de Trabajo sobre Toxicidad y Análisis de Prolaminas fue creado con el objetivo de coordinar los distintos laboratorios que investigan sobre las metodologías de detección de gluten en alimentos y la evaluación clínica de los pacientes celíacos. Con el fin de poner en común los nuevos avances en este campo organizan reuniones periódicas. A continuación se muestran los principales temas tratados en la reunión de este año.



Estudios analíticos

En la actualidad no existe un método válido que permita cuantificar el gluten de los alimentos midiendo directamente las proteínas implicadas. Hoy por hoy, la cantidad de gluten presente en un alimento se calcula midiendo la cantidad de prolaminas (fracción del gluten soluble en alcohol) y multiplicando ese resultado por dos.

Para ello existen diversos métodos:

- Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*): cuantifica el contenido total de proteínas de reserva (gluten), pero requiere que dichas proteínas estén intactas.
- Cromatografía Líquida / Espectrometría de Masas (LC/MS, *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*): es válida para cuantificar fragmentos proteicos (péptidos), pero es una técnica muy laboriosa.
- Ensayo por Inmunoabsorción Asociado a Enzimas (ELISA, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*): permite cuantificar péptidos concretos, y presenta variantes aptas para cuantificar gluten a partir de proteínas intactas (ELISA tipo sándwich) o de proteínas parcialmente hidrolizadas (ELISA tipo competitivo).

Todos estos métodos requieren una puesta a punto a partir de materias primas de referencia en las que la cantidad de gluten real es determinada por otros métodos. Dichas muestras de referencia suelen contener una mezcla de proteínas y péptidos derivados de gluten procedente de distintas variedades de cereales.

En el caso de la técnica ELISA para la detección de gluten, la mayoría de los métodos desarrollados están basados en uno u otro de los siguientes anticuerpos: el anticuerpo R5, que reconoce la secuencia de aminoácidos QQPFP presente en las gliadinas alfa, gamma y omega del gluten de trigo, en las C-hordeínas de la cebada y en las omega-secalinas del centeno; y el anticuerpo de Skerit, que reconoce las w-gliadinas del trigo (también las gluteninas), las C-hordeínas de la cebada (débilmente) y las omega-secalinas del centeno.

El método de extracción de las proteínas del gluten a partir del alimento también condiciona el resultado de la cuantificación. Básicamente existen dos tipos:

- Extracción de prolaminas utilizando una solución acuosa de etanol.
- Extracción de prolaminas y gluteninas utilizando una solución *cocktail* que contiene un agente reductor, el beta-mercaptoetanol.

En este apartado se repasaron nuevos métodos de análisis de gluten en alimentos que están en fase de preparación, ensayo o evaluación por parte de distintos grupos de investigación.

El Dr. Peter Köhler (Centro Alemán de Investigación de Química Alimentaria de Garching, Alemania) presentó los resultados de un estudio comparativo de métodos de análisis de gluten

en harinas procedentes de trigo, cebada, centeno y avena. En el estudio se emplearon distintos kits comerciales basados en la técnica ELISA, que permite cuantificar el contenido de gluten, y otros basados en la técnica de flujo lateral (*Lateral Flow Assay*), apta para detectar la presencia de gluten, pero no para cuantificarlo.

En el estudio se concluye que la técnica ELISA de tipo sándwich es mejor para detectar gluten a partir de proteínas intactas, mientras que la de tipo competitivo es la idónea para detectar proteínas parcialmente hidrolizadas. El kit que mejores resultados ofreció fue RIDASCREEN^R Gliadin Sándwich. Los otros kits analizados fueron RIDASCREEN^R Gliadin Competitive, Neogen^R Biokits Gluten Assay Kit, ELISA SYSTEMS Gliadin y Wheat Protein ELISA Kit (Gliadin) from Morinaga.

En cuanto a los ensayos de flujo lateral, se comprobó su buen funcionamiento y se planteó la necesidad de obtener dispositivos semicuantitativos.

Por su parte, la Dra. Renate van Eckert (Universidad Victoria de Wellington, Nueva Zelanda) destacó la disparidad de resultados obtenidos al cuantificar gluten con distintos anticuerpos empleados tradicionalmente en el análisis de gluten en alimentos. Concretamente comparó los anticuerpos R5 (Sorell et al, 1988), 401.21 (Skerrit & Hills, 1990), y PN3 (Ellis et al, 1998), mostrando que los diferentes resultados son debidos a las distintas secuencias tóxicas del gluten que reconoce cada uno. En concreto, el anticuerpo R5 detecta eficazmente las gliadinas gamma y omega, y con menor intensidad las gliadinas alfa. El anticuerpo PN3, por su parte, reconoce fielmente las gliadinas alfa, pero no las gamma, y el anticuerpo 401.21 es especialmente eficaz en la detección de gluteninas. Por tanto, la efectividad de cada anticuerpo depende de la fracción tóxica de gluten predominante en el alimento que se quiere analizar.

La Dra. Päavi Kanerva (Universidad de Helsinki, Finlandia) comentó la problemática de la modificación de la estructura del gluten durante el proceso de elaboración de alimentos, ya que ello da lugar a errores en la cuantificación de gluten. Ejemplificó esta situación mostrando estudios de cuantificación en distintos alimentos manufacturados utilizando los kits ELISA (tipo sándwich y competitivo) basados en el anticuerpo R5. Según sus resultados, el nivel de detección en muestras hidrolizadas se ve reducido hasta 600 veces si se emplea el método ELISA de tipo sándwich y unas 125 veces si se emplea el de tipo competitivo, en comparación con los resultados de cuantificación del gluten nativo. Concluye, por tanto, que el uso de ingredientes con gluten modificado da lugar a una subestimación del contenido real de gluten en el alimento.

El Dr. Frits Koning (Centro Médico Universitario de Leiden, Holanda) presentó un nuevo kit ELISA que pretende presentar al *Codex Alimentarius* como método de referencia alternativo al ELISA-R5 hoy vigente para cuantificar gluten en alimentos. Este nuevo kit, denominado Gluten-Tec^R, ha sido probado con éxito en diferentes laboratorios. Es válido tanto para proteínas intactas como para proteínas parcialmente hidrolizadas, y no da lugar a falsos positivos. Además, aporta la ventaja de ser calibrado utilizando un péptido sintético que contiene la secuencia que será reconocida específicamente por el anticuerpo incluido en el kit, y que coincide con la que estimula a las células T del intestino de los pacientes celíacos.

Por otro lado, el Dr. Richard Fielder (Laboratorios Romer, Reino Unido) presentó un nuevo test de flujo lateral, el AgraStrip^R Gluten, basado en el anticuerpo G12 que detecta los péptidos tóxicos en trigo, cebada y centeno. El sistema de extracción de muestra es sencillo y los resultados se obtienen en 10 minutos. En el desarrollo de este kit han participado grupos españoles del CSIC y de la Universidad de Sevilla, así como la empresa española Biomedal y la Universidad de Stanford (EEUU).

Por último, la Dra. Catherine Torgler (Laboratorios Biomedal, España) presentó otro kit de detección de gluten, GlutenTox, basado en un anticuerpo que detecta la secuencia más tóxica del gluten de trigo, comúnmente conocida como péptido 33-mer, así como de cebada y centeno. Este método analítico está disponible para su uso en laboratorios, mediante la técnica ELISA y también a nivel doméstico, mediante la técnica de flujo lateral.

Estudios clínicos

En este apartado se presentaron varios estudios relacionados por un lado con el efecto de sustitutos del trigo en la alimentación de los celíacos y por otro con nuevas técnicas de diagnóstico de la EC.

En cuanto al uso de materia prima alternativa al trigo, el Dr. Paul Cicilitira (King's College de Londres, Reino Unido) presentó un estudio en el que se administraban 50 gr de quinoa diarios durante 6 semanas a pacientes celíacos que en principio hacían correctamente la dieta sin gluten como parte de su alimentación. La quinoa es un pseudocereal rico en aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y fibra, que además tiene un elevado contenido proteico, por lo que es una de las materias primas propuestas para la elaboración de productos especiales para celíacos. En el estudio se analizaron los posibles cambios clínicos, analíticos, inmunológicos e histológicos de la quinoa en estos pacientes. El resultado fue que se observó cierta mejoría en la arquitectura intestinal y un descenso en los niveles de colesterol en los sujetos que consumieron quinoa durante el periodo establecido. El autor concluye que si bien la bajada de colesterol puede ser atribuida a la mayor ingesta de fibra presente en la quinoa, la mejoría de la lesión intestinal tal vez sea debida al hecho de que las personas son más estrictas al hacer la dieta sin gluten cuando saben que están siendo evaluadas para un estudio, más que a un posible efecto beneficioso de la quinoa en este aspecto.

Por su parte, el Dr. Ricardo Troncone (Universidad Federico II de Nápoles, Italia) mostró los resultados de un trabajo acerca de la toxicidad de la avena. Los principales problemas que presenta este cereal para los celíacos es el riesgo de contaminación con cereales tóxicos, la heterogeneidad de la avena (existen numerosas variedades con diferente toxicidad) y la existencia de pacientes celíacos especialmente sensibles a la avena. En el estudio se empleó un cultivo de células intestinales que fueron expuestas a diferentes variedades de avena para evaluar distintos parámetros inmunológicos que revelarían la sensibilidad intestinal frente a este cereal. El resultado fue que no se observan indicios de inflamación relevantes, aunque sí incipientes, lo cual puede ser debido a que el gluten de la avena, al contener pocas secuencias tóxicas, pasa más fácilmente desapercibido al sistema inmunológico. No obstante, se recomienda no consumir grandes cantidades de productos basados en avena.

El Dr. Frits Koning (Centro Médico Universitario de Leiden, Holanda) planteó la problemática de la obtención de variedades de trigo seguras para el colectivo celíaco. Por una parte, el trigo es un cereal complejo desde el punto de vista genético: el genoma de la especie empleada actualmente es el resultado del cruce de otras a lo largo de la historia encaminado a la obtención de variedades de mejor calidad para la elaboración de masas. Ello ha llevado aparejado un enriquecimiento en la toxicidad del gluten. Por otro lado, la toxicidad de las diversas fracciones del gluten es variable: las más tóxicas son las gliadinas alfa y omega, siendo las gluteninas de alto y bajo peso molecular las fracciones menos tóxicas; las gliadinas gamma se encuentran en un punto intermedio de toxicidad. El estudio sistemático de las gliadinas alfa presentes en el genoma del trigo muestra que no existe ninguna que no tenga al menos un fragmento capaz de estimular al sistema inmunológico de los celíacos. Sin embargo, existen numerosas variedades en las que falta alguna región tóxica dentro de los genes de las gliadinas alfa. De ahí que el grupo del Dr. Koning esté tratando de reconstruir genes carentes de regiones tóxicas combinando las secuencias seguras de diferentes gliadinas alfa para ser después introducidas en cereales sin gluten (arroz, maíz) con el fin de proporcionarles las propiedades panificables del trigo.

Finalmente, el Dr. Thomas Mothes (Universidad de Leipzig, Alemania) presentó los resultados de un nuevo anticuerpo empleado en el diagnóstico de la enfermedad celíaca en niños pequeños. En general, los más eficaces son los anticuerpos antitransglutaminasa tisular (tTG) de clase IgA y los antigliadina deamidada (DGP) de clase IgG. Sin embargo, en niños pequeños no son del todo efectivos y son los anticuerpos antigliadina nativa (AGA) de clase IgA los considerados más eficaces. El nuevo anticuerpo estudiado, denominado GAF3X, está dirigido contra los péptidos deamidados de gliadina y, según los resultados obtenidos, los de clase IgG parecen ser tan eficaces como los anticuerpos AGA.

La sensibilidad al gluten

El Dr. Alessio Fasano (Universidad de Maryland, EEUU) ofreció una conferencia en la que trató el tema de la sensibilidad al gluten como un fenómeno que va más allá de la enfermedad celíaca.

La mayor parte de la historia evolutiva de la especie humana ha transcurrido en ausencia de gluten, por lo que no se han desarrollado enzimas digestivas capaces de degradarlo. Es en el momento en que el hombre deja de ser nómada (cazador-recolector) y pasa a ser sedentario (agricultor-ganadero), hace unos 10.000 años, cuando se empieza a consumir gluten procedente del cultivo de cereales como el trigo. En el último siglo se han ido desarrollando nuevas variedades de trigo enriquecidas en gluten, y por tanto más tóxicas para las personas celíacas, cuyas propiedades panificables son óptimas. A día de hoy nos encontramos que una proporción importante de la población tiene problemas derivados del consumo de gluten, no sólo enfermedad celíaca, sino también alergia al gluten y sensibilidad al gluten.



Según el Dr. Fasano, la sensibilidad al gluten afecta al 6% de la población, y se puede diagnosticar cuando existen indicios de reactividad al gluten (como puede ser la presencia de anticuerpos antigliadina) pero no se detectan señales de reacción alérgica frente al trigo ni fenómenos de autoinmunidad ni, por supuesto, enfermedad celíaca (anticuerpos anti-tTG o EMA positivos o lesión intestinal). Los síntomas pueden solapar con los de la EC o la alergia al gluten y desaparecen al hacer dieta sin gluten.

En cuanto a la enfermedad celíaca, hace años se consideraba que para desarrollarla bastaba con tener predisposición genética y consumir gluten, y que únicamente afectaba a niños, provocando importantes diarreas y retraso de crecimiento. Hoy está ampliamente aceptado que los factores ambientales juegan un papel importante, y que la enfermedad puede desencadenarse a cualquier edad y con unas manifestaciones clínicas de lo más diversas, especialmente en personas adultas. El mejor conocimiento de la EC ha provocado que, por ejemplo, en Estados Unidos, la incidencia de la enfermedad se haya multiplicado por 5 en los últimos 30 años y que, según los datos epidemiológicos, desde el año 2003 el número de nuevos diagnosticados se duplica cada 3 años.

Por último, comentó la necesidad de simplificar los protocolos de diagnóstico de la enfermedad celíaca y presentó lo que él, junto con el Dr. Catassi, han denominado "la regla 4 de 5", que viene a decir que una persona puede ser diagnosticada como celíaca de forma certera si cumple 4 de los siguientes 5 requisitos: 1) síntomas típicos de EC; 2) niveles positivos y elevados de anticuerpos específicos de EC (tTG, EMA); 3) genética compatible con EC (HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8); 4) atrofia de vellosidades; 5) respuesta favorable a la dieta sin gluten. Según esta regla, la biopsia intestinal podría evitarse si se dan las 4 otras situaciones.

Nuevas terapias



El Dr. Peter Köhler (Centro Alemán de Investigación de Química Alimentaria de Garching, Alemania) hizo un repaso de un grupo de enzimas, conocidas como peptidasas, que pueden ser utilizadas para degradar el gluten y eliminar, por tanto, su toxicidad durante la elaboración de alimentos aptos para celíacos o bien ser empleadas como terapia oral complementaria a la alimentación sin gluten. Estas enzimas pueden proceder de bacterias, de hongos o incluso de los propios cereales con gluten, y su eficacia depende de su capacidad para destruir los péptidos más tóxicos del gluten. Además, si se quieren emplear en la

elaboración de productos aptos para celíacos deben ser resistentes a los procesos industriales, y si lo que se plantea es su uso terapéutico, deben soportar los procesos digestivos para lograr la degradación del gluten antes de que éste llegue al intestino.

En los últimos 10 años se ha mejorado mucho en cuanto a la identificación, aislamiento y aplicación de estas enzimas para la eliminación de la toxicidad del gluten. Las investigaciones más avanzadas a este respecto están basadas en las siguientes enzimas:

- PEP: es una prolil endopeptidasa de origen bacteriano capaz de degradar el péptido más tóxico del gluten, el 33-mer. Tiene una actividad baja y no funciona al pH ácido del estómago, por lo que no es viable como terapia oral.
- EP-B2: es una cisteín-endopeptidasa de la cebada que es activa a pH ácido.

La combinación de estas dos enzimas está siendo empleada por la empresa farmacéutica Alvine Therapeutics para el desarrollo de un fármaco, ALV003, que se administrará por vía oral y será capaz de degradar el gluten antes de alcanzar el intestino. Actualmente se encuentra en fase 2a, encaminada a determinar la seguridad del fármaco. En todo caso, su uso será complementario a la dieta sin gluten con el objeto de minimizar los riesgos de las transgresiones.

- AN-PEP: es una endopeptidasa procedente del hongo *Aspergillus niger* capaz de degradar tanto proteínas intactas como péptidos. Funciona al pH ácido estomacal y resiste la acción de las enzimas estomacales. Puede ser utilizada para eliminar la toxicidad del gluten durante la elaboración de alimentos y como fármaco. En este sentido, ha superado la fase I y está en preparación la fase II.

Otras enzimas más recientemente investigadas proceden de especies bacterianas del género *Lactobacillus* o bien de cereales como el arroz, y son muy eficaces degradando el gluten.

En este sentido, el Dr. Marco Gobetti (Universidad de Bari, Italia) mostró cómo el uso de una combinación de proteasas y peptidasas permite degradar casi por completo el gluten durante el proceso de fermentación de las masas. Las harinas de trigo elaboradas de esta manera parecen ser bien toleradas por los celíacos estudiados, aunque se requieren periodos de seguimiento más largos para confirmar este aspecto. Además, los productos elaborados con estas harinas tienen mejor calidad en cuanto a sabor y textura y un periodo de caducidad aceptable en comparación con sus equivalentes basados en materia prima sin gluten (arroz, maíz, etc.).

Finalmente, el Dr. Mauro Rossi (Instituto de Ciencias de la Alimentación de Avellino, Italia) propuso el empleo de la enzima bacteriana mTG, que provoca una modificación química de los péptidos derivados del gluten, denominada transamidación, evitando con ello la deamidación que lleva a cabo la enzima intestinal transglutaminasa tisular (tTG) y que potencia la toxicidad del gluten. Así, el uso de mTG permite que los péptidos derivados del gluten tengan menor capacidad para estimular el sistema inmunológico del paciente celíaco. El consumo de productos elaborados con harina de trigo tratada con esta enzima no parece provocar alteraciones intestinales ni inmunológicas, y el estado general del paciente experimenta mejoría. No obstante, analizando los síntomas por separado, únicamente se reduce el estreñimiento, mientras que no hay diferencias entre consumidores de gluten nativo o gluten tratado con mTG en cuanto al dolor abdominal, diarrea, gases y vómitos.

Juan Ignacio Serrano Vela
Investigación y Formación, ACM