

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias  
Máster Universitario en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

# **Nuevas estrategias terapéuticas en la hipersensibilidad al trigo**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Violeta Ruipérez Prádanos  
Palencia, 2012

Tutores: Manuel Gómez Pallarés  
Eduardo Arranz Sanz

## Contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
1.1. EL TRIGO Y SUS DERIVADOS .....	2
1.2. HIPERSENSIBILIDAD AL TRIGO .....	4
1.2.1. <i>Alergia al trigo: hipersensibilidad de tipo I</i> .....	4
1.2.2. <i>Celiaquía: hipersensibilidad de tipo IV</i> .....	6
1.3. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD .....	7
1.3.1. <i>Asma del panadero (Baker's asthma)</i> .....	7
1.3.2. <i>Anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (WDEIA)</i> .....	8
1.3.3. <i>Celiaquía</i> .....	8
1.4. NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN LA HIPERSENSIBILIDAD AL TRIGO .....	9
1.4.1. <i>Modificación genética</i> .....	9
1.4.2. <i>Silenciamiento génico (RNA de interferencia)</i> .....	9
1.4.3. <i>Modulación de la respuesta inmune</i> .....	10
1.4.4. <i>Otras estrategias</i> .....	11
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. ESTRATEGIA 1: IDENTIFICACIÓN DE PROLAMINAS EXTRAÍDAS DE TRIGO.....	12
2.2. ESTRATEGIA 2: IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS EN PROLAMINAS	12
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIALES.....	13
3.2. SUERO HUMANO .....	13
3.3. EXTRACCIÓN DE PROLAMINAS.....	13
3.4. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE SDS-PAGE .....	13
3.5. DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD MEDIADA POR IGE .....	14
3.6. DETERMINACIÓN DE IGE ESPECÍFICA FRENTE A PÉPTIDOS (DOT BLOT).....	14
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>15</b>
4.1. ESTRATEGIA 1: IDENTIFICACIÓN DE PROLAMINAS EXTRAÍDAS DE TRIGO.....	15
4.2. ESTRATEGIA 2: IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS EN PROLAMINAS	21
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>23</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>25</b>

## **Nuevas estrategias terapéuticas en la hipersensibilidad al trigo**

**Violeta Ruipérez**

Máster Universitario en Calidad, Desarrollo en Innovación de Alimentos. Universidad de Valladolid.

### RESUMEN

Las proteínas del gluten, especialmente las prolaminas, además de responsables de la enfermedad celiaca son los principales alérgenos en el trigo. Actualmente, el desarrollo de estrategias terapéuticas incluye la selección de variedades menos inmunogénicas, lo que requiere la identificación de alérgenos. El objetivo de este estudio fue la búsqueda de herramientas para la identificación de prolaminas alergénicas mediante dos estrategias, i) identificación de prolaminas extraídas de trigo y ii) búsqueda de péptidos inmunogénicos presentes en las prolaminas. Los resultados muestran gran heterogeneidad de alérgenos presentes en los trigos, variando según el paciente. No se detectaron diferencias entre el trigo duro actual y su variante antigua, encontrando mayor cantidad de prolaminas alergénicas en trigos duros que en blandos. Debido a la cantidad de proteínas detectadas, este estudio supone un paso previo en la identificación de proteínas que debe ser completado con otras técnicas que permitan una identificación más precisa.

*Palabras clave: alergia, celiacía, hipersensibilidad, gliadina, gluten, prolaminas, trigo*

### ABSTRACT

Gluten proteins, especially prolamins, as well as responsible for celiac disease are the main allergens in wheat. Currently, the development of therapeutic strategies includes the selection of less immunogenic varieties, requiring the identification of allergens. The aim of this study was the search for tools to identify allergenic prolamins by two strategies, i) identification of extracted prolamins of wheat and ii) search for immunogenic peptides found in prolamins. The results show great heterogeneity of allergens in wheat, varying according to the patient. There were no differences between durum wheat and its old variant, finding more allergenic prolamins in durum wheat than in soft. Due to the amount of proteins detected, this study represents a first step in identifying proteins that must be completed with other techniques that allow more precise identification.

*Keywords: allergy, celiac disease, hypersensitivity, gliadin, gluten, prolamins, wheat*

## 1. Introducción

La reacción adversa a los alimentos es una respuesta clínica anormal que se produce tras la ingestión de un alimento, sus derivados o aditivos presentes en ellos. Estas reacciones se clasifican en función del mecanismo, formando dos grandes grupos: reacciones adversas con mediación del sistema inmunológico (hipersensibilidad) y reacciones adversas no mediadas por el sistema inmunológico (intolerancia).

En la actualidad, huevos, leche, frutos secos, sésamo, pescado, marisco, trigo y soja son algunos de los alimentos implicados con más frecuencia en las reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulina E (IgE), denominadas comúnmente alergias. La prevalencia de las alergias varía con la edad, siendo más frecuente en niños, aproximadamente el 6% de los niños frente al 1-2% de los adultos (Hodge, Swain & Faulkner-Hogg, 2009), la localización geográfica y posiblemente, en función de la raza o el origen étnico. Los estudios epidemiológicos realizados han generado numerosas teorías sobre los posibles factores de riesgo, incluyendo factores modificables, como la dieta materna e infantil o la obesidad (Sicherer, 2011). Por otro lado, la reacción de hipersensibilidad no mediada por IgE a ciertos cereales conocida como celiaquía, es cada vez más frecuente entre la población. Su prevalencia en países occidentales es aproximadamente del 1% (Dube et al., 2005).

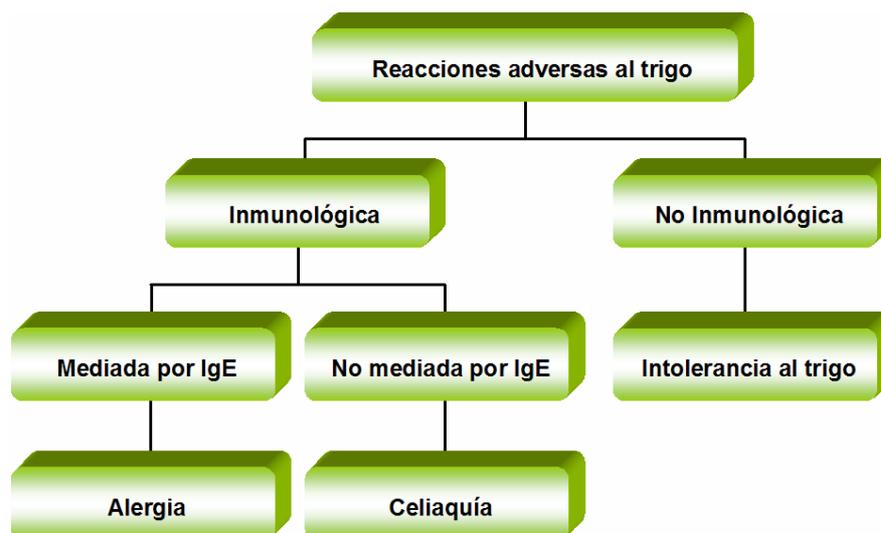
Los mismos alimentos que causan la alergia alimentaria pueden ser también responsables de la intolerancia alimentaria. La prevalencia de la intolerancia alimentaria es difícil de estimar debido a que en la actualidad no se dispone de ensayos fiables para su diagnóstico. Estudios epidemiológicos estiman que un 5-20% de los pacientes sufren intolerancia alimentaria (Hodge, Swain & Faulkner-Hogg, 2009).

### 1.1. El trigo y sus derivados

El trigo y sus derivados son una parte importante de la dieta humana, pero su ingesta puede dar lugar a reacciones adversas en niños y adultos. Estas reacciones están asociadas a diversos síntomas en función de la exposición al alérgeno (proteínas del trigo) y del mecanismo por el que se produzcan (Fig. 1).

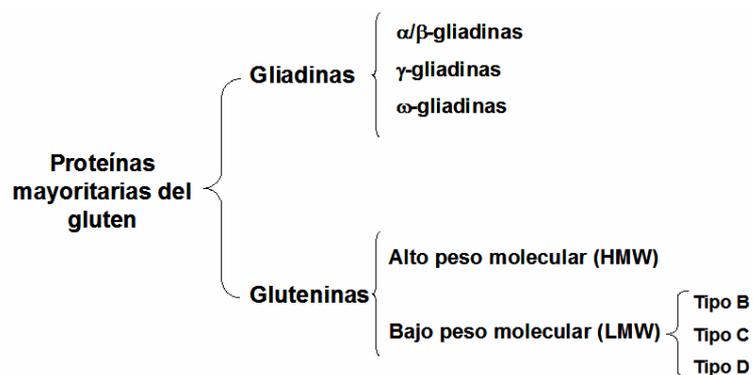
La semilla de trigo tiene un contenido de proteína aproximado de 10-15% de su peso seco. La variación en la cantidad de proteína está influenciada, además de por la genética, por la disponibilidad de nutrientes de la planta (Salcedo, Quirce & Diaz-Perales, 2011, Tatham & Shewry, 2008).

Las proteínas se pueden clasificar en función de su solubilidad (fracciones de Osborne) o de su funcionalidad. A principios del siglo XX, el químico T. B. Osborne definió cuatro fracciones de proteínas diferentes en función de su solubilidad: solubles en agua (albúminas), solubles en sales diluidas (globulinas), solubles en alcohol/agua (prolaminas) y solubles en soluciones de ácido diluidas (gluteninas). Sin embargo, actualmente, es más común clasificar las proteínas desde un punto de vista funcional como proteínas del gluten y proteínas no pertenecientes al gluten (Tatham & Shewry, 2008).



**Fig. 1.** Reacciones adversas al trigo.

Las proteínas del gluten son los principales determinantes de las propiedades de cohesividad y viscoelasticidad en la harina procesada y constituyen aproximadamente un 70-80% de la proteína presente en la harina. Las proteínas mayoritarias en el gluten son las gliadinas y gluteninas (Fig. 2), que poseen secuencias repetitivas ricas en residuos de glutamina y prolina (Wieser, 2007). Debido a la redundancia del genoma del trigo, se encuentran presentes más de 100 proteínas del gluten en una sola variedad de trigo (Camarca, Del Mastro & Gianfrani, 2012). Las gliadinas son proteínas monoméricas que interactúan mediante la formación de enlaces no covalentes y se clasifican en tres grandes grupos en función de su movilidad electroforética:  $\alpha/\beta$ -gliadinas (rápidas),  $\gamma$ -gliadinas (intermedias) y  $\omega$ -gliadinas (lentas). Las gluteninas son polímeros de unidades individuales de proteína unidos mediante puentes disulfuro. En condiciones reductoras, las subunidades se clasifican en función de su separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en gluteninas de alto peso molecular (HMW) y de bajo peso molecular (LMW) (Sotkovsky et al., 2011, Tatham & Shewry, 2008).



**Fig. 2.** Proteínas mayoritarias del gluten.

### 1.2. Hipersensibilidad al trigo

Las respuestas de hipersensibilidad al trigo (Tabla 1) están mediadas por el sistema inmunológico en respuesta a uno o varios alérgenos, dando lugar a diferentes patologías dependiendo del mecanismo activado (células efectoras, mediadores...).

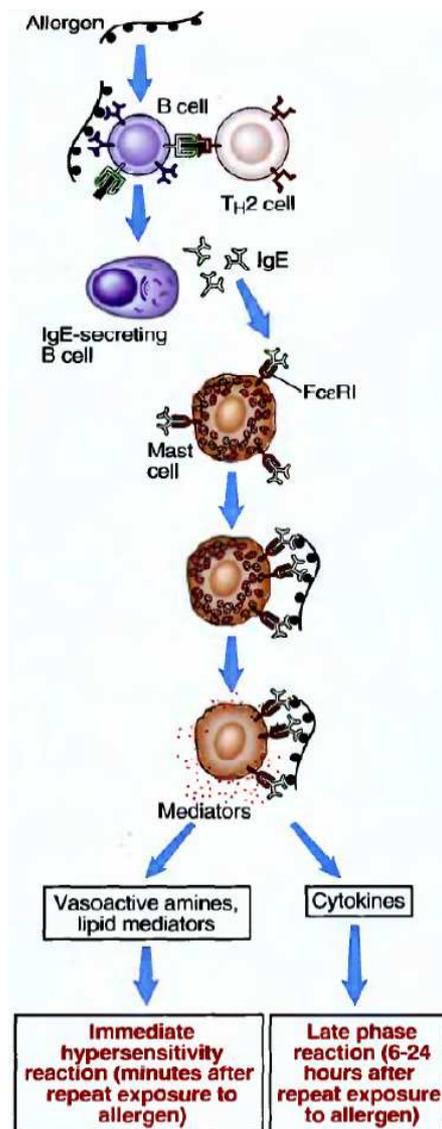
**Tabla 1.** Reacciones de hipersensibilidad al trigo.

	Alergia	Celiaquía
Tipo de hipersensibilidad	Hipersensibilidad tipo I (Inmediata)	Hipersensibilidad tipo IV (Retardada)
Células efectoras	Linfocitos T <sub>H</sub> 2 CD4+ Linfocitos B Mastocitos/eosinófilos	Linfocitos T <sub>H</sub> 1 CD4+ Macrófagos/células dendríticas Linfocitos T CD8+
Mediadores	Interleuquinas Histamina Citoquinas	IFN-γ Interleuquinas Citoquinas
Alérgenos	Proteínas del trigo	Gluten
Tiempo de reacción	Inmediata (minutos a 1-2 h)	Horas a días

#### 1.2.1. Alergia al trigo: hipersensibilidad de tipo I

La hipersensibilidad de tipo I o alergia, se desarrolla cuando el paciente se expone a la presencia de un alérgeno presente en el trigo mediante ingestión (dermatitis atópica, anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo...), inhalación (asma del panadero) o contacto con la piel (urticaria) (Sotkovsky et al., 2011).

La hipersensibilidad de tipo I inmediata se desencadena debido a la producción de mediadores, liberados por los mastocitos. El alérgeno estimula los linfocitos  $T_H2$  que mediante la liberación de citoquinas activan a los linfocitos B, capaces de producir IgE específica para el antígeno. La IgE se fija a la membrana del mastocito, entrando en contacto con el alérgeno. Esto produce la desgranulación del mastocito y la liberación de sustancias químicas como la histamina, dando lugar a una reacción alérgica inmediata (Fig. 3). Posteriormente, pueden producirse reacciones alérgicas tardías mediante la activación de los eosinófilos (Abbas & Lichtman, 2004).



**Fig. 3.** Hipersensibilidad de tipo I. Adaptada de Abbas & Lichtman, 2004.

1.2.2. Celiacúa: hipersensibilidad de tipo IV

La celiacúa es una hipersensibilidad de tipo IV causada por la ingestión de proteínas que forman el gluten del trigo, también presentes en otros cereales. Las respuestas inmune innata y adaptativa forman parte de la patogénesis de esta enfermedad autoinmune crónica (Gianfrani, Auricchio & Troncone, 2005, Jabri & Sollid, 2006). La celiacúa tiene un importante componente genético, siendo los genes que codifican para el antígeno leucocitario humano (HLA) DQ2 o DQ8, los mayores factores de riesgo.

La ingestión de ciertas proteínas del gluten genera lesiones en el intestino debido a la activación de células T que reconocen péptidos presentes en el gluten que son presentados por las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (Gil-Humanes, Piston, Tollefsen, Sollid & Barro, 2010). El daño tisular está causado por la respuesta retardada de las células T CD4+ o por la lisis celular debida a la actuación de los linfocitos T citotóxicos CD8+ (Abbas & Lichtman, 2004) (Fig. 4). La secreción de citoquinas por las células T CD4+ induce el proceso inflamatorio y la activación de macrófagos, dañando los tejidos. Las células T CD8+ producen el daño tisular mediante la eliminación directa de estas células (Abbas & Lichtman, 2004).

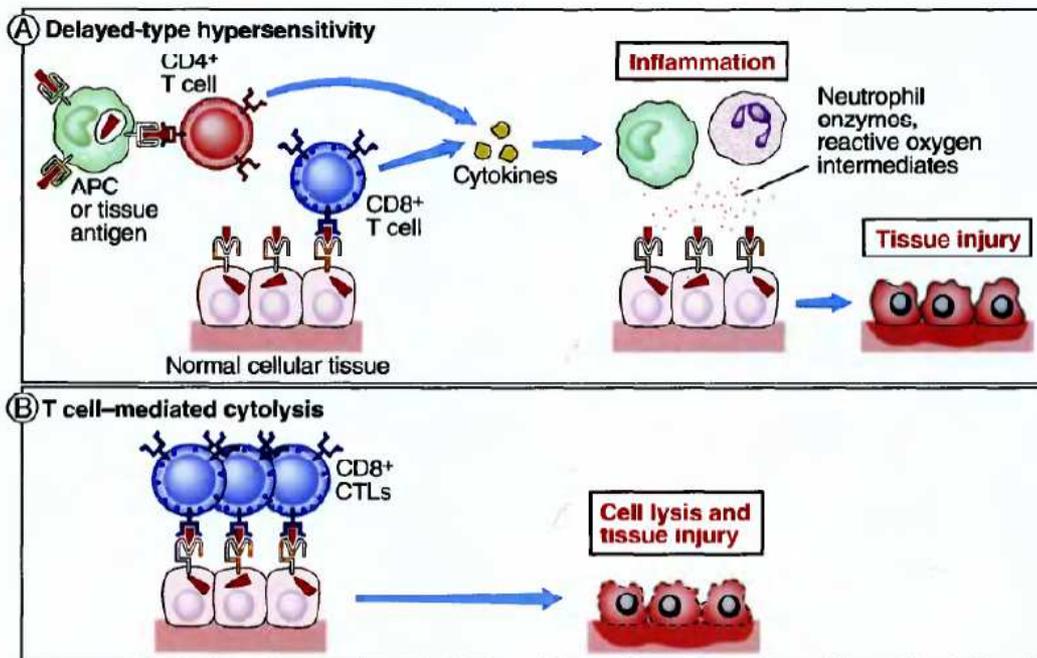


Fig. 4. Hipersensibilidad de tipo IV. Adaptada de Abbas & Lichtman, 2004.

### 1.3. *Proteínas implicadas en las reacciones de hipersensibilidad*

Entre las reacciones alérgicas a cereales mediadas por IgE, el asma del panadero (Baker's asthma) y la anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (WDEIA) son los dos tipos de alergia más ampliamente estudiados (Mittag et al., 2004). El asma del panadero es una enfermedad ocupacional que se produce por la inhalación de harina, afectando a un 4-25% de los trabajadores (Bittner, Grassau, Frenzel & Baur, 2008). En adultos, la WDEIA es la alergia más frecuente (Battais et al., 2005). Los sujetos que padecen WDEIA, muestran una reacción alérgica después de la ingestión del cereal seguida de la realización de ejercicio físico. La ingestión del alimento o realización del ejercicio por sí solas no son capaces de producir esta reacción, necesiéndose la combinación de ambas (Tatham & Shewry, 2008).

La celiaquía es la enteropatía más común causada por alimentos en humanos, afectando a uno de cada cien individuos en los países occidentales. Esta patología se produce en individuos genéticamente predispuestos, donde el reconocimiento de péptidos del gluten presente en el trigo por el antígeno leucocitario humano DQ2 o DQ8, produce una reacción de hipersensibilidad de tipo IV. Además del trigo, otros cereales como cebada, centeno, triticale y algunas variedades de avena, en los que está presente el gluten, causan esta respuesta inmune (Camarca et al., 2009, Comino et al., 2011).

#### 1.3.1. *Asma del panadero (Baker's asthma)*

Actualmente, diversos estudios apuntan como alérgenos principales asociados al asma del panadero a la familia de inhibidores  $\alpha$ -amilasa/tripsina, que incluye una amplia cantidad de proteínas solubles en sales, como los principales causantes de esta alergia (Gomez et al., 1990, Salcedo, Quirce & Diaz-Perales, 2011, Tatham & Shewry, 2008). Además de estos alérgenos, estudios recientes identifican nuevas proteínas presentes en el trigo que muestran reactividad con el suero procedente de pacientes con asma de panadero. La peroxidasa, tioredoxina, proteínas de transferencia de lípidos y prolaminas (gliadinas y gluteninas) son algunos de los alérgenos descritos (Salcedo, Quirce & Diaz-Perales, 2011, Tatham & Shewry, 2008).

La identificación de las gliadinas como alérgeno implicado en el asma del panadero se confirmó en un estudio en el que se describe la reactividad mediada por IgE que presentan sueros procedentes de pacientes con esta alergia a  $\alpha/\beta$ -gliadina recombinante y gliadina nativa total (Bittner, Grassau, Frenzel & Baur, 2008).

### 1.3.2. Anafilaxia inducida por ejercicio dependiente de trigo (WDEIA)

Los estudios realizados indican que el  $\omega_5$ -gliadina es el alérgeno presente en el trigo más relevante en WDEIA (Matsuo et al., 2004, Mittag et al., 2004, Morita, Matsuo, Mihara, Morimoto, Savage & Tatham, 2003, Morita, Matsuo, Chinuki, Takahashi, Dahlstrom & Tanaka, 2009). Aproximadamente el 80% de los pacientes con WDEIA tienen anticuerpos IgE que reaccionan frente a la  $\omega_5$ -gliadina, mientras que el resto reaccionan frente a glutenina de alto peso molecular (Matsuo et al., 2004, Morita, Matsuo, Chinuki, Takahashi, Dahlstrom & Tanaka, 2009). Adicionalmente, los anticuerpos IgE procedentes de pacientes con WDEIA presentan reactividad cruzada con otras proteínas presentes en el trigo como la  $\gamma$ -gliadina (Matsuo et al., 2004), lo que indica que la  $\omega_5$ -gliadina, a pesar de ser el alérgeno más relevante, no es el único implicado en la WDEIA.

Se han descrito cuatro epítomos dominantes para la unión de IgE a la  $\omega_5$ -gliadina, QQIPQQQ, QQFPQQQ, QQSPEQQ, QQSPQQQ, en los que las posiciones Gln<sup>1</sup>, Pro<sup>4</sup>, Gln<sup>5</sup>, Gln<sup>6</sup> y Gln<sup>7</sup> son críticas para la unión de IgE (Matsuo et al., 2004). La identificación de epítomos inmunodominantes en  $\omega_5$ -gliadina mediante el uso de suero procedente de pacientes con diversos tipos de alergia al trigo (anafilaxis, urticaria y WDEIA) da lugar a una secuencia consenso del tipo QXX<sub>1</sub>PX<sub>2</sub>QQ, donde X<sub>1</sub> es L, F, S, I o Y y X<sub>2</sub> Q, E o G (Battais et al., 2005, Denery-Papini et al., 2011). Un estudio reciente realizado en ratones, muestra que la deaminación de gliadinas, proceso que ocurre en la mucosa del intestino mediante la acción de la transglutaminasa 2, incrementa la respuesta T<sub>H</sub>2 con respecto a la gliadina nativa (Gourbeyre, Denery-Papini, Larre, Gaudin, Brossard & Bodinier, 2012).

### 1.3.3. Celiacía

A pesar de los numerosos estudios realizados para la identificación de epítomos de las proteínas del gluten relevantes en celiacía, la caracterización completa de un repertorio de péptidos implicados en la patogénesis es compleja debido a la gran heterogeneidad que presentan las proteínas del gluten (Camarca et al., 2009).

Un estudio realizado en pacientes DQ2+ revela que los péptidos del gluten más reactivos en estos pacientes corresponden a la  $\alpha$ -gliadina (57-63),  $\gamma$ -gliadina (139-153) y  $\omega$ -gliadina (102-118), mostrando heterogeneidad en las respuestas de las células T intestinales (Camarca et al., 2009). La caracterización de la respuesta de las células T a prolaminas tóxicas derivadas de trigo, cebada y centeno en adultos con enfermedad celíaca, confirmó la estimulación de células T por 96 péptidos presentes en el gluten,

identificando los péptidos más activos en  $\gamma$ -gliadinas,  $\omega$ -gliadinas, hordeínas y secalinas (Tye-Din et al., 2010).

Actualmente, hay consenso general en la amplia heterogeneidad de péptidos del gluten activos en pacientes celíacos, especialmente en individuos HLA DQ2. Los péptidos del gluten más activos en pacientes celíacos, se resumen en un reciente estudio, identificando epítomos en  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadinas y gluteninas presentes en el trigo (Camarca, Del Mastro & Gianfrani, 2012).

#### *1.4. Nuevas estrategias terapéuticas en la hipersensibilidad al trigo*

En la actualidad, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes celíacos dirigidas al estudio de la patogénesis de la enfermedad para proponer alternativas que incluyen desde modificación y selección de variedades de trigo menos dañinas a técnicas de modulación de la respuesta inmune (Rashtak & Murray, 2012). Por otro lado, estrategias basadas en la generación de variedades de trigo con niveles reducidos de proteínas implicadas en hipersensibilidad de tipo I, sugieren la posibilidad de producir variedades menos inmunogénicas (Altenbach & Allen, 2011).

##### *1.4.1. Modificación genética*

La reducción de los niveles de gliadina en trigo se ha propuesto como posible solución para reducir la toxicidad en pacientes celíacos. Las proteínas del gluten están codificadas en los cromosomas 1 y 6, por lo que se realizó un estudio en el que se analizaban los niveles de epítomos que estimulan células T y las propiedades tecnológicas de la harina tras eliminar los loci correspondientes a las diferentes gliadinas (van den Broeck et al., 2009). Los resultados obtenidos muestran que la eliminación de  $\alpha/\beta$ -gliadina disminuye la presencia de epítomos que estimulan células T, pero también afecta negativamente a las propiedades tecnológicas de la harina. Sin embargo, la reducción de los niveles de  $\gamma$ -gliadina y  $\omega$ -gliadina/LMW-glutenina mantiene estas propiedades a la vez que reduce la presencia de epítomos (van den Broeck et al., 2009).

##### *1.4.2. Silenciamiento génico (RNA de interferencia)*

Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se han generado semillas modificadas genéticamente mediante técnicas de silenciamiento génico (Altenbach & Allen, 2011). En este estudio, la caracterización proteómica del trigo "Butte 86" utilizado en Estados Unidos para la fabricación de pan, ha servido como punto de partida para el diseño de RNA de interferencia para el silenciamiento de genes que

codifican para  $\omega$ -gliadinas. Se ha logrado la transformación estable de "Butte 86" con niveles bajos o carentes de  $\omega_5$ -gliadina, haciendo posible la modificación de la composición de la harina. La eliminación o reducción de los niveles de  $\omega_5$ -gliadina, identificadas como los principales alérgenos causantes de la WDEIA (Morita, Matsuo, Mihara, Morimoto, Savage & Tatham, 2003, Palosuo et al., 1999), supone una reducción del riesgo de ingerir alimentos que contienen trigo para individuos alérgicos.

El silenciamiento génico se ha estudiado también como posible estrategia para generar nuevos trigos aptos para celíacos, mediante la reducción de los niveles de  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadinas, usando construcciones que contienen un fragmento altamente conservado en estas gliadinas. Para ello, se diseñaron diferentes construcciones de RNA de interferencia y se expresaron en el endospermo de las semillas, consiguiendo una fuerte reducción de los niveles de gliadinas. A continuación se extrajo el total de las proteínas del gluten y se comprobó la capacidad de inducir respuesta inmune en células T, encontrando una disminución de la respuesta inmune a estos extractos. Este estudio sugiere que la disminución de los niveles de gliadinas mediante RNA de interferencia podría ser usada para la obtención de variedades de trigo con niveles bajos de toxicidad para celíacos (Gil-Humanes, Piston, Tollefsen, Sollid & Barro, 2010).

El efecto que la supresión de gliadinas tiene sobre las propiedades biomecánicas del trigo está siendo estudiado. La disminución de los niveles de  $\gamma$ -gliadinas resulta en un incremento del contenido de otras proteínas del gluten sin afectar a la fuerza de la red de gluten (Piston, Gil-Humanes, Rodríguez-Quijano & Barro, 2011), sugiriendo que estas proteínas no son fundamentales para la calidad de la masa y pueden ser reemplazadas por otras. Sin embargo, la supresión de todas las gliadinas, además de cambiar la composición proteica, afecta a la formación y fusión de los cuerpos proteicos (Gil-Humanes, Piston, Shewry, Tosi & Barro, 2011). A pesar de los cambios en la composición proteica y la morfología de los cuerpos proteicos, la supresión de gliadinas no produce cambios acentuados en el contenido total de proteína (Gil-Humanes, Piston, Shewry, Tosi & Barro, 2011).

#### *1.4.3. Modulación de la respuesta inmune*

La modulación de la respuesta inflamatoria mediante el uso de compuestos antiinflamatorios, amplificación de la producción de citoquinas reguladoras, uso de péptidos inmunoregulatorios o bloqueo del reclutamiento de linfocitos están siendo desarrolladas para el tratamiento de la celiaquía (Rashtak & Murray, 2012).

Adicionalmente, el bloqueo de la presentación de antígeno es otra estrategia sugerida, bien mediante la inhibición de la transglutaminasa o bloqueando el sitio de

unión (HLA) del péptido inmunogénico (Rashtak & Murray, 2012). La conversión de residuos de glutamina a glutamato mediante la transglutaminasa incrementa la afinidad de las moléculas HLA por los péptidos de gluten, haciendo más efectiva la presentación del antígeno y exacerbando la respuesta inmune. Por lo tanto, el uso de inhibidores específicos de esta enzima son un potencial tratamiento en la celiaquía. En la actualidad, se han diseñado diversos compuestos activos capaces de producir esta inhibición para ser usados en estudios experimentales en el tratamiento de la celiaquía (Klock et al., 2011). Por otro lado, el uso de péptidos análogos a la gliadina para bloquear la molécula HLA, generados por alteración de la estructura de ésta, ha resultado efectivo en la inhibición de la presentación de antígeno (Xia et al., 2007).

#### 1.4.4. Otras estrategias

Las técnicas de detoxificación de gluten para la reducción de péptidos de gliadina inmunogénicos incluyen el uso de enzimas proteolíticas y polímeros diseñados para la inactivación de estos péptidos (Rashtak & Murray, 2012).

Aunque no existen modelos animales capaces de reproducir todas las características de la celiaquía, actualmente existen modelos *in vitro* para estudios de toxicidad del gluten y desarrollo de nuevos tratamientos que incluyen diferentes líneas celulares y cultivos procedentes de biopsias de pacientes celíacos (Bodinier et al., 2007, Lindfors, Rauhavirta, Stenman, Maki & Kaukinen, 2012).

Por último, la generación de vacunas parece la opción preferida por los pacientes celíacos. Una vacuna contra el gluten (*Nexvax2*) ha sido desarrollada basándose en una serie de péptidos frecuentemente reconocidos y actualmente, se ha completado la fase I de ensayos clínicos en voluntarios celíacos HLA DQ2+ (NCT00879749) (Rashtak & Murray, 2012).

## 2. Objetivos

El objetivo de este proyecto es la búsqueda de herramientas para la identificación de prolaminas implicadas en reacciones de hipersensibilidad de tipo I al trigo. La identificación de alérgenos a los que un paciente presenta hipersensibilidad supondría un avance en la búsqueda de variedades de trigo menos inmunogénicas para ese paciente y en la identificación de nuevas dianas para la selección o desarrollo de variedades inocuas para alérgicos a este cereal, así como la detección de posibles alergias a otros cereales en las que la proteína identificada se encuentre presente.

En este estudio se proponen dos estrategias para la identificación de alérgenos: i) la extracción de prolaminas de diferentes variedades de trigo para la identificación de diferencias en la composición proteica de éstas (patrón electroforético) y respuesta inmunogénica de pacientes alérgicos al trigo, ii) búsqueda de péptidos inmunogénicos presentes en las prolaminas de trigo a los que los pacientes alérgicos presenten hipersensibilidad.

### *2.1. Estrategia 1: identificación de prolaminas extraídas de trigo*

Para la identificación de prolaminas que actúan como alérgenos se propone su extracción mediante un protocolo, previamente optimizado para harinas de trigo, basado en la solubilidad de estas proteínas en etanol y su identificación mediante IgE específicas presentes en sueros de pacientes alérgicos al trigo.

La separación electroforética se realizará en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), determinando su patrón electroforético mediante tinción con Azul de Coomassie. La reactividad mediada por IgE presente en los sueros de pacientes alérgicos frente a las distintas prolaminas de trigo se determinará mediante inmunodetección (western blot) tras la separación por SDS-PAGE de las prolaminas de diferentes variedades de trigo y transferencia de las éstas a membrana.

### *2.2. Estrategia 2: identificación de péptidos inmunogénicos en prolaminas*

Para la identificación de nuevos péptidos inmunogénicos presentes en las prolaminas se propone la síntesis de diversas secuencias presentes en las prolaminas que actúan como alérgenos, analizando posteriormente la presencia de IgE específicas para esa secuencia en sueros de pacientes alérgicos al trigo.

Esta estrategia se pondrá a punto mediante el análisis de la reactividad mediada por IgE presente en sueros procedentes de alérgicos al trigo por inmunodetección (dot blot) tras la aplicación en membrana de nitrocelulosa de péptidos previamente identificados como inmunogénicos en la literatura.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

Los cereales usados en este estudio, *Triticum durum*, *turanicum* y *aestivum* (variedades Badiel y Soisson), *Hordeum vulgare* (vestida y desnuda), *Avena sativa*, *Secale cereale* y *Oryza sativa*, fueron cedidos por los Drs. Nieves Aparicio (ITACyL) y Manuel Gómez (Dpto. Ingeniería Agrícola y Forestal de la Universidad de Valladolid). La gliadina de trigo (Sigma-Aldrich Co.), preparada en etanol 60% (v/v) a 5 mg/ml, se usó como control positivo.

Los péptidos utilizados en este estudio, QQ-10 (QEQVPLVQQQ), LC-10 (LALQTLPAMC), FQ-10 (FHQQQLPQQQ) y PF-10 (PQQQFPQQQF), fueron sintetizados por Biomedal y resuspendidos en dimetil sulfóxido a 10 mg/ml.

#### 3.2. Suero humano

Los sueros de 6 pacientes alérgicos al trigo con diversos síntomas (asma, angioedema, urticaria o anafilaxia) fueron cedidos por la Dra. Alicia Armentia (Servicio de Alergia del Hospital Universitario Río Ortega). La alergia al trigo se comprobó mediante test cutáneo (*prick test*). La Tabla 2 muestra los niveles de IgE específica de trigo de cada uno de los sueros, siendo la IgE específica de clase 3 (3,5-17,5 kU/l), nivel significativo de anticuerpos. Los sueros control se obtuvieron de pacientes sanos.

#### 3.3. Extracción de prolaminas

La extracción de prolaminas se llevó a cabo siguiendo un procedimiento secuencial basado en el protocolo de Weiss *et al.* (Weiss, Vogelmeier & Gorg, 1993) con algunas modificaciones. La fracción correspondiente a albúminas/globulinas se extrajo de 100 mg de muestra triturada con 1 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 8,8) durante 1 h a 4°C con agitación constante. Después de centrifugar a 13000g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó 3 veces con el mismo buffer. El precipitado resultante se resuspendió en 0,5 ml (ratio 5:1 µl/mg) de etanol 60% (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 13000g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se recogió como la fracción correspondiente a las prolaminas.

#### 3.4. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

La separación de prolaminas se realizó mediante electroforesis en gel de acrilamida al 12,5% (SDS-PAGE). Tras la electroforesis, las proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich Co.).

### *3.5. Determinación de la reactividad mediada por IgE*

La determinación de reactividad frente a prolaminas extraídas de diferentes variedades de trigo se determinó mediante western blot. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Thermo Fisher Scientific). La membrana se incubó con solución de bloqueo TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) con 5% de BSA 1 h. La incubación con los sueros, diluidos 1:2000, se llevó a cabo a 4°C durante 20 h. Tras lavar 3 veces, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgE humana conjugado a peroxidasa (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:5000 durante 30 minutos. La proteína se detectó mediante el sistema Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific).

### *3.6. Determinación de IgE específica frente a péptidos (dot blot)*

La determinación de reactividad frente a péptidos se realizó mediante dot blot. Los péptidos (5 y 10  $\mu\text{g}$ ) se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Tras secar completamente a temperatura ambiente, el bloqueo se realizó con TBS con 5 % de BSA durante 1 h. La incubación con suero humano (diluciones 1:200 y 1:50), se llevó a cabo a 4°C durante 20 h. Tras lavar 3 veces, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgE humana conjugado a peroxidasa (Invitrogen Life Technologies), diluido 1:5000 y 1:500 durante distintos tiempos. La presencia de IgE específica se detectó mediante el sistema Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific).

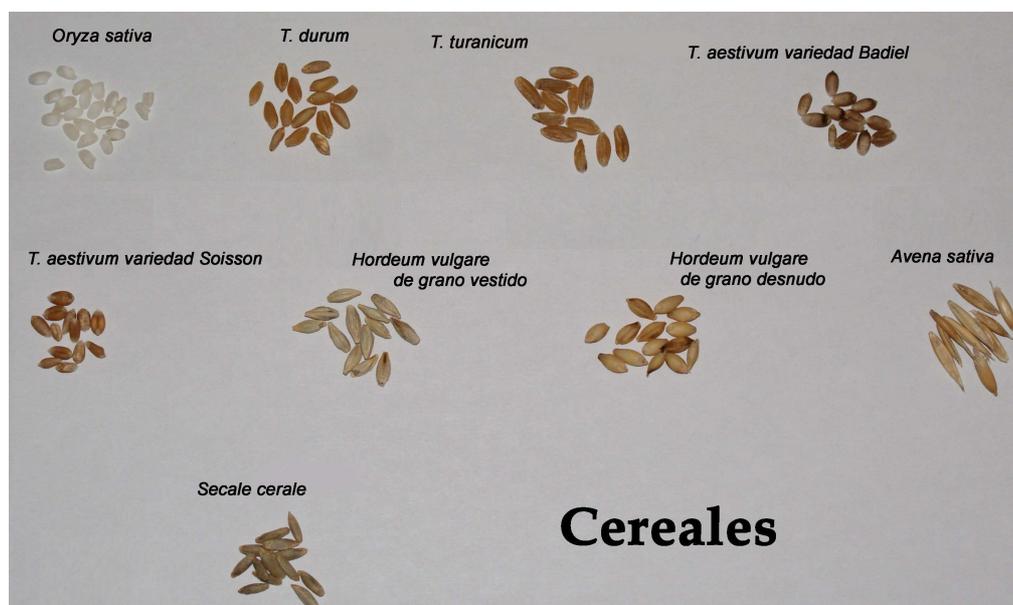
## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Estrategia 1: identificación de prolaminas extraídas de trigo

Las prolaminas presentes en el trigo, solubles en soluciones alcohólicas, pueden identificarse mediante su diferencia de movilidad en geles de proteínas, clasificándolas en cuatro grandes familias como  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas. Tras la separación electroforética, la variación en los perfiles de proteínas determina el patrón electroforético de una variedad o cereal específico.

La determinación del patrón electroforético de las prolaminas presentes en los cereales es por tanto, un método rápido para la estimación e identificación del contenido de los diferentes tipos de prolaminas. Esta estrategia puede resultar útil para determinar variedades menos alergénicas en función de la presencia de prolaminas previamente identificadas como alérgenos o la presencia de contaminaciones con otros cereales cuando un paciente que no es alérgico a un cereal presenta reacciones de hipersensibilidad tras su ingestión.

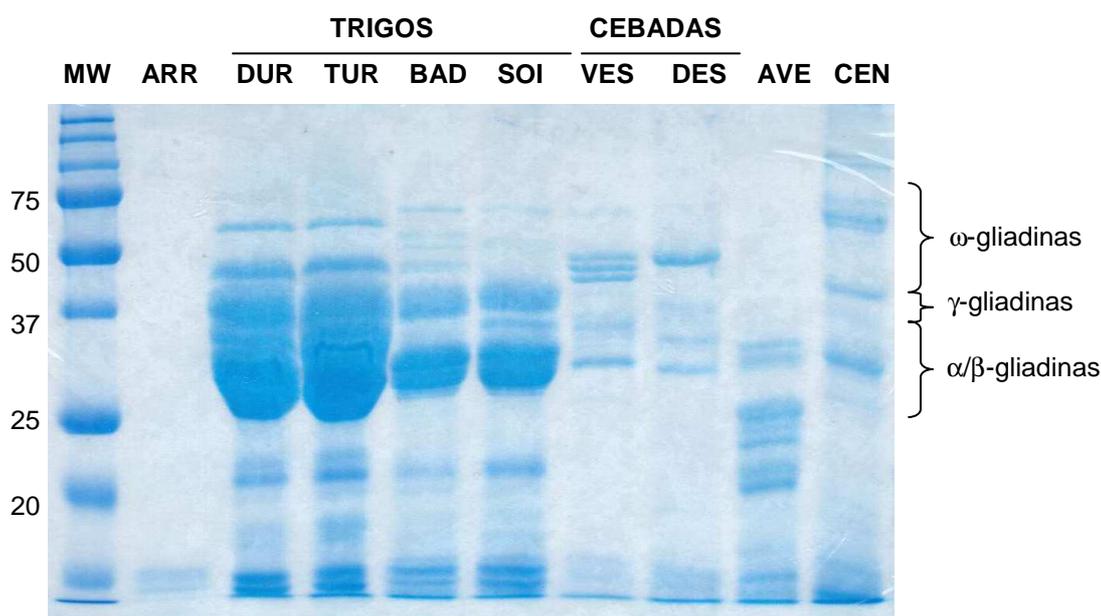
En la actualidad, las reacciones de hipersensibilidad al trigo son las más frecuentes, por lo que en este estudio se ha analizado el patrón electroforético de distintas variedades de este cereal, comparándolo con los patrones en otros cereales sin gluten como arroz (*Oryza sativa*), o que contienen gluten, como cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*) y centeno (*Secale cereale*) (fig. 5).



**Fig. 5.** Cereales usados en este estudio.

Elegimos dos variedades de trigos duros, una variedad actual, *T. durum* (hexaploide), resultado de la hibridación natural entre variedades tetraploides y diploides y otra antigua, *T. turanicum* (tetraploide), también conocido como *T. turgidum subsp. turanicum* y comercializado actualmente como Kamut®, con el objetivo de encontrar posibles diferencias entre los alérgenos durante el desarrollo de las variedades actuales. Además, utilizamos dos variedades actuales de trigos blandos (*T. aestivum*), Badiel y Soisson. El Badiel es un trigo de gran fuerza de ciclo medio corto mientras que el Soisson, trigo de fuerza media con alto potencial productivo, es de ciclo largo. Ambos trigos son utilizados para la producción de harinas destinadas a panificación.

El patrón electroforético se realizó tras la extracción con etanol (60% v/v) de prolaminas presentes en las diferentes variedades de trigo (gliadinas), arroz (orzaínas), cebada (hordeínas), avena (aveninas) y centeno (secalinas). Las proteínas se separaron en gel de acrilamida mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con Coomassie (fig. 6).



**Fig. 6.** Patrón electroforético. La separación de las prolaminas se realizó mediante SDS-PAGE y se visualizó la proteína mediante tinción con Coomassie. MW, patrón de pesos moleculares; ARR, Arroz; DUR, *T. durum*; TUR, *T. turanicum*; BAD, Badiel; SOI, Soisson; VES, Cebada vestida; DES, Cebada desnuda; AVE, Avena; CEN, Centeno.

Los resultados obtenidos muestran diferencias en el contenido de gliadinas entre los trigos duros y blandos, así como diferencias entre los tipos de gliadinas presentes. Además, se han detectado diferencias en las gliadinas entre las variedades Badiel y Soisson. La presencia de distintas clases y cantidad de gliadinas sugiere la posibilidad de diferencias en la alergenicidad que un paciente puede presentar a estas variedades, por lo que posteriormente se buscarán diferencias en la presencia de IgE específica en los sueros de alérgicos a trigo frente a las diferentes clases de gliadinas presentes en estas variedades.

El patrón electroforético obtenido de cebada, avena y centeno, a pesar de presentar bandas comunes a las del trigo, permite identificarlos y diferenciarlos claramente. Aunque la cantidad de prolaminas detectada en estos cereales es menor que en trigos, no podemos asegurar que el contenido real sea menor, ya que el método de extracción está optimizado para harina de trigo. En el caso del arroz, no se detectaron orzaínas tras la extracción con etanol. A pesar de que el arroz es el cereal que presenta más bajo contenido de prolaminas, la ausencia de proteína extraída sugiere que el método debería ser optimizado para poder realizar ensayos cuantitativos de otros cereales diferentes al trigo.

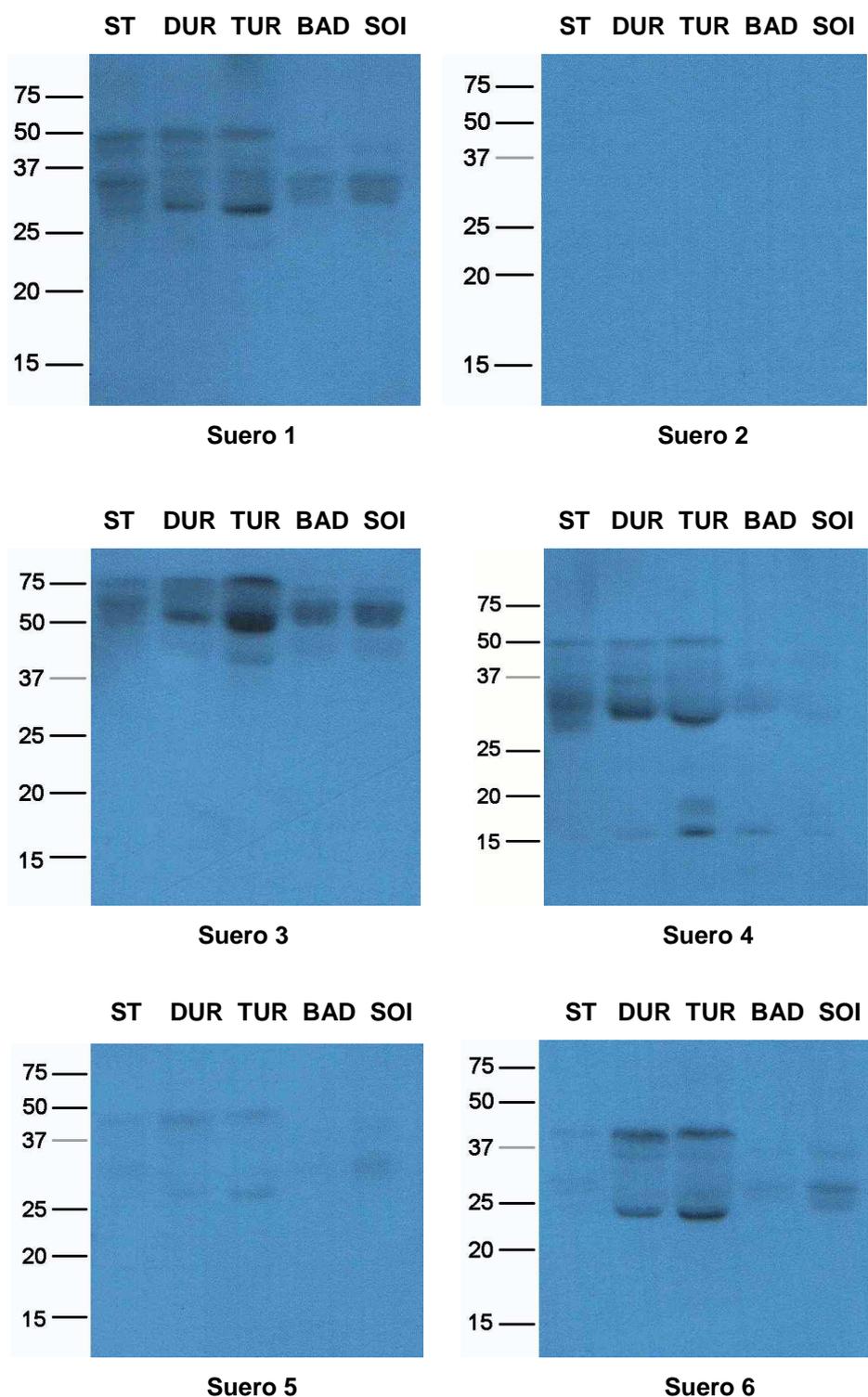
La identificación de las diferentes clases de gliadinas en trigo ( $\alpha/\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadinas) se realizó mediante búsqueda bibliográfica de estudios previos en trigos (Battais et al., 2003, Denery-Papini et al., 2007, Weiss, Vogelmeier & Gorg, 1993), donde las gliadinas se distribuyen en función de su movilidad electroforética, presentando mayor movilidad las  $\alpha/\beta$ -gliadinas (~30-37 kDa), seguidas de las  $\gamma$ -gliadinas (~37-40 kDa) y  $\omega$ -gliadinas (>40 kDa). A pesar de ser un extracto enriquecido en prolaminas, no se descarta la presencia de bajos niveles de albúminas y globulinas (15-100 kDa) y gluteninas de bajo peso molecular (~35-45 kDa). La identificación de las prolaminas en cebada, avena y centeno requiere confirmación, ya que posibles diferencias en la secuencia aminoacídica de las prolaminas en estos cereales pueden afectar a la movilidad electroforética.

Las diferencias en la composición y cantidad de gliadinas presentes en las variedades de trigo, además de influir en las características del gluten, pueden ser útiles para la determinación de variedades menos inmunogénicas, buscando aquellas que contengan menores niveles de prolaminas a los que los pacientes presenten hipersensibilidad. Para determinar las posibles diferencias entre las gliadinas que resultan ser alergénicas, se determinó la presencia de IgE específicas de estas proteínas mediante inmunodetección (unión IgE a gliadina = alérgeno) tras la incubación de membranas que contienen gliadinas de las distintas variedades de trigo con sueros de pacientes alérgicos (tabla 2).

**Tabla 2.** Suero de pacientes alérgicos al trigo.

Suero	Edad	Sexo	Clínica	Prick test trigo (mm <sup>2</sup> )	IgE trigo (kU/l)	Prick test otros alérgenos
1	26	F	Asma Urticaria	34	8,62	Yema, pollo
2	32	M	Asma Angioedema	24	3,60	
3	38	F	Asma Urticaria	26	3,98	Lolium
4	34	M	Asma Anafilaxia	64	16,20	Cacahuete, soja, avellana
5	44	F	Asma Urticaria	26	5,65	Lolium, avellana
6	35	F	Asma Urticaria	24	4,10	Lolium

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. No se detectaron diferencias en la reactividad entre el trigo duro actual y su variante antigua. En algunos casos, se obtuvo una señal más intensa en los trigos antiguos, lo que sugiere mayor cantidad de gliadinas presentes en esta variedad. El patrón de gliadinas a los que los pacientes presentan reactividad es diferente para cada paciente. Gliadinas entorno a los 30 kDa ( $\alpha/\beta$ -gliadinas) y 50 kDa ( $\omega$ -gliadinas) son las que mayor reactividad presentan en los sueros 1, 4 y 5. En el suero 3, además de a 50 kDa ( $\omega$ -gliadinas), aparece una banda entorno a los 75 kDa ( $\omega$ -gliadinas) reconocida por las IgE. Sin embargo, las gliadinas que resultan alérgicas para el paciente del suero 6 corresponden a un peso molecular de unos 23 y 37 kDa, sugiriendo que este suero presenta reactividad también a otras proteínas presentes en el extracto que no corresponden a gliadinas. En los sueros 1, 4 y 6 también se reconoce una franja de gliadinas con menor intensidad localizada entre las bandas descritas anteriormente, sugiriendo que las  $\gamma$ -gliadinas pueden actuar como alérgenos e incluyendo una amplia variedad de  $\alpha/\beta$ -gliadinas alérgicas. En el suero 2 no se detectó reactividad frente a las gliadinas presentes en estas variedades.



**Fig. 7.** Reactividad de los sueros frente a las gliadinas de trigo. Inmunodetección de IgE específica frente a las gliadinas presentes en gliadina de trigo comercial (ST), *T. durum* (DUR), *T. turanicum* (TUR), Badiel (BAD) y Soisson (SOI) con los diferentes sueros de pacientes alérgicos al trigo.

Las gliadinas presentes en trigo blando que son reconocidas como alérgenos, son igual entre las dos variedades (Badiel y Soisson), pero éstas también varían de unos pacientes a otros. Existe una gran diferencia en la cantidad de gliadinas alergénicas presentes en estos trigos con respecto a los trigos duros, presentando más gliadinas alergénicas estos últimos. En los sueros 1, 4, 5 y 6 se detecta una franja de gliadinas entre 30 y 37 kDa, lo que correspondería a  $\alpha/\beta$ -gliadinas. En el suero 3 las bandas detectadas se encuentran entre los 50 y 75 kDa ( $\omega$ -gliadinas). No se detectó reactividad en el suero 2.

Estos resultados indican una gran heterogeneidad de alérgenos presentes en los trigos a los que los pacientes pueden presentar hipersensibilidad, lo que dificulta la tarea de identificación de alérgenos, siendo necesario un estudio detallado con una amplia población alérgica al trigo. Además, los síntomas que presentan los pacientes son independientes de las gliadinas a las que presentan alergenicidad, por lo que la detección de alérgenos en función de este parámetro no es posible.

La inmunodetección de prolaminas mediada por IgE tras la separación electroforética permite la identificación de un amplio espectro de proteínas alergénicas, y junto con el patrón electroforético, supone una herramienta rápida para determinar la hipersensibilidad que presenta un paciente frente a las distintas variedades de trigo. Sin embargo, debido a la gran cantidad de proteínas detectadas, la separación electroforética supone un paso previo en la identificación de proteínas que debe ser completado con otras técnicas que permitan una identificación precisa, como técnicas cromatográficas (HPLC), separación de proteínas en geles bidimensionales y posterior análisis por espectrometría de masas o secuenciación de las proteínas que presentan unión a IgE.

En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la reactividad mediada por IgE en trigo duro actual y antiguo, resultados que concuerdan con un estudio reciente en el que se analizaron las diferencias de toxicidad en pacientes celíacos de trigos actuales y antiguos (Colomba & Gregorini, 2012). En este estudio, los autores concluyeron que no se puede confirmar que los trigos antiguos sean menos tóxicos que los actuales. Por otro lado, los trigos blandos presentan reactividad frente a menor variedad de prolaminas en comparación con los trigos duros, facilitando la identificación de alérgenos y la generación de variedades menos inmunogénicas. La identificación de prolaminas alergénicas en otros cereales (avena, centeno...) podría realizarse también mediante esta técnica.

#### 4.2. Estrategia 2: identificación de péptidos inmunogénicos en prolaminas

La estrategia utilizada para la determinación de hipersensibilidad a los diferentes péptidos que presentan los pacientes alérgicos al trigo consistió en una inmunodetección (dot blot), donde los péptidos, unidos a una membrana, son reconocidos por las IgE específicas para esa secuencia presentes en los sueros.

Entre los numerosos péptidos descritos en la literatura (datos no mostrados), se eligieron dos péptidos presentes en  $\alpha$ -gliadina y otros dos en  $\omega_5$ -gliadina (tabla 3), sintetizando secuencias de 10 aminoácidos previamente identificadas como inmunogénicas.

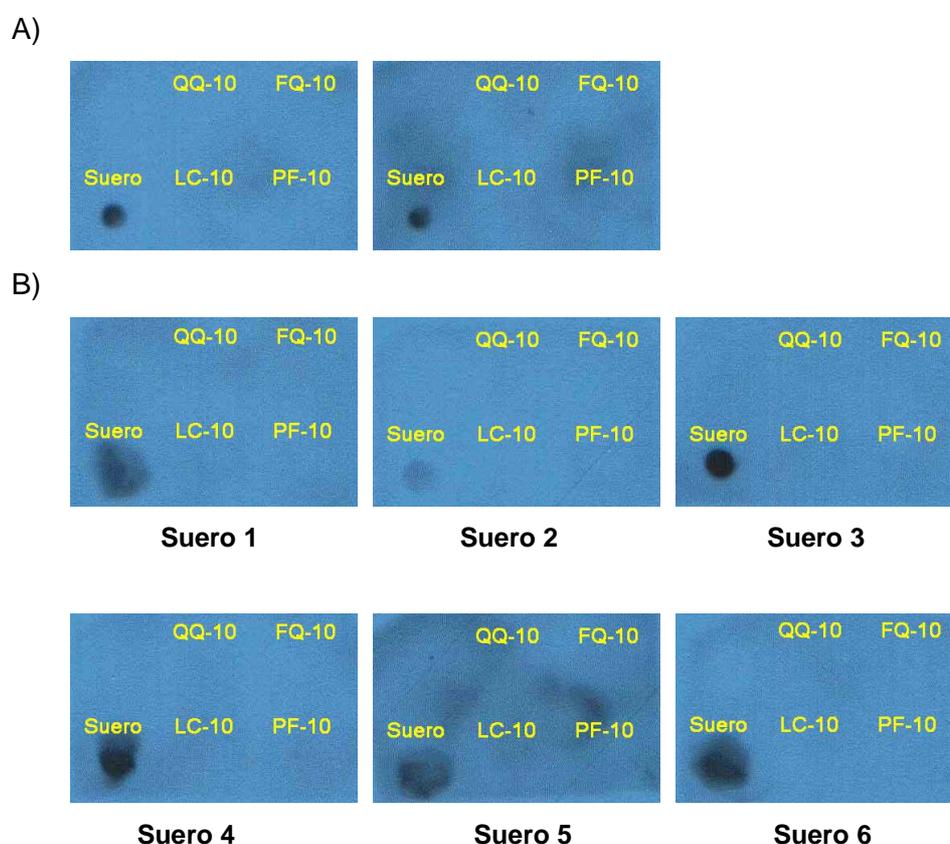
La presencia de IgE específica frente los péptidos QEQVPLVQQQ (QQ-10) y LALQTLPAMC (LC-10) presentes en la  $\alpha$ -gliadina ha sido descrita por varios autores en estudios independientes (Battais et al., 2005, Denery-Papini et al., 2011). Los ensayos realizados demuestran la presencia de IgE específica frente al péptido QQ-10 en pacientes con WDEIA mientras que la IgE específica frente al péptido LC-10 aparece en pacientes con asma.

Estudios previos describen la presencia de IgE específica en pacientes con WDEIA frente secuencias presentes en  $\omega_5$ -gliadina, estableciendo una secuencia consenso del tipo  $QQX_1PX_2QQ$  (Battais et al., 2005, Matsuo et al., 2004). Los péptidos elegidos en este estudio, además de incluir esta secuencia consenso, han sido previamente probados en ensayos de reactividad con sueros de alérgicos al trigo. La presencia de IgE específica frente al péptido FHQQQLPQQQ (FQ-10) ha sido detectada en pacientes con urticaria o anafilaxia (Battais et al., 2005). Por otro lado, estudios recientes con sueros procedentes de niños y adultos que presentan urticaria, así como adultos con anafilaxia o WDEIA, muestran la presencia de IgE específica frente al péptido PQQQFPQQQF (PF-10) (Denery-Papini et al., 2011).

**Tabla 3.** Péptidos inmunogénicos.

Proteína	Péptidos inmunogénicos	Referencias
$\alpha$ -gliadina	<b>QEQVPLVQQQ (QQ-10)</b>	(Battais et al., 2005,
	<b>LALQTLPAMC (LC-10)</b>	Denery-Papini et al., 2011)
$\omega_5$ -gliadina	<b>Secuencia consenso: <u>QQX<sub>1</sub>PX<sub>2</sub>QQ</u></b>	(Battais et al., 2005, Denery-Papini et al., 2011, Matsuo et al., 2004, Tatham & Shewry, 2008)
	<b>X<sub>1</sub>=I, L, F, S, Y    X<sub>2</sub>=Q, E</b>	
	<b>FHQQQLPQQQ (FQ-10)</b>	
	<b>PQQQFPQQQF (PF-10)</b>	

La presencia de IgE específicas para estas secuencias en los sueros procedentes de pacientes alérgicos al trigo (tabla 2) se analizó mediante inmunodetección (dot blot). Se realizaron numerosas pruebas variando la concentración de péptidos en la membrana, diluciones de los sueros y anticuerpo anti-IgE humana. Sin embargo, no fue posible determinar la presencia de IgE unida a los péptidos en la membrana (fig. 8), a pesar de que la técnica de dot blot funcionó previamente para la detección de gliadinas procedentes de variedades de trigo y ha sido utilizada por diversos autores para la detección de IgE específica en sueros de alérgicos al trigo (Battais et al., 2005, Matsuo, Kohno, Niihara & Morita, 2005, Snegaroff et al., 2007).



**Fig. 8.** Reactividad de los sueros frente a péptidos inmunogénicos. Los péptidos, QQ-10 (QEQVPLVQQQ), LC-10 (LALQTLPAMC), FQ-10 (FHQQQLPQQQ) y PF-10 (PQQQFPQQQF), se depositaron sobre una membrana de nitrocelulosa y la presencia de IgE específica se determinó mediante inmunodetección (dot blot). La presencia de IgE en los sueros se confirmó mediante la aplicación directa de suero sobre la membrana. A) Sueros control (pacientes sanos). B) Sueros de alérgicos al trigo.

Estos resultados indican que el uso de péptidos inmunogénicos requiere una optimización para su uso como herramienta en la identificación de alérgenos. La ausencia de señal detectada en nuestros ensayos puede deberse a una pérdida en la unión de los péptidos a la membrana que podría ser solucionada mediante unión covalente de los péptidos (Battais et al., 2005). La optimización de este ensayo requiere el uso de una amplia batería de péptidos, así como sueros procedentes de un número elevado de pacientes y el uso de un control positivo del que no disponemos en este estudio. A pesar de los resultados, el uso de baterías de péptidos inmunogénicos supone una herramienta rápida para la identificación de alérgenos.

## **5. Conclusiones**

Las reacciones de hipersensibilidad al trigo causan diversos síntomas en función de la ruta de exposición al alérgeno (inhalación, ingestión o contacto con la piel), el péptido inmunogénico que produzca la reacción o del mecanismo inmune activado (mediando o no mediado por IgE). El incremento en el número de pacientes con alergia al trigo y diagnosticados con enfermedad celiaca, hace necesarios nuevos avances en la caracterización del mecanismo por el que se producen, identificación de proteínas y péptidos inmunogénicos y desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento o incluso la cura de estas patologías.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la necesidad de nuevas técnicas para la identificación de alérgenos presentes en los cereales, así como el amplio abanico de proteínas implicadas en las reacciones alérgicas. Los ensayos realizados con prolaminas extraídas de distintas variedades de trigo indican que existe una gran diversidad en las proteínas que actúan como alérgenos en cada paciente, además de un número elevado de proteínas a los que estos pacientes presentan hipersensibilidad. La complejidad de los resultados obtenidos tras el análisis de IgE específicas en sueros de pacientes alérgicos al trigo frente a las prolaminas presentes en los trigos, donde cada paciente presenta un patrón diferente de reactividad, demuestra la necesidad de estudios futuros para la identificación de alérgenos.

La inmunodetección de prolaminas mediada por IgE tras la separación electroforética permite la identificación de un amplio espectro de proteínas alergénicas, y junto con el patrón electroforético, supone una herramienta rápida para determinar la hipersensibilidad que presenta un paciente frente a las distintas variedades de trigo. Sin embargo, debido a la gran cantidad de proteínas detectadas, la separación electroforética es sólo un paso previo en la identificación de proteínas que debe ser

completado con otras técnicas para una identificación más precisa de los alérgenos presentes en trigo. Esta técnica podría aplicarse a otros cereales, optimizando el proceso de extracción de prolaminas, o en otras proteínas presentes en el gluten como las gluteninas. Además, las bases de datos de proteínas resultan una herramienta útil en la búsqueda de proteínas en otros cereales que previamente han sido identificadas como alérgenos en trigo.

Por otro lado, la posibilidad de detectar secuencias específicas frente a la que los pacientes presentan reactividad supone un reto para la detección de familias de proteínas donde esa secuencia este presente mediante bases de datos. El uso de péptidos inmunogénicos es la estrategia más directa para la detección de estas secuencias, lo que supondría una rápida identificación de proteínas alergénicas en trigo y otros cereales. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio indican la necesidad de optimización de esta técnica, debido a la ausencia de señal obtenida en los ensayos. Tras esta optimización, el uso de una amplia batería de péptidos, así como sueros procedentes de un número elevado de pacientes, generaría una amplia base de datos para comenzar la búsqueda en las bases de datos de proteínas en las que estas secuencias estén presentes, identificándolas como potenciales alérgenos.

Tras la identificación de proteínas implicadas en reacciones alérgicas, el paso siguiente consistiría en la búsqueda o generación de variedades donde la presencia de esas proteínas sea baja o inexistente. La eliminación de proteínas que actúan en reacciones de hipersensibilidad al trigo podría resultar una estrategia efectiva para la disminución del riesgo que produce la ingestión de trigo y sus derivados en pacientes alérgicos y celíacos. Sin embargo, es necesario evaluar el impacto que la ausencia de estas proteínas tendría en la calidad de la harina, así como los niveles de proteínas generados por la planta modificada genéticamente para compensar la pérdida de la proteína de interés.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido realizado bajo la supervisión del Dr. E. Arranz con la colaboración de los Drs. M. Gómez y J. A. Garrote, a los que agradezco su ayuda y soporte científico y a las Dras. A. Armentia y N. Aparicio por las muestras de suero humano y cereales cedidas para este estudio.

## **Bibliografía**

- Abbas and Lichtman. Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system. 2<sup>o</sup> Ed, Elsevier, 2004.
- Altenbach, S. B., & Allen, P. V. (2011). Transformation of the US bread wheat 'Butte 86' and silencing of omega-5 gliadin genes. *GM Crops*, 2(1), 66-73.
- Battais, F., Mothes, T., Moneret-Vautrin, D. A., Pineau, F., Kanny, G., Popineau, Y., Bodinier, M., & Denery-Papini, S. (2005). Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy*, 60(6), 815-821.
- Battais, F., Pineau, F., Popineau, Y., Aparicio, C., Kanny, G., Guerin, L., Moneret-Vautrin, D. A., & Denery-Papini, S. (2003). Food allergy to wheat: identification of immunoglobulin E and immunoglobulin G-binding proteins with sequential extracts and purified proteins from wheat flour. *Clinical and Experimental Allergy*, 33(7), 962-970.
- Bittner, C., Grassau, B., Frenzel, K., & Baur, X. (2008). Identification of wheat gliadins as an allergen family related to baker's asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(3), 744-749.
- Bodinier, M., Legoux, M. A., Pineau, F., Triballeau, S., Segain, J. P., Brossard, C., & Denery-Papini, S. (2007). Intestinal translocation capabilities of wheat allergens using the Caco-2 cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4576-4583.
- Camarca, A., Del Mastro, A., & Gianfrani, C. (2012). Repertoire Of Gluten Peptides Active In Celiac Disease Patients: Perspectives For Translational Therapeutic Applications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 12(2), 207-19.
- Camarca, A., Anderson, R. P., Mamone, G., Fierro, O., Facchiano, A., Costantini, S., Zanzi, D., Sidney, J., Auricchio, S., Sette, A., Troncone, R., & Gianfrani, C. (2009). Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *Journal of Immunology*, 182(7), 4158-4166.
- Colomba, M. S., & Gregorini, A. (2012). Are Ancient Durum Wheats Less Toxic to Celiac Patients? A Study of alpha-Gliadin from Graziella Ra and Kamut. *The Scientific World Journal*, 2012, 837416.
- Comino, I., Real, A., de Lorenzo, L., Cornell, H., Lopez-Casado, M. A., Barro, F., Lorite, P., Torres, M. I., Cebolla, A., & Sousa, C. (2011). Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*, 60(7), 915-922.

- Denery-Papini, S., Bodinier, M., Pineau, F., Triballeau, S., Tranquet, O., Adel-Patient, K., Moneret-Vautrin, D. A., Bakan, B., Marion, D., Mothes, T., Mameri, H., & Kasarda, D. (2011). Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(10), 1478-1492.
- Denery-Papini, S., Lauriere, M., Branlard, G., Morisset, M., Pecquet, C., Choudat, D., Merlino, M., Pineau, F., Popineau, Y., Boulenc, E., Bouchez-Mahiout, I., Bodinier, M., & Moneret-Vautrin, D. A. (2007). Influence of the allelic variants encoded at the Gli-B1 locus, responsible for a major allergen of wheat, on IgE reactivity for patients suffering from food allergy to wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 799-805.
- Dube, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., Macneil, J., Mack, D., Patel, D., & Moher, D. (2005). The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*, 128(4 Suppl 1), S57-67.
- Gianfrani, C., Auricchio, S., & Troncone, R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunology Letters*, 99(2), 141-145.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Shewry, P. R., Tosi, P., & Barro, F. (2011). Suppression of gliadins results in altered protein body morphology in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4203-4213.
- Gil-Humanes, J., Piston, F., Tollefsen, S., Sollid, L. M., & Barro, F. (2010). Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(39), 17023-17028.
- Gomez, L., Martin, E., Hernandez, D., Sanchez-Monge, R., Barber, D., del Pozo, V., de Andres, B., Armentia, A., Lahoz, C., & Salcedo, G. (1990). Members of the alpha-amylase inhibitors family from wheat endosperm are major allergens associated with baker's asthma. *FEBS Letters*, 261(1), 85-88.
- Gourbeyre, P., Denery-Papini, S., Larre, C., Gaudin, J. C., Brossard, C., & Bodinier, M. (2012). Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(2), 336-344.
- Hodge, L., Swain, A., & Faulkner-Hogg, K. (2009). Food allergy and intolerance. *Australian Family Physician*, 38(9), 705-707.

- Jabri, B., & Sollid, L. M. (2006). Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nature clinical practice. Gastroenterology & Hepatology*, 3(9), 516-525.
- Klock, C., Jin, X., Choi, K., Khosla, C., Madrid, P. B., Spencer, A., Raimundo, B. C., Boardman, P., Lanza, G., & Griffin, J. H. (2011). Acylideneoxindoles: a new class of reversible inhibitors of human transglutaminase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(9), 2692-2696.
- Lindfors, K., Rauhavirta, T., Stenman, S., Maki, M., & Kaukinen, K. (2012). In vitro models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. *Experimental Biology and Medicine*, 237(2), 119-125.
- Matsuo, H., Kohno, K., Niihara, H., & Morita, E. (2005). Specific IgE determination to epitope peptides of omega-5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Immunology*, 175(12), 8116-8122.
- Matsuo, H., Morita, E., Tatham, A. S., Morimoto, K., Horikawa, T., Osuna, H., Ikezawa, Z., Kaneko, S., Kohno, K., & Dekio, S. (2004). Identification of the IgE-binding epitope in omega-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12135-12140.
- Mittag, D., Niggemann, B., Sander, I., Reese, I., Fiedler, E. M., Worm, M., Vieths, S., & Reese, G. (2004). Immunoglobulin E-reactivity of wheat-allergic subjects (baker's asthma, food allergy, wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis) to wheat protein fractions with different solubility and digestibility. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48(5), 380-389.
- Morita, E., Matsuo, H., Chinuki, Y., Takahashi, H., Dahlstrom, J., & Tanaka, A. (2009). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis -importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis-. *Allergy International*, 58(4), 493-498.
- Morita, E., Matsuo, H., Mihara, S., Morimoto, K., Savage, A. W., & Tatham, A. S. (2003). Fast omega-gliadin is a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Dermatological Science*, 33(2), 99-104.
- Palosuo, K., Alenius, H., Varjonen, E., Koivuluhta, M., Mikkola, J., Keskinen, H., Kalkkinen, N., & Reunala, T. (1999). A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(5 Pt 1), 912-917.

- Piston, F., Gil-Humanes, J., Rodriguez-Quijano, M., & Barro, F. (2011). Down-regulating gamma-gliadins in bread wheat leads to non-specific increases in other gluten proteins and has no major effect on dough gluten strength. *PLoS One*, 6(9), e24754.
- Rashtak, S., & Murray, J. A. (2012). Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(7), 768-781.
- Salcedo, G., Quirce, S., & Diaz-Perales, A. (2011). Wheat allergens associated with Baker's asthma. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 21(2), 81-92.
- Sicherer, S. H. (2011). Epidemiology of food allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(3), 594-602.
- Snegaroff, J., Branlard, G., Bouchez-Mahiout, I., Laudet, B., Tylichova, M., Chardot, T., Pecquet, C., Choudat, D., Raison-Peyron, N., Vigan, M., Kerre, S., & Lauriere, M. (2007). Recombinant proteins and peptides as tools for studying IgE reactivity with low-molecular-weight glutenin subunits in some wheat allergies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9837-9845.
- Sotkovsky, P., Sklenar, J., Halada, P., Cinova, J., Setinova, I., Kainarova, A., Golias, J., Pavlaskova, K., Honzova, S., & Tuckova, L. (2011). A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, 41(7), 1031-1043.
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R. (2008). Allergens to wheat and related cereals. *Clinical and Experimental Allergy*, 38(11), 1712-1726.
- Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Dromey, J. A., Beissbarth, T., van Heel, D. A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S. I., Gianfrani, C., Jewell, D. P., Hill, A. V., McCluskey, J., Rossjohn, J., & Anderson, R. P. (2010). Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Science Translational Medicine*, 2(41), 41ra51.
- Van den Broeck, H. C., van Herpen, T. W., Schuit, C., Salentijn, E. M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R. J., Smulders, M. J., Gilissen, L. J., & van der Meer, I. M. (2009). Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC Plant Biology*, 9, 41.
- Weiss, W., Vogelmeier, C., & Gorg, A. (1993). Electrophoretic characterization of wheat grain allergens from different cultivars involved in bakers' asthma. *Electrophoresis*, 14(8), 805-816.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115-119.

Xia, J., Bergseng, E., Fleckenstein, B., Siegel, M., Kim, C. Y., Khosla, C., & Sollid, L. M. (2007). Cyclic and dimeric gluten peptide analogues inhibiting DQ2-mediated antigen presentation in celiac disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(20), 6565-6573.